



# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Τομέας Μητέρας-Παιδιού  
Γυναικολογική-Μαιευτική Κλινική  
(Διευθυντής: Κουμαντάκης Ευγένιος, Καθηγητής)

### Διδακτορική Διατριβή

**Τίτλος:** «Μεταβολές στα επίπεδα των **VEGF**, **bFGF**, **TGF-β1**, **ET-1** και **sKL**, στο πλάσμα της εγκύου κατά τη διάρκεια της **Φυσιολογικής Κύησης**, της **Υπερτασικής Κύησης** και της **Διαβητικής Κύησης**»

από

**Μενέλαο Κ. Λυγνό**

Ηράκλειο, 2007



*Στους ανθρώπους, που μου άνοιξαν το διάβα.*

*Είθε στο πρόσωπό μου να λάβουν υπόσταση τα απραγματοποίητα  
όνειρά τους.*

## ***Σύνθεση Τριμελούς Επιτροπής***

Επιβλέπων:	<b>Κουμαντάκης Ευγένιος</b>	Καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας (Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης)
Συνεπιβλέποντες:	<b>Ηλιόπουλος Γεώργιος</b>	Καθηγητής Αιματολογίας (Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης)
	<b>Ματαλλιωτάκης Ιωάννης</b>	Επίκουρος καθηγητής Μαιευτικής- Γυναικολογίας (Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης)

# Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή της έδρας της Μαιευτική και Γυναικολογίας, κο Κουμαντάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να έρθω σε επαφή με μία ερευνητική ομάδα, που αποτελεί πρότυπο ορθής λειτουργίας.

Ευγνωμοσύνη νιώθω για τον καθηγητή κο Ηλιόπουλο, για την υπομονή, με την οποία απαντούσε σε όλες τις απορίες μου και για το χρόνο, που διέθεσε από το φορτωμένο του πρόγραμμα, για να με βοηθήσει να αντιμετωπίσω τα προβλήματα, που προέκυψαν, τόσο κατά το ερευνητικό μέρος, όσο και κατά τη συγγραφή του παρόντος πονήματος.

Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει και στην υποστήριξη του κου Ματαλλιωτάκη, χωρίς την οποία, πολλά από τα εμπόδια, που συνήνητησα δύσκολα θα μπορούσα να τα ξεπεράσω.

Η εργασία αυτή δεν θα ήταν δυνατό να περατωθεί χωρίς την υποστήριξη από το εργαστήριο Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών μετά από παρέμβαση του καθηγητού κου Ανάγνου.

Πολύτιμη ήταν η αρωγή της κας Παππά κατά τη συλλογή, ταξινόμηση και αποθήκευση των δειγμάτων.

Σημαντική ήταν και η συνδρομή της κας Δαμιανάκη κατά τις μετρήσεις ELISA.

Για τη φιλία, την αγάπη και τη γενναιοδωρία της Λήδας, της Ελένης, του Κώστα και της Όλγας, αλλά και όλων των μελών της οικογένειάς μου δεν βρίσκω λόγια για να εκφράσω την απέραντη ευγνωμοσύνη, που νιώθω.

## Βιογραφικό σημείωμα υποψήφιου διδάκτορος ΜΕΝΕΛΑΟΥ Κ. ΛΥΓΝΟΥ

### I. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΕΩΣ:** 19 Ιανουαρίου 1975  
**ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ:** ΛΥΓΝΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ  
**ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ:** ΑΓΑΜΟΣ  
**ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ:** ΑΝΤΙΓΟΝΗΣ 20 ΒΟΥΛΙΑΓΜΕΝΗ, τ.κ. 166 71, ΑΤΤΙΚΗ  
**ΤΗΛΕΦΩΝΟ** οικία: (210) 89.63.874 & (210) 89.63.155  
**κινητό:** 6944.53.11.11  
**E-MAIL:** drmelymd@yahoo.gr

### II. ΣΤΟΧΟΣ

Η εξειδίκευσή μου στη Μαιευτική και Γυναικολογία

### III. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Χρονολογίες	Εκπαιδευτικό Ίδρυμα	Περιγραφή
1999	Πανεπιστήμιο "Tor Vergata", Ρώμη, ΙΤΑΛΙΑ	Πτυχίο Ιατρικής (βαθμός 103/110)
1992	ΕΛΛΗΝΟ-ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΚΟΛΛΕΓΙΟ ΑΘΗΝΩΝ)	ΑΠΟΛΥΤΗΡΙΟ ΛΥΚΕΙΟΥ (βαθμός 18/20)

### IV. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Χρονολογίες	Εκπαιδευτικό Ίδρυμα
20.03.2002-19.12.2002	Ειδικευόμενος ιατρός στη Γενική Χειρουργική στο Γενικό Νοσοκομείο Ασκληπιείο Βούλας, Αττικής.
19.02.2001-18.02.2002	Υπηρεσία Υπαίθρου στο ΠΙ Άσκρης Βοιωτίας και στο ΚΥ Αλιάρτου
17.11.2000-16.02.2001	Τρίμηνη εκπαίδευση ιατρού υπόχρεου υπηρεσίας υπαίθρου στο Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Λειβαδιάς

### V. ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Χρονολογία	Τίτλος
1999	Πτυχιακή Εργασία με τίτλο: «Κλινική-Επιδημιολογική μελέτη στον επιπολασμό Μυοσκελετικών διαταραχών της σπονδυλικής στήλης και οσφυαλγία στους οδηγούς μέσω μαζικής μεταφοράς»
2002	Ανακοινώσεις στο 23 <sup>ο</sup> Ελληνικό Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, Αθήνα, Νοέμβριος «Καθορισμός συνοδών τραυμάτων των καταγμάτων πρώτης και δεύτερης πλευράς». Π. Δασκαλάκης, Α. Σταθουλόπουλος, Ε. Φανδρίδης, Ε. Παυλάκης, Α. Γεράνιος, Ν. Ψαλίδας, Β. Φίλιας, <b>Μ. Λυγνός</b> , Π. Τσατσούλης. Δημοσιευμένο στο «Εξελίξεις στη χειρουργική 2002». Εκδότης Ε. Χατζηγιαννάκης, Εκδόσεις Σύνεδρον, Αθήνα 2002.

### VI. ΑΛΛΑ ΠΡΟΣΟΝΤΑ

<b>Γλωσσομάθεια</b>	Ευχέρεια στα <b>Αγγλικά</b> (University of Cambridge Certificate of Proficiency in English), <b>Ιταλικά</b> και <b>Γαλλικά</b> .
<b>Χρήση ΗΥ</b>	Γνώση επεξεργασίας κειμένου (WORD), επεξεργασίας δεδομένων (EXCELL), παρουσίας μέσω υπολογιστού (PowerPoint) και χρήσης του διαδικτύου

### VII. ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Ανάγνωση λογοτεχνικών βιβλίων και ιστορικών συγγραμμάτων, κολύμβηση, αντισφαίριση, ταξίδια

# Περιεχόμενα

	<b>Σελίδα</b>
<b>Συντμήσεις</b>	7
<b>Περίληψη</b>	9
<b>Περίληψη στην Αγγλική (Abstract)</b>	10
<b>Μέρος Πρώτο: Εισαγωγή</b>	11
1.1. Ο Αγγειακός Αυξητικός παράγοντας των Ενδοθηλίων (Vascular Endothelial Growth Factor/ VEGF)	11
1.1.1. Εισαγωγή	11
1.1.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες	11
1.1.3. Παραγωγή του VEGF	12
1.1.4. Υποδοχείς	13
1.1.5. Οι κυριότερες βιολογικές δράσεις του VEGF	13
1.1.6. Ο VEGF και η κύηση	14
1.2. Βασικός Αυξητικός Παράγοντας των Ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor / bFGF ή FGF – 2)	16
1.2.1. Εισαγωγή	16
1.2.2. Δομή	16
1.2.3. Υποδοχείς	17
1.2.4. Οι κυριότερες δράσεις του bFGF	17
1.2.5. Ο bFGF και η εγκυμοσύνη	18
1.3. Ενδοθηλίνη-1 (Endothelin-1/ ET-1)	21
1.3.1. Εισαγωγή	21
1.3.2. Βιοσύνθεση	22
1.3.3. Υποδοχείς και δράση	24
1.3.4. Η ET-1 και η κύηση	25

	<b>Σελίδα</b>
1.4. Ο Προκαλών νεοπλασματική εξαλλαγή Αυξητικός Παράγων β <sub>1</sub> (Transforming Growth Factor-β <sub>1</sub> / TGF-β <sub>1</sub> )	27
1.4.1. Εισαγωγή	27
1.4.2. Οι κυριότερες δράσεις του TGF-β <sub>1</sub>	28
1.4.3. Η λανθάνουσα κατάσταση του TGF-β <sub>1</sub>	28
1.4.4. Υποδοχείς του TGF-β <sub>1</sub>	31
1.4.5. Ο TGF-β <sub>1</sub> και η κύηση	31
1.5. Ο Διαλυτός Συνδέτης του c-kit (soluble c-kit Ligand/sKL)	33
1.5.1. Εισαγωγή	33
1.5.2. Η παραγωγή του sKL	34
1.5.3. Υποδοχείς και δράσεις	35
1.5.4. Ο sKL και η εγκυμοσύνη	35
1.6. Σκοπός της μελέτης	37
<b>Μέρος Δεύτερο: Ασθενείς, Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>38</b>
2.1. Ασθενείς	38
2.2. Υλικά-Αιμοληψία	40
2.3. Μέθοδοι	41
2.3.1. Μετρήσεις Αιματολογικών και Βιοχημικών Παραμέτρων	41
2.3.2. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου ELISA	41
2.3.3. Μέτρηση των κυτταροκινών στο πλάσμα	44
2.3.3.1. Μέτρηση του VEGF	44
2.3.3.2. Μέτρηση του bFGF	44
2.3.3.3. Μέτρηση της ET-1	44
2.3.3.4. Μέτρηση του TGF-β <sub>1</sub>	44
2.3.3.5. Μέτρηση του sKL	45
2.4. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	45



	<b>Σελίδα</b>
<b>Μέρος Τρίτο: Αποτελέσματα</b>	46
<b>3.1.</b> Τα επίπεδα των κυτταροκινών σε κήσεις ελεύθερες επιπλοκών	46
<b>3.1.1.</b> Τα επίπεδα του VEGF	46
<b>3.1.2.</b> Τα επίπεδα του bFGF	48
<b>3.1.3.</b> Τα επίπεδα της ET-1	51
<b>3.1.4.</b> Τα επίπεδα του TGF-β <sub>1</sub>	54
<b>3.1.5.</b> Τα επίπεδα του sKL	56
<b>3.2.</b> Επίπεδα κυτταροκινών στο πλάσμα σε εγκυμοσύνες με Υπέρταση Κύησης.	56
<b>3.3.</b> Επίπεδα κυτταροκινών στο πλάσμα σε εγκυμοσύνες με Διαβήτη Κύησης.	58
<b>Μέρος Τέταρτο: Συζήτηση-Συμπεράσματα</b>	61
<b>4.1.</b> Φυσιολογική κύηση	61
<b>4.1.1.</b> Η παραγωγή του VEGF και του bFGF κατά την κύηση	61
<b>4.1.2.</b> Η ET-1 και φυσιολογική κύηση	65
<b>4.1.3.</b> Ο TGF-β <sub>1</sub> και η φυσιολογική κύηση	67
<b>4.1.4.</b> Ο sKL και η φυσιολογική κύηση	68
<b>4.2.</b> Υπέρταση Κύησης	68
<b>4.3.</b> Διαβήτης Κύησης	68
<b>4.4.</b> Τελικό Συμπέρασμα	69
<b>Βιβλιογραφία</b>	70

# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate (Τριφωσφορική Αδενοσίνη)
<b>bFGF</b>	basic Fibroblast Growth Factor (βασικός Αυξητικός Παράγων των Ινοβλαστών)
<b>BMI</b>	Body Mass Index (Δείκτης Σωματικής Μάζας)
<b>BMP</b>	Bone Morphogenic Proteins (Μορφογενετικές Πρωτεΐνες των Οστών)
<b>CFU-GM</b>	Colony Forming Units-Granulocytes Monocytes (Κόκκιο-και/ή Μονοκυτταρικές Αποικίες)
<b>DVR</b>	Decapentaplegic and Vegetable Related group
<b>ECE</b>	Endothelin Converting Enzyme (Ενζυμο-μετατροπέας των Ενδοθηλινών)
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor (Αυξητικός Παράγων της Επιδερμίδας)
<b>ET-1</b>	Endothelin-1 (Ενδοθηλίνη-1)
<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor (Υποδοχέας του FGF)
<b>Flt</b>	Fms-like tyrosine kinase (Κινάση της Τυροσίνης ομοιάζουσα με Fms)
<b>GDNF</b>	Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor (Νευροτροφικός Παράγων Προερχόμενος από Νευρογλιακά κύτταρα)
<b>HELLP</b>	Hemolysis, Elevated Liver enzymes, and Low Platelets (Αιμόλυση, Υψηλά ηπατικά ένζυμα, Χαμηλά Αιμοπετάλια)
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule-1 (Μόριο Διακυτταρικής Συγκόλλησης-1)
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor (Αυξητικός Παράγων ομοιάζων με την Ινσουλίνη)
<b>IL</b>	Intereukine (Ιντερλευκίνη)
<b>KDR</b>	Kinase Domain Region (Περιοχή με δράση κινάσης)
<b>KGF</b>	Keratinocyte Growth Factor (Αυξητικός Παράγων των Κερατινοκυττάρων)
<b>LAP</b>	Latency-Associated Peptide (Πεπτιδίο συσχετιζόμενο με τη λανθάνουσα κατάσταση)
<b>LTBP</b>	Latent TGF-β Binding Protein (Δεσμεύουσα τον λανθάνοντα TGF-β πρωτεΐνη)

<b>MMP-9</b>	Matrix Metalloproteinase-9 (μεταλλοπρωτεάση 9 της θεμέλιας ουσίας)
<b>mRNA</b>	messenger Ribonucleic Acid (Αγγελιαφόρο Ριβονουκλεϊκό Οξύ)
<b>NO</b>	Μονοξείδιο του Αζώτου
<b>onfFN</b>	Oncofetal Fibronectin (Ογκο-εμβρυϊκή Ινονεκτίνη)
<b>sKL</b>	soluble c-kit Ligand (Διαλυτός Συνδέτης του c-kit)
<b>TβR</b>	TGF-β Receptor (Υποδοχέας για τον TGF-β)
<b>TGF-β<sub>1</sub></b>	Transforming Growth Factor (Προκαλών νεοπλασματική εξαλλαγή Αυξητικός Παράγων β <sub>1</sub> )
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor (Παράγων προκαλών Νέκρωση των Όγκων)
<b>VACM-1</b>	Vascular Adhesion Cell Molecule-1 (Μόριο Προσκόλλησης των Κυττάρων στα Αγγεία-1)
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor (Αγγειακός Αυξητικός Παράγων των Ενδοθηλίων)

# Περίληψη

**Υπόβαθρο:** Ο Αγγειακός Αυξητικός Παράγων των Ενδοθηλίων (Vascular Endothelial Growth Factor/ VEGF), ο βασικός Αυξητικός Παράγων των Ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor/ bFGF), ο Προκαλών Νεοπλασματική Εξαλλαγή Αυξητικός Παράγων-β<sub>1</sub> (Transforming Growth Factor-β<sub>1</sub>/ TGF-β<sub>1</sub>), η Ενδοθηλίνη-1 (Endothelin-1/ ET-1) και ο Διαλυτός Συνδέτης του c-kit (Soluble c-kit ligand/ sKL) είναι κυτταροκίνες, που εμπλέκονται στην εμβρυογένεση.

**Υλικά και Μέθοδοι:** Τα επίπεδα των κυτταροκινών αυτών μετρήθηκαν στο πλάσμα 93 εγκύων σε όλα τα τρίμηνα της κύησης και την ημέρα του τοκετού με τη μέθοδο ELISA και στο πλάσμα 18 μη-εγκύων γυναικών αντίστοιχης ηλικίας, που αποτέλεσαν τους μάρτυρες.

**Αποτελέσματα:** Τα επίπεδα των VEGF και bFGF παρουσίασαν άνοδο κατά το πρώτο τρίμηνο και κάμψη στη συνέχεια, αλλά παρέμεναν ανώτερα από τα αντίστοιχα επίπεδα των μαρτύρων ακόμα και την ημέρα του τοκετού. Τα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub> παρουσίασαν άνοδο κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης και δεν παρουσίασαν περαιτέρω μεταβολές. Αντίθετα, τα επίπεδα της ET-1 παρουσίασαν πτώση και παρέμειναν χαμηλά ως και την ημέρα του τοκετού. Τα επίπεδα των VEGF, bFGF, TGF-β<sub>1</sub> και ET-1 εμφανίζονταν υψηλά στις κύσεις που εμφάνισαν υπέρταση. Εκτός από τα επίπεδα της ET-1, τα επίπεδα των κυτταροκινών αυτών παρουσιάζονταν υψηλά και στις κύσεις, που παρουσίασαν διαβήτη. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα του sKL.

**Συμπεράσματα:** Όλες οι προαναφερθείσες κυτταροκίνες έχουν θέση στις διαδικασίες της φυσιολογικής κύησης, ενώ η υπέρταση κύησης σχετίζεται με υψηλά επίπεδα ET-1.

## Περίληψη στην Αγγλική (Abstract)

**Background:** Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Transforming Growth Factor-beta<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>), Endothelin-1 (ET-1) and soluble c-kit ligand (sKL) are cytokines involved in embryogenesis.

**Materials and Methods:** Maternal plasma cytokines were measured with ELISA during the three trimesters of gestation and on the day of delivery in 93 pregnant women and 18 age-matched non-pregnant control women.

**Results:** The VEGF and bFGF levels increased during the first trimester and declined thereafter, but they remained above the controls' values until delivery. The TGF-β<sub>1</sub> levels increased during the first trimester and remained unchanged thereafter. On the contrary, the ET-1 levels decreased and remained low until delivery. VEGF, bFGF, TGF-β<sub>1</sub> and ET-1 were increased in hypertensive pregnancy. Except for ET-1, these cytokines were also increased in gestational diabetes. No changes in plasma sKL were documented.

**Conclusion:** All the aforementioned cytokines play a role in uncomplicated pregnancy, whereas hypertensive pregnancy is causatively related with increased ET-1.

## Μέρος Πρώτο

# Εισαγωγή

### 1.1. Ο Αγγειακός Αυξητικός παράγοντας των Ενδοθηλίων (Vascular Endothelial Growth Factor/ VEGF)

**1.1.1. Εισαγωγή.** Ο σχηματισμός αγγείων είναι μία απαραίτητη διαδικασία τόσο κατά την εμβρυϊκή περίοδο, στην οργανογένεση και στην κυτταρική διαφοροποίηση [Hamilton et al, 1962; Gilbert, 1988], όσο και κατά την μετεμβρυϊκή περίοδο, στην ίαση τραυμάτων και στη συνολική αναπαραγωγική διαδικασία [Folkman & Klagsburn, 1987; Folkman et al, 1991].

Η αγγειογένεση εξάλλου εμπλέκεται και στην παθογένεση πολλών νοσολογικών οντοτήτων, όπως στις αμφιβλιστροειδοπάθειες, [Hartnett et al, 2003] τις αλλοιώσεις της ωχράς κηλίδας [Miller et al, 2003], τη γήρανση [Wang et al, 2004], τα νεοπλάσματα [Brugaloras & Kaelin, 2004; Ferrara et al, 2004; Kleespies et al, 2004], τη ρευματοειδή αρθρίτιδα [Han et al, 2004], την ψωρίαση [Bhushan et al, 1999] κ.α.

Η διαδικασία της αγγειογένεσης καθορίζεται από την παραγωγή πολλών παραγόντων, που ονομάζονται συλλήβδην παράγοντες αγγειογένεσης. Ένας από τους κυριότερους παράγοντες αγγειογένεσης είναι και ο VEGF.

**1.1.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες.** Ο VEGF είναι μία βασική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία απαντάται σε τέσσερις μορφές ανάλογα με τον αριθμό των αμινοξέων, που περιλαμβάνουν. Αυτές οι μορφές προέρχονται από το αυτό γονίδιο, που έχει εντοπιστεί στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος (6p21.3) [Vincenti et al, 1996]. Συγκεκριμένα, οι τέσσερις διαφορετικές μοριακές μορφές έχουν 121, 165, 189 και 206 αμινοξέα και ονομάζονται αντίστοιχα VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> και VEGF<sub>206</sub> και προκύπτουν με τη διαδικασία του «εναλλακτικού ματίσματος» (*alternative splicing*) [Keck et al, 1989; Leung et al, 1989; Houck et al, 1991; Tisher et al, 1991].

Ο VEGF<sub>165</sub> είναι η βασική μοριακή μορφή, που συναντάμε και παράγεται από διάφορα φυσιολογικά ή νεοπλασματικά κύτταρα και παρουσιάζεται υπό τη μορφήν «ομοδιμερούς» (*homodimer*), η οποία δεσμεύει την ηπαρίνη και έχει μήκος 45 kDa [Ferrara et al, 1992].

Οι VEGF<sub>189</sub> και VEGF<sub>121</sub> εμφανίζονται στην πλειοψηφία των κυττάρων, που εκφράζουν το γονίδιο του VEGF [Houck et al, 1991]. Αντίθετα ο VEGF<sub>206</sub> είναι μια σπάνια μορφή, που συναντάται μόνο στο ανθρώπινο εμβρυϊκό ηπατικό κύτταρο [Houck et al, 1991].

**1.1.3. Παραγωγή του VEGF.** Η παραγωγή του VEGF ρυθμίζεται στο επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου του. Οι παράγοντες, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF είναι οι παρακάτω:

(α) *Η τάση του οξυγόνου (υποξία).* Η έκφραση του mRNA του VEGF παρουσιάζει απότομη και αντιστρεπτή αύξηση μετά από έκθεση διαφόρων φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων σε περιβάλλον με χαμηλή τάση οξυγόνου [Brogi et al, 1994; Minchenko et al, 1994; Shweiki et al, 1994; Shima et al, 1995a, Shima et al 1995b;].

Φαίνεται πως η αύξηση της παραγωγής του VEGF σε συνθήκες υποξίας, δεν συνδέεται μόνο με την αύξηση της μεταγραφής, αλλά και με την αυξημένη σταθερότητα του mRNA του VEGF [Ikeda et al, 1995; Stein et al, 1995; Levy et al, 1996].

(β) *Κυτταροκίνες.* Οι κυτταροκίνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF, σχετίζονται με τον τύπο του κυττάρου πάνω στο οποίο δρουν. (**Πίνακας 1.1**).

**Πίνακας 1.1:** Κυτταροκίνες, που προάγουν την παραγωγή του VEGF

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗ	ΒΛΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Κερατινοκύτταρα	EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , KGF	Detmar et al, 1994; Frank et al, 1995
Κύτταρα γλοιοβλαστώματος	EGF	Goldman et al, 1993
Επιθηλιακά κύτταρα	TGF- $\beta$	Pertovaara et al, 1994
Ινοβλάστες	TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , PGE <sub>2</sub>	Ben-Av et al, 1995; Pertovaara et al, 1994
Λεία μυϊκά κύτταρα αορτής	IL-1 $\beta$	Li et al, 1995
Αρκετά είδη κυττάρων	IL-6	Cohen et al, 1996
Καρκινικά κύτταρα	IGF-1	Warren et al, 1996

(γ) *Κυτταρική διαφοροποίηση και νεοπλασματική εξαλλαγή*. Η διαφοροποίηση των κυττάρων φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF [Claffey et al, 1992], ενώ διάφορες μεταλλάξεις, που προκαλούν τη νεοπλασματική εξαλλαγή των κυττάρων, έχουν ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου του VEGF [Grugel et al, 1995; Mukhopadhyay et al, 1995; Rak et al, 1995; Gnarra et al, 1996; Pliopoulos et al, 1996; Siemeister et al, 1996].

**1.1.4. Υποδοχείς.** Δύο είδη υποδοχέων για τον VEGF έχουν εντοπισθεί. Ο **Flt-1** (*fms-like tyrosine kinase*) [de Vries et al, 1992] και ο **KDR** (*kinase domain region*) [Terman et al, 1992].

Η έκφραση των υποδοχέων του VEGF περιορίζεται κατά κύριο λόγο στο ενδοθήλιο των αγγείων. Η υποξία φαίνεται να αυξάνει την έκφραση των γονιδίων τους [Tuder et al, 1995; Li et al, 1996], ενώ οι TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α/ Παράγων Νέκρωσης των όγκων-α) [Patterson et al, 1996] και TGF-β (Transforming Growth Factor-β/ Προκαλών Νεοπλασματική Εξαλλαγή Παράγων-β) [Mandriota et al, 1996] την αναστέλλουν.

**1.1.5. Οι κυριότερες βιολογικές δράσεις του VEGF:**

(α). Επαγωγή του *πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων* [Connolly et al, 1989; Ferrara & Henzel, 1989; Keck et al, 1989; Leung et al, 1989; Plouet et al, 1989; Conn et al, 1990; Pepper et al, 1994; Ferrara & Davis-Smyth, 1997]. Η ονομασία VEGF επιλέχτηκε ακριβώς για να υποδηλώσει το στενό φάσμα κυτταρικών στόχων του αυξητικού αυτού παράγοντα [Ferrara & Henzel, 1989; Leung, 1989].

(β). Έχει διαπιστωθεί σε πειραματικό επίπεδο (*in vitro* και *in vivo* πειράματα), η *προαγωγή της αγγειογένεσης*, ενώ φαίνεται πως υπάρχει στον τομέα αυτό συνεργική δράση του με τον bFGF (basic Fibroblast Growth Factor/ Βασικός Αυξητικός Παράγων των Ινοβλαστών) [Leung et al, 1989; Pepper et al, 1992; Nicosia et al, 1994].

(γ). Η *εμπλοκή και στα στάδια, που προηγούνται αυτής καθεαυτής της αγγειογένεσης* [Mignatti et al, 1989], μέσω της ενεργοποίησης του συστήματος Ενεργοποιητού του Πλασμιγόνου-Πλασμίνης [Pepper et al, 1991; Unemori et al, 1992].

(δ). Η *αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων* και για το λόγο αυτόν ονομάζεται και Παράγων Διαπερατότητας των Αγγείων (*Vascular Permeability Factor/ VPF*)



[Senger et al, 1983; Dvorak et al, 1986; Dvorak et al, 1987; Connolly et al, 1989; Dvorak et al, 1995; Roberts & Palade, 1995; Roberts & Palade, 1997].

(ε). Η προαγωγή της έκφρασης *VACM-1* και *ICAM-1* στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων [Medler et al, 1996].

(στ). Προάγει το σχηματισμό κόκκιο-και/ή μονοκυτταρικών αποικιών (CFU-GM/ Colony Forming Units-Granulocytes Monocytes) *in vitro*. [Broxmeyer et al, 1995].

(ζ). Η αναστολή της ωρίμανσης των «κυττάρων αντιγόνο-παρουσιαστών» (*Antigen presenting Cells*), όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα, χωρίς ωστόσο να έχει καμία αξιωσημείωτη δράση στη λειτουργία των ώριμων κυττάρων [Gabrilovich et al, 1996].

(η). Η πρόκληση αγγειοδιαστολής και υπότασης μέσω της προαγωγής της παραγωγής NO (μονοξείδιο του αζώτου) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [Cuevas et al, 1991; Cuevas et al, 1996].

(θ). Συμμετέχει στις κυκλικές μεταβολές του γυναικείου γενετικού συστήματος, οι οποίες προετοιμάζουν τον οργανισμό για την έναρξη της διαδικασίας της κύησης. Συγκεκριμένα, συμμετέχει αφενός μεν στη ρύθμιση της δημιουργίας και της σταθεροποίησης αιμοφόρων αγγείων κατά τις φάσεις του σχηματισμού, της λύσης και της διάσωσης του ωχρού σωματίου [Wulff et al, 2000], αφετέρου δε στις κυκλικές μεταβολές του ενδομητρίου [Merduri et al, 2000].

(ι). Είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του νεφρικού σπειράματος [Ostendorf et al, 1999; Kim et al, 2000; Kang et al, 2001; Masuda et al, 2001].

(ια). Προκαλεί αγγειοσπασμό, όταν δρα στα ενδοθήλια [Brockelsby et al, 1999].

**1.1.6. Ο VEGF και η κύηση.** Ο VEGF εντοπίζεται στα κύτταρα της τροφοβλάστης από τις πρώτες κιόλας μέρες μετά την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου [Breier et al, 1992; Jakeman et al, 1993] και φαίνεται πως είναι σημαντικός για την **αγγειογένεση στον πλακούντα** [Fong et al, 1995; Shalabi et al, 1995; Carmeliet et al, 1996; Ferrara et al, 1996; Reynolds & Redmer, 2001].

Μελέτες σε ζώα έδειξαν πως η πρωτεΐνη του VEGF εντοπίζεται στο επιθήλιο του αμνιακού σάκου καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης, αλλά αύξηση της έκφρασης του παράγοντα αυτού παρατηρείται στις μεμβράνες, που περιβάλλουν το έμβryo όσο πλησιάζει η στιγμή του τοκετού. Επομένως παρουσιάζεται λογική ή υπόθεση πως ο

VEGF αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων, που βρίσκονται στις μεμβράνες αυτές και με τον τρόπο αυτό ίσως να συμμετέχει στη **ρύθμιση του όγκου του αμνιακού υγρού** [Bogic et al, 2000].

Ο VEGF έχει εμπλακεί στην **ανάπτυξη διαφόρων οργάνων** του εμβρύου. Από πειράματα σε έμβρυα ποντικού, προκύπτει πως ο VEGF εμπλέκεται στην ανάπτυξη της καρδιάς [Millauer et al, 1993; Quinn et al, 1993; Yamaguchi et al, 1993; Carmeliet et al, 1996; Ng et al, 2001], των αγγείων [Peters et al, 1993; Millauer et al, 1993; Quinn et al, 1993], των πνευμόνων [Carmeliet et al, 1996; Ng et al, 2001], του σκελετού [Zelzer et al, 2002] και του εγκεφάλου [Breier et al, 1992].

Ο VEGF έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη των πνευμόνων και στο ανθρώπινο έμβρυο. Αυτό βασίζεται στην παρατήρηση πως ο VEGF παρουσιάζει αυξημένη συγκέντρωση στους αναπτυσσόμενους πνεύμονες του ανθρώπινου εμβρύου, όπου εικάζεται πως κατευθύνει την ανάπτυξη των τριχοειδών αγγείων [Acarregui et al, 1999]. Εξάλλου, στο ανθρώπινο έμβρυο (16 – 22 εβδομάδες), το mRNA του VEGF εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και είναι σε μεγαλύτερη αφθονία, εκτός από τον πνεύμονα, στο νεφρό και στον σπλήνα [Shifren et al, 1994].

Έχει διατυπωθεί εξάλλου η υπόθεση πως τα επίπεδα VEGF στον ορό και στο πλάσμα του αίματος εγκύων, που παρουσίασαν προεκλαμψία παρουσιάζονται διαφοροποιημένα σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε εγκύους, των οποίων η κύηση ήταν ελεύθερη επιπλοκών. Εντούτοις, τα αποτελέσματα των σχετικών μελετών παρουσιάζονται αντιφατικά. Κάποιοι μελετητές διαπίστωσαν άνοδο των επιπέδων αυτών [Baker et al, 1995; Sharkley et al, 1996; Hunter et al, 2000; Bosio et al, 2001; Galazios et al, 2004], ενώ άλλοι ανέφεραν κάμψη τους [Lyll et al, 1997; Reuvekamp et al, 1999; Livingston et al, 2000].

Ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις έχουν γίνει στον άνθρωπο, και αφορούν τη σχέση που έχουν τα επίπεδα του VEGF και της υπέρτασης κύησης. Σε σχετικές μελέτες έχει διαφανεί το ότι η συγκέντρωση του VEGF στον ορό του αίματος σε έγκυες γυναίκες πάσχουσες από υπέρταση επαγόμενη από την εγκυμοσύνη παρουσιάζεται μειωμένη [Chen et al, 2000; Cheng et al, 2001; Yang et al, 2001].

## 1.2. Βασικός Αυξητικός Παράγοντας των Ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor / bFGF ή FGF-2)

**1.2.1. Εισαγωγή.** Κατά τα τελευταία χρόνια ήρθε στην επιφάνεια η οικογένεια των Αυξητικών Παραγόντων των Ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factors/FGFs), που εμπλέκονται στην αύξηση και στην αναγέννηση των μαλακών ιστών [Basilico & Moscatelli, 1992]. Μέχρι στιγμής περιλαμβάνει 18 μέλη, το καθένα από τα οποία παρουσιάζει κάποιο βαθμό ομολογίας σε πρωτεϊνικό επίπεδο με τα πρωτότυπα της γονιδιακής αυτής οικογενείας, δηλαδή με τους FGF-1 (όξινος-acidic/aFGF) και FGF-2 (βασικός-basic/bFGF) [Smallwood et al, 1996; Coulier et al, 1997; McWhirter et al, 1997; Hoshikawa et al, 1998; Miyake et al, 1998; Ohbayashi et al, 1998].

Όλοι τους φαίνεται πως δεσμεύονται από την ηπαρίνη και τη θειική ηπαρίνη καθώς και τις γλυκοζαμινογλυκάνες και παρουσιάζουν μεγάλες συγκεντρώσεις στη θεμέλια ουσία. Έτσι οι παράγοντες αυτοί έχουν αποκληθεί και «αυξητικοί παράγοντες δεσμευόμενοι από την ηπαρίνη» (heparin-binding growth factors/HBGF) [Burgess & Maciag, 1989; Rifkin & Moscatelli, 1989; Baird & Bohlen, 1990].

Η οικογένεια των παραγόντων αυτών αυξάνεται συνεχώς, ενώ αυξάνονται και η λειτουργίες, που αποδίδονται στα μέλη του. Σήμερα εξάλλου, στους παράγοντες αυτούς αποδίδονται και ογκογόνες δραστηριότητες.

**1.2.2. Δομή.** Ο bFGF είναι μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από 155 αμινοξέα [Abraham et al, 1986a; Abraham et al, 1986b], εντούτοις έχουν εντοπισθεί σε καλλιέργειες διαφόρων κυτταρικών τύπων τόσο κοντύτερες, όσο και μακρύτερες μορφές [Gospodarowicz et al, 1986; Klagsbrun et al, 1987; Moscatelli et al, 1987; Sommer et al, 1987; Story et al, 1987; Presta et al, 1988; Presta et al, 1989; Brigstock et al, 1990]. Οι κοντύτερες μορφές προέρχονται από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της μορφής 155 αμινοξέων [Klagsbrun et al, 1987]. Οι μακρύτερες μορφές, με μοριακό βάρος 196, 201 και 210 αμινοξέων (Μορφές Υψηλού Μοριακού Βάρους-High Molecular Weight/HMW), προέρχονται από εναλλακτικά σημεία έναρξης της μετάφρασης του mRNA του bFGF [Florkiewicz et al, 1989; Prats et al, 1989; Vagner et al, 1995].

**1.2.3. Υποδοχείς.** Ο bFGF ασκεί τη δράση του μέσω των υποδοχέων του, οι οποίοι κατατάσσονται σε τέσσερις κύριες οικογένειες: **FGFR1** (flg), **FGFR2** (bek), **FGFR3** και **FGFR4** [Basilico & Moscatelli, 1992; Party et al, 1995].

Ο bFGF μπορεί να είναι συνδεδεμένος με τη θεμέλια ουσία [Tassis et al, 2001], από όπου απελευθερώνεται με τη βοήθεια ηπαρινασών ή άλλων ενζύμων [Bashkin et al, 1989; Saksela & Rifkin, 1990; Buczek-Thomas & Nugent, 1999] ή με τη βοήθεια μίας «πρωτεΐνης-συνοδού» (*chaperone protein*) [Tassis et al, 2001]. Στο αίμα ο bFGF βρίσκεται συνδεδεμένος με την  $\alpha_2$ -μακροσφαιρίνη ή με μία «κόλουρη» (*truncated*) μορφή του FGFR1 [Dennis et al, 1989; Hanneken et al, 1994].

**1.2.4. Οι κυριότερες δράσεις του bFGF.** Ο bFGF παρουσιάζει σημαντικές λειτουργίες όσον αφορά την ανάπτυξη και τη λειτουργία ενός πλήθους οργάνων

(α). Ο bFGF είναι έχει σημαντική θέση στην *διαδικασία της αγγειογένεσης*, όπου προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* [Basilico & Moscatelli, 1992]. Ο bFGF ρυθμίζει την έκφραση αρκετών μορίων, που είναι σημαντικά για την αγγειογένεση [Montesano, 1992; Klein et al, 1993; Mignatti & Rifkin, 1993].

(β). Ο bFGF έχει επίδραση και στο *τοιχώμα των αγγείων*. Ο παράγον αυτός προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων [Schwartz & Liaw, 1993]. Επιπροσθέτως έχουμε αύξηση στη σύνθεση των mRNAs των bFGF και FGFR1 στην περιοχή των αθηρωσκληρωτικών αρτηριών και η αύξηση της έκφρασης του mRNA συσχετίζεται με τη νέο-αγγείωση στην αθηρωματική βλάβη [Hughes et al, 1993].

Η συστηματική χορήγηση bFGF σε αρουραίους προκαλεί πτώση της αρτηριακής πίεσης. Αυτή η υποτασική δράση του οφείλεται στην πρόκληση της σύνθεσης NO και/ ή διαύλων καλίου εξαρτώμενων από το ATP στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επομένως ο bFGF ίσως να είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και θα μπορούσε να βοηθήσει στη θεραπεία της υπέρτασης [Bikfalvi et al, 1997]. Ο bFGF βελτιώνει τη λειτουργία του μυοκαρδίου στους πάσχοντες από χρόνια ισχαιμία χοίρους [Harada et al, 1994]. Η χορήγηση του bFGF στο επίπεδο της εσωτερικής στοιβάδας της αορτής, η οποία σταδιακά φράζει, έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ροής του αίματος και τη μείωση του μεγέθους του εμφράγματος.

(γ). Αρκετοί ερευνητές ανέφεραν πως τόσο ο aFGF όσο και ο bFGF συμμετέχουν στην *αιμοποίηση* [Bikfalvi & Han, 1994; Allouche & Bikfalvi, 1995].

(δ). Αν και έχει διαπιστωθεί πως ο bFGF προκαλεί *αύξηση στους νευρικούς ιστούς*, δεν έχουν αναφερθεί μετά βεβαιότητας άλλες συγκεκριμένες δράσεις του bFGF στο νευρικό σύστημα [Bikfalvi et al, 1997].

(ε). Όσον αφορά το *δέρμα*, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των μελανοκυττάρων εξαρτάται από τον bFGF [Halaban et al, 1992], ενώ πολλά είναι τα πειραματικά δεδομένα, τα οποία συνηγορούν υπέρ της ενεργού συμμετοχής του στην επούλωση των τραυμάτων [Chen et al, 1992; Pierce et al, 1992; Tsuboi et al, 1992; Albertson et al, 1993; Legrand et al, 1993; Phillips et al, 1993].

(στ). Όσον αφορά τη δράση του bFGF *στο πεπτικό σύστημα*, έχει διαπιστωθεί πως προκαλεί τον πολλαπλασιασμό αρκετών σειρών επιθηλιακών κυττάρων [Dignas et al, 1994]. Ενώ φαίνεται πως εμπλέκεται και στην επούλωση του πεπτικού έλκους [Szabo et al, 1994; Bikfalvi et al, 1997].

(ζ). Ο bFGF έχει εμπλακεί και με την πρόκληση *νεοπλασματικής εξαλλαγής* [Vagner et al, 1996].

**1.2.5. Ο bFGF και η εγκυμοσύνη.** Ο bFGF φαίνεται πως στον ορό του αίματος της εγκύου, παρουσιάζεται συνδεδεμένος με μία πρωτεΐνη, η οποία ομοιάζει με το **εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα FGFR-1** [Hill et al, 1995a].

Παρατηρήσεις τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε πειραματόζωα μας έδωσαν στοιχεία σχετικά με την εμπλοκή του bFGF στην **ανάπτυξη διαφόρων συστημάτων του εμβρύου**.

Καταρχήν, έχει από παρατηρήσεις σε ανθρώπινα έμβρυα, που προήλθαν από θεραπευτική έκτρωση, προκύψει πως έχουμε αύξηση της έκφρασης του mRNA του bFGF και του υποδοχέα του τόσο στις ωθήκες, όσο και στη μήτρα του εμβρύου [Yeh et al, 1993]. Παρόμοιες παρατηρήσεις σε έμβρυα πειραματόζωων [Gonzalez et al, 1990; Orr-Urtreger et al, 1991] δίνουν πρόσθετα στοιχεία υπέρ της σημασίας της εμπλοκής του bFGF στην ανάπτυξη του γενετικού συστήματος του εμβρύου. Ο bFGF όμως φαίνεται πως εμπλέκεται και στην ανάπτυξη των νεφρών. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξε μελέτη που έγινε πάνω σε έμβρυα αρουραίων από τον Perantoni και τους συνεργάτες του [Perantoni et al, 1995]. Εξάλλου, μελέτες σε ζώα και σε κύτταρα κατέδειξαν την

εμπλοκή του παράγοντα αυτού και στην ανάπτυξη τόσο του νευρικού συστήματος [Engel et al, 1992; Tropepe et al, 1999], όσο και των οστών του κρανίου [Sarkar et al, 2001], των δοντιών [Russo et al, 1998] και του οφθαλμού [Ishigooka et al, 1993; Faber et al, 2001].

Επιπλέον ο bFGF έχει εμπλακεί και στη **διαμόρφωση του πλακούντα** [Reynolds & Redmer, 2001].

Όσον αφορά τη σχέση του bFGF με την παθολογική κύηση, υψηλά επίπεδα του bFGF στον ορό του αίματος της εγκύου έχουν συσχετισθεί τόσο με την εμφάνιση **προεκλαμψίας** [Hohlagschwandtner et al, 2002], όσο και με την εμφάνιση **υπέρτασης κύησης** [Kurz et al, 2001].

Ο bFGF έχει συσχετισθεί και με τον **διαβήτη κύησης**. Σε πλακούντες προερχόμενους από πρόωρους τοκετούς, η παρουσία του bFGF είναι πολύ έντονη σε σχέση με την παρουσία του bFGF σε πλακούντες προερχόμενους από εγκυμοσύνες με φυσιολογική διάρκεια. Αντίθετα στους πλακούντες από εγκυμοσύνες με φυσιολογική διάρκεια, αλλά περιπεπλεγμένες από σακχαρώδη διαβήτη τύπου I της μητέρας, η έντονη παρουσία του bFGF διατηρείται [Hill et al, 1997]. Επίσης έχει διαπιστωθεί πως η έκφραση του mRNA του bFGF στον πλακούντα κύησης, στις οποίες έχει διαπιστωθεί διαβήτης είναι αυξημένη [Di Blasio et al, 1997; Arany & Hill, 1998].

Η ποσότητα bFGF που ανιχνεύεται στον ορό της μητέρας στο δεύτερο τρίμηνο και στις αρχές του τρίτου τριμήνου στις εγκύους, που παρουσίαζαν διαβήτη πριν από την εγκυμοσύνη, είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές που εντοπίζονται σε εγκυμοσύνες χωρίς διαβήτη. Κατά τη φυσιολογική εγκυμοσύνη οι μέγιστες τιμές του bFGF στον ορό του αίματος της εγκύου παρουσιάζονται μεταξύ των εβδομάδων 28-31 [Hill et al, 1995a]. Οι αντίστοιχες μέγιστες τιμές στις εγκυμοσύνες, στις οποίες παρουσιάζεται διαβήτης εντοπίζονται μεταξύ των εβδομάδων 22-26 [Hill et al, 1995a].

Μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν σχετικά με την πιθανότητα συσχετισμού της αυξημένης παρουσίας του bFGF στις εγκυμοσύνες διαβητικών γυναικών με την πιθανή αυξημένη παραγωγή από τον πλακούντα. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις, που καθιστούν την υπόθεση αυτή αληθοφανή [Hill et al, 1995b].

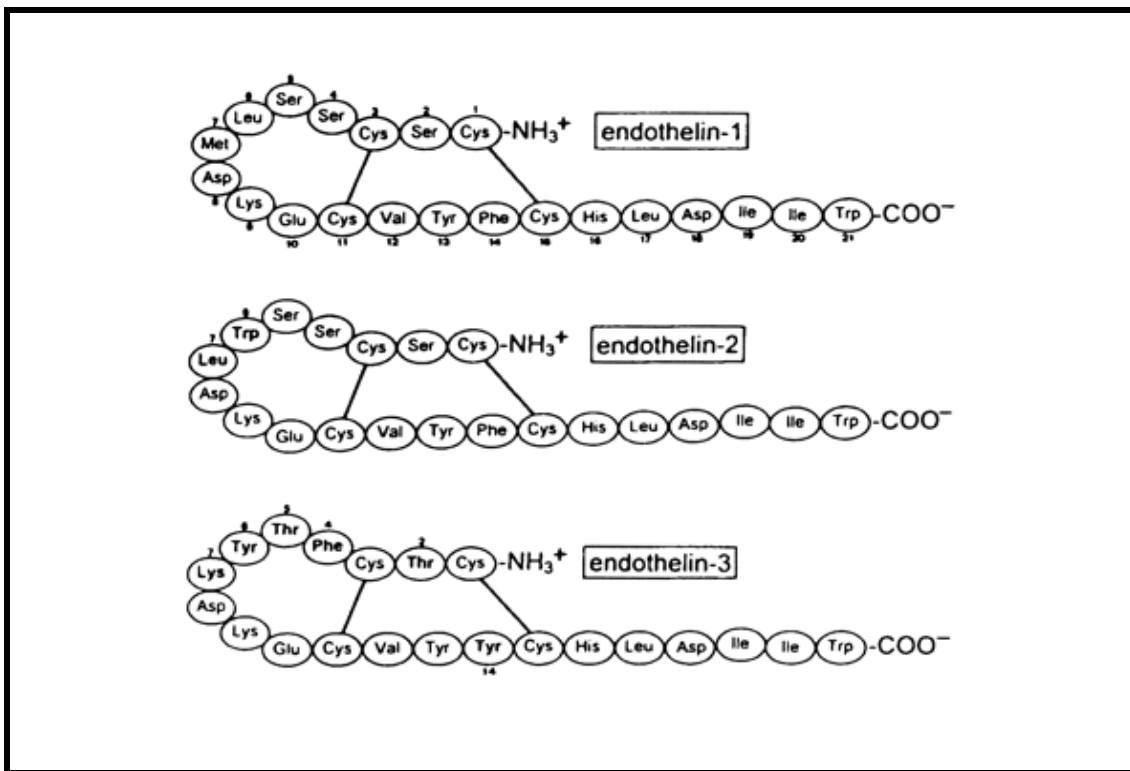
Αύξηση της παρουσίας του bFGF έχουμε και στον ορό του αίματος, που προέρχεται από τον ομφάλιο λώρο βρεφών, των οποίων η μητέρα είναι διαβητική. Μάλιστα στην περίπτωση αυτή η τιμή του bFGF παρουσιάζεται 2-4 φορές μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες, που παρατηρούνται στις εγκυμοσύνες χωρίς διαβήτη [Hill et al, 1995b]. Παράλληλα η αύξηση στις τιμές του bFGF στον ορό του αίματος του ομφαλίου λώρου παρουσιάζει μία κατ' αντιστοιχίαν αύξηση τόσο του μεγέθους του πλακούντα όσο και του βάρους του εμβρύου [Hill et al, 1995b].

### 1.3. Ενδοθηλίνη-1 (Endothelin-1/ ET-1)

**1.3.1. Εισαγωγή.** Η ET-1 είναι ένα πεπτιδίο αποτελούμενο από 21 αμινοξέα με δύο δισουλφιδικές γέφυρες να ενώνουν τις Κυστεΐνες στις θέσεις 1-15 και 3-11 (Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>15</sup> και Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>11</sup>) [Mateo & de Artinano 1997; Luscher & Barton, 2000] (*Εικόνα 1.1*).

Μελέτες στο ανθρώπινο γονιδίωμα [Inoue et al, 1989] απέδειξαν την ύπαρξη άλλων δύο ενδοθηλινών, της Ενδοθηλίνης-2 (ET-2) και της Ενδοθηλίνης-3 (ET-3), οι οποίες έχουν παρόμοια δομή, αλλά διαφέρουν από την πρώτη ενδοθηλίνη κατά δύο και έξι αμινοξέα αντιστοίχως (*Εικόνα 1.1*).

**Εικόνα 1.1:** Η δομή των Ενδοθηλινών [Mateo & de Artinano 1997]



Η ET-1 απομονώθηκε καταρχήν από το ενδοθήλιο, αλλά εκφράζεται και σε ιστούς μη αγγειακούς, όπως είναι ο εγκέφαλος, το νεφρό, ο πνεύμονας και άλλοι [Sakurai et al, 1991]. Οι ET-2 και ET-3 μπορούν να εντοπισθούν σε άλλους ιστούς, όπως είναι το έντερο, το επινεφρίδιο και ο εγκέφαλος. Η ET-3 παρουσιάζεται σχετικά άφθονη



σε νευρωνικούς ιστούς και πιστεύεται πως είναι η «νευρωνική» (neuronal) μορφή των ενδοθηλινών [Bloch et al, 1989; Ohkubo et al, 1990; Shiba et al, 1992].

Οι ET εμπλέκονται στο μηχανισμό παθογένεσης αρκετών παθολογικών καταστάσεων. Υπάρχουν σήμερα δεδομένα, που οδηγούν στη διατύπωση της υπόθεσης της συμμετοχής των ET στο μηχανισμό πρόκλησης παρατεταμένης αγγειοσυστολής, που παρατηρείται τόσο στην υπέρταση, που προκαλείται από όγκους που παράγουν ET-1 [Yokokawa et al, 1991], όσο και στην ιδιοπαθή υπέρταση [Krum et al, 1998] και στην καρδιακή ανεπάρκεια [Kiowski et al, 1995; Sutsch et al, 1998]. Εξάλλου, τα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα παρουσιάζονται αυξημένα σε ασθενείς, που πάσχουν από ασταθή στηθάγχη [Kaski et al, 1995], στεφανιαία νόσο [Lerman et al, 1991] ή οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου [Stewart et al, 1991] και πνευμονική υπέρταση [Giaid et al, 1993].

**1.3.2. Βιοσύνθεση.** Η έκκριση της ET-1 ρυθμίζεται στο επίπεδο της σύνθεσης του πεπτιδίου.

- Ερεθίσματα που **επάγουν** τη βιοσύνθεση της ET-1 είναι τα εξής:
  1. Διάφορες κυτταροκίνες, ορμόνες και αυξητικοί παράγοντες (TGF- $\beta$ , aFGF, bFGF, EGF, Αδρεναλίνη) [Sugo et al, 2001]
  2. Αντιδιουρητική ορμόνη [Armstead et al, 1996]
  3. Αγγειοτενσίνη II [Ito et al, 1993; Sugo et al, 2001]
  4. Ινσουλίνη [Ferri et al, 1996]
  5. Αύξηση της πίεσης [Arai et al, 1995]
  6. Αφυδάτωση [Maeda et al, 1996]
  7. Ερυθροποιητίνη [Bode-Boger et al, 1996]
  8. Προσταγλανδίνες [Girsh et al, 1996]
  9. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη [Johnson et al, 1996]
  10. Υποξία [Rakugi et al, 1990]
- Ερεθίσματα που **αναστέλλουν** τη βιοσύνθεση της ET-1 είναι τα εξής:
  1. Οι αναστολείς της «εκ του ασβεστίου εξαρτώμενης κινάσης C των πρωτεϊνών» (*calcium – dependent protein kinase C/ C-PKC*) [Emori et al, 1991].

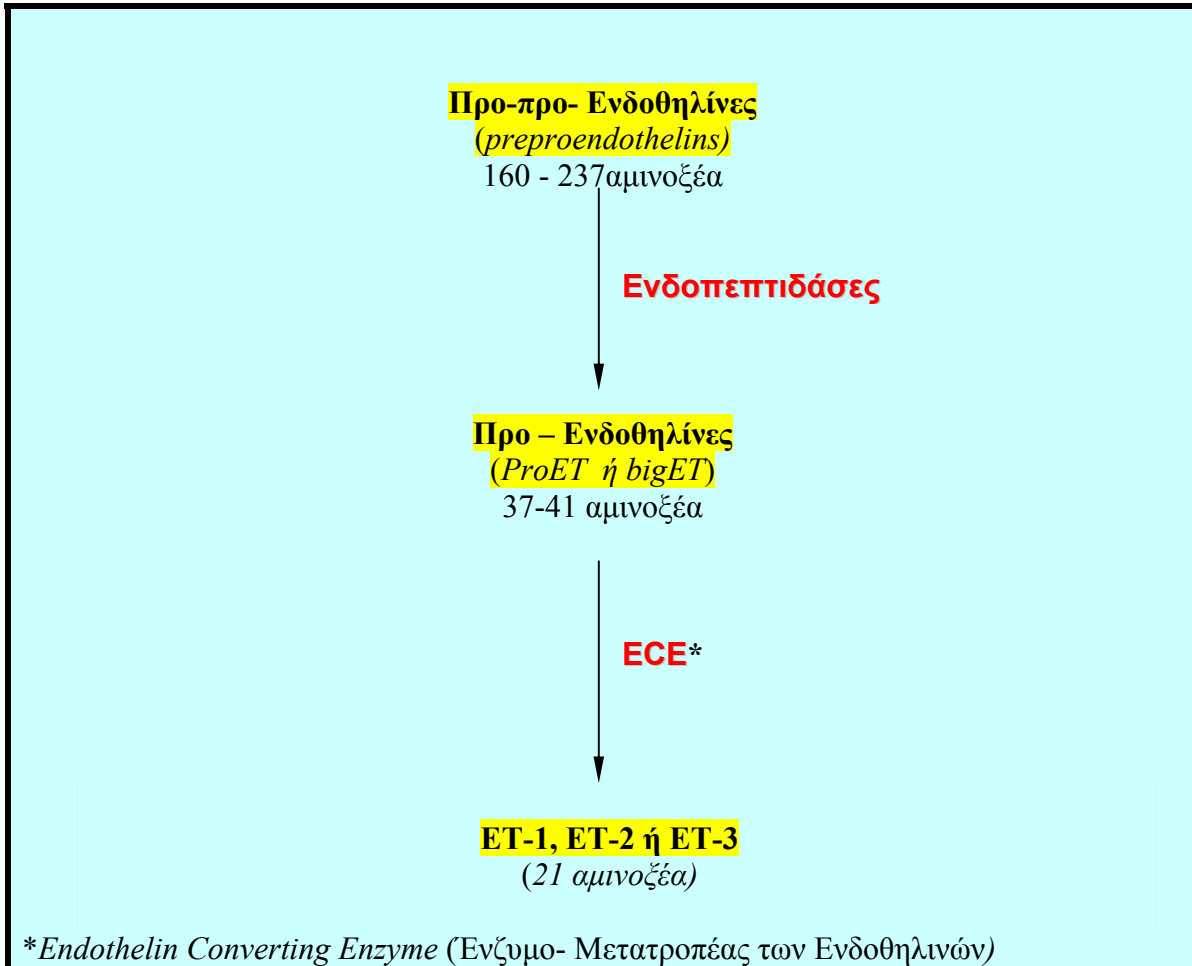
2. Το NO [Boulangier & Luscher, 1990; Luscher et al, 1992; Kourembanas et al, 1993]
3. Η προστακυκλίνη [Prins et al, 1994]
4. Τα νατριουριτικά πεπτίδια [Kohno et al, 1992a, Kohno et al, 1992b; Emori et al, 1993]
5. Η ηπαρίνη [Imai et al, 1993; Yokokawa et al, 1993]
6. Η αύξηση της ροής του αίματος [Griffith et al, 1988; Miller et al, 1992; Kuchan et al, 1993]
7. Η θρομβίνη και ο PDGF-BB [Sugo et al, 2001]
8. Τα οιστρογόνα [Bilsel et al, 2000; Webb et al, 2000; Heigl et al, 2002; Grande et al, 2002; Hong et al, 2004; Juan et al, 2004]

Οι ET συντίθενται από πρόδρομα μόρια γνωστά ως «προπροενδοθηλίνες» (*preproendothelins-preproET*), τα οποία αποτελούνται από 160 και 238 αμινοξέα. Η επεξεργασία των μορίων αυτών, θα καταλήξει στη δημιουργία πεπτιδίων αποτελούμενων από 21 αμινοξέα.

Τα πρόδρομα μόρια υποβάλλονται σε έναν ενδιάμεσο κατατεμαχισμό από ενδοπεπτιδάσες, από τον οποίον και προκύπτουν πεπτίδια αποτελούμενα από 37-41 αμινοξέα και ονομάζονται «προενδοθηλίνες» (*proendothelins-proET*) ή και «μεγάλες ενδοθηλίνες» (*big endothelins-big ET*). Από την επεξεργασία των μεγάλων ενδοθηλινών θα προκύψουν τελικά, χάρη στη δράση ενός ειδικού «ενζύμου-μετατροπέα για των ενδοθηλινών» (*specific endothelin converting enzyme-ECE*), τα ενεργά πεπτίδια μήκους 21 αμινοξέων [Mateo & de Artinano 1997; Luscher & Barton, 2000].

Η βιοσύνθεση των ET φαίνεται αναλυτικά στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 1.2**).

**Εικόνα 1.2:** Η βιοσύνθεση των ενδοθηλινών



**1.3.3. Υποδοχείς και δράση.** Η ET-1 δρα μέσω ειδικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί είναι ο ET<sub>A</sub> και ο ET<sub>B</sub>. Οι υποδοχείς αυτοί διαφέρουν όσον αφορά τις φαρμακολογικές του ιδιότητες, αλλά και όσον αφορά τον εντοπισμό τους αλλά και τη δράση τους [Hosoda et al, 1991; Sakamoto et al, 1991; Depuis et al, 1996; Mateo & de Artinano 1997; Luscher & Barton, 2000; Orphenorth et al, 2000; Katsutoshi, 2001;]. Τα στοιχεία σχετικά με τους υποδοχείς των ET συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 1.2**).

Πίνακας 1.2: Οι υποδοχείς της ET – 1

	ET <sub>A</sub>	ET <sub>B</sub>	
<b>ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ</b>	ET-1>ET-2>ET-3 Επιλεκτικότητα για ET-1=1000 X ET-3	Δεν υπάρχει	Δεν υπάρχει
<b>ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ</b>	Στο λείο αγγειακό μυ	Στο ενδοθήλιο	Στο λείο αγγειακό μυ
<b>ΔΡΑΣΗ</b>	Αγγειοσυστολή	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Απελευθέρωση NO-Αγγειοδιαστολή</li> <li>• Απομάκρυνση ET-1 από την κυκλοφορία</li> </ul>	Αγγειοσυστολή

Εκτός από την αγγειοδιαστολή και την αγγειοσυστολή που προκαλεί, η ET-1 προάγει και τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων και τον ινοβλαστών. Αυτό οδηγεί σε δομικές αλλαγές του αγγειακού τοιχώματος [Hirata et al, 1989; Simson et al, 1989; Bobik et al, 1990; Golfman et al, 1993].

**1.3.4. Η ET-1 και η κύηση.** Μελέτες στον άνθρωπο [Heluy et al, 1995; Osada et al, 1997], αλλά και στους αρουραίους [Yallampalli & Garfield, 1997] κατέδειξαν πως η ET-1 προκαλεί αύξηση της συστατικότητας της μήτρας. Στις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε πως η ανταπόκριση της μήτρας στην ET-1 αυξάνεται πριν από τον τοκετό και για το λόγο αυτό διατυπώθηκε η υπόθεση πως η κυτταροκίνη αυτή είναι σημαντική τόσο για την έναρξη [Carbonne et al, 1998], όσο και για τη διατήρηση του τοκετού. Και οι δύο τύποι υποδοχέων των ενδοθηλινών, ο ET<sub>A</sub> και ο ET<sub>B</sub>, έχουν εντοπισθεί να συνυπάρχουν στους ιστούς του μυομητρίου του ανθρώπου, αλλά μόνο ο τύπος ET<sub>A</sub> παρουσιάζεται αυξημένος στο μυομήτριο της εγκύου [Osada et al, 1997; Honore' et al, 2000].

Έχει παρατηρηθεί πως η **προεκλαμψία** σχετίζεται με αύξηση της ET-1 τόσο στο πλάσμα [Roberts et al, 1989; Taylor et al, 1990; Dekker et al, 1991; Nova et al, 1991; Kraayenbrink et al, 1993; Sudo et al, 1993; Wolff et al, 1996], και στον ορό [Nishikawa

et al, 2000] του αίματος της εγκύου, όσο και στον πλακούντα [Takeji et al, 2000; Singh et al, 2001] και στο μυομήτριο [Saijo et al, 2001].

Επίσης η ET-1 έχει εμπλακεί και στην παθογένεση του **συνδρόμου HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, and Low Platelets-HELLP syndrome)** [Jones, 1998; Bussen et al, 1999]. Το σύνδρομο αυτό αποτελεί μία επικίνδυνη μορφή της προεκλαμψίας, που σχετίζεται με αλλοίωση πολλών οργάνων και συστημάτων και συμβαίνει στο 0,2-0,6% των κήσεων. Συνήθως παρουσιάζεται με έντονο κοιλιακό άλγος κατά την έναρξη της προεκλαμψίας και φαίνεται να προκαλείται αφενός από την ανεπαρκή αγγείωση του πλακούντα και αφετέρου από την ανισορροπία μεταξύ παραγόντων που προκαλούν αγγειοσυστολή και αυτών που προκαλούν αγγειοδιαστολή [Jones, 1998].

Όσον αφορά τη σχέση της ET-1 με την εμφάνιση **υπέρτασης κύησης**, έχει διαπιστωθεί αυξημένη συγκέντρωση ET-1 τόσο στο πλάσμα [Tong et al, 1999], όσο και στον ορό [Heimarh et al, 2002] του αίματος των εγκύων, που παρουσιάζουν την παθολογία αυτή.

## 1.4. Ο Προκαλών νεοπλασματική εξαλλαγή Αυξητικός Παράγων $\beta_1$ (Transforming Growth Factor- $\beta_1$ / TGF- $\beta_1$ )

**1.4.1. Εισαγωγή.** Οι TGF- $\beta$  είναι πρωτεΐνες και ανακαλύφθηκαν από τους De Larco και Todaro στα 1978. Αρχικά ονομάστηκαν «αυξητικοί παράγοντες του σαρκώματος» (*sarcoma growth factors*). Η ονομασία «*transforming growth factors*» υιοθετήθηκε αργότερα, διότι παρατηρήθηκε πως αυτά τα μόρια είχαν την ιδιότητα να προσδίδουν σε μη-μεταμορφωμένους ινοπλάστες χαρακτηριστικά κυττάρων, τα οποία είχαν υποστεί «νεοπλασματική μεταμόρφωση» (*neoplastic transformation*) [De Larco & Todaro, 1978; Roberts et al, 1980; Fortunel et al, 2000].

Ο TGF- $\beta_1$  ήταν το πρώτο μέλος της οικογένειας που ανακαλύφθηκε και αποτέλεσε το πρωτότυπο μόριο μιας οικογένειας μορίων, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 50 μέλη. Με βάση ομοιότητες στην αλληλουχία των βάσεων, τα ανήκοντα σε αυτήν την οικογένεια μόρια, κατατάχθηκαν σε τέσσερις «υπο-οικογένειες» (*subfamilies*). Αυτές οι υπο-οικογένειες περιλαμβάνουν: την οικογένεια των TGF- $\beta$  αυτών καθαυτών, την οικογένεια των GDNF, τις activins, την οικογένεια των DVR (*decapentaplegic and vegetable related group*), που συχνά αναφέρονται ως BMPs και διάφορα μέλη, που χαρακτηρίζονται ως «απέχοντα» (*distant members*) [Bottner et al, 2000] (**Πίνακας 1.4**).

### Πίνακας 1.3: Η Υπέρ-Οικογένεια (Superfamily) των TGF – $\beta$

	α. TGF $\beta_1$ (εκφράζεται σε ιστούς θηλαστικών)
	β. TGF $\beta_2$ (εκφράζεται σε ιστούς θηλαστικών)
<b>1. TGF<math>\beta</math></b>	γ. TGF $\beta_3$ (εκφράζεται σε ιστούς θηλαστικών)
	δ. TGF $\beta_4$ (εκφράζεται στο κοτόπουλο και στο <i>Xenopus</i> )
	ε. TGF $\beta_5$ (εκφράζεται στο κοτόπουλο και στο <i>Xenopus</i> )
<b>2. GDNF</b>	
<b>3. Activins</b>	
<b>4. DVR ή BMPs</b>	
<b>5. «Απέχοντα» μέλη</b>	

Φαίνεται πως οι TGF- $\beta$  εμπλέκονται και στην παθογένεση ενός πλήθους νοσολογικών καταστάσεων, όπως είναι ο καρκίνος [Reisenbichler et al, 1994; Bedossa et al, 1995; Markowitz et al, 1995; Horie et al, 1996; Lazzereschi et al, 1997; Kim et al, 1999 ] και η υπέρταση [Agrotis et al, 1995], αλλά και αυτοάνοσα νοσήματα και νοσήματα που προκαλούν ίνωση [Roberts, 1998].

#### **1.4.2. Οι κυριότερες δράσεις του TGF- $\beta_1$**

(α). Έχει σημαντική θέση στην *ρύθμιση της αιμοποίησης* [Roberts, 1998; Fortunel et al, 2000; Hu & Zuckerman, 2001].

(β). *Αναστολή του πολλαπλασιασμού* της πλειοψηφίας των επιθηλιακών κυττάρων [Roberts, 1998] και των κερατινοκυττάρων του δέρματος [Moses et al, 1991].

(γ). *Επάγωγή του πολλαπλασιασμού* των μεσεγχειματικών κυττάρων [Lawrence, 1996] και των λείων μυϊκών κυττάρων [Agrotis et al, 1995].

(δ). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν πως παρουσιάζει *προστατευτική δράση των νευρώνων*, απέναντι στην ισχαιμία [Docagne et al, 2003].

(ε). *Επαγωγή της παραγωγής μεσοκυττάριας ουσίας* από τα μεσεγχειματικά κύτταρα [Agrotis et al, 1995; Lawrence, 1996; Roberts, 1998].

(στ). Η *διατήρηση της ακεραιότητας του τοιχώματος των αγγείων* μέσω της δράσης του στα ενδοθηλιακά κύτταρα [Pepper, 1997].

(ζ). *Ανοσοκαταστολή* [Lawrence, 1996], συγκεκριμένα αναστολή της δράσης των λεμφοκυττάρων T, B και των μακροφάγων (Prud' homme & Piccirillo, 2000).

(η). *Χημειοταξία των ινοβλαστών* [Lawrence, 1996].

(θ). Επαγωγή της *παραγωγής κολλαγόνου* από τα λεία μυϊκά κύτταρα [Agrotis, 1995].

(ι). *Αναστολή της παραγωγής ισχυρών αγγειοδιασταλτικών ουσιών* [όπως το NO] και *επαγωγή αγγειοσυσταλτικών ουσιών* (όπως οι ενδοθηλίνες) [Perrella et al, 1998].

**1.4.3. Η λανθάνουσα κατάσταση του TGF- $\beta_1$ .** Ο όρος *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ) είναι, όπως είδαμε ένας γενικός όρος, που αναφέρεται σε πέντε αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι συσχετίζονται μεταξύ τους από δομικής πλευράς και εκκρίνονται κυρίως με τη μορφή ενός «λανθάνοντος συμπλέγματος» (*latent complex*) στους ζώντες οργανισμούς [Gleizes et al, 1997]. Όταν ο όρος «λανθάνουσα κατάσταση»

αναφέρεται σε μία κυτταροκίνη περιγράφει μία κατάσταση στην οποία ένα μόριο διατηρείται σε μία αντιστρέψιμη ανενεργό κατάσταση.

Η λανθάνουσα κατάσταση είναι ένας μηχανισμός ελέγχου της δραστηριότητας ενός αυξητικού παράγοντος. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η δράση της κυτταροκίνης έως τη μετατροπή της στην ενεργό μορφή, ενώ εξασφαλίζεται η κυκλοφορία της κυτταροκίνης μέχρι το κύτταρο στόχο.

Όπως τα περισσότερα μέλη της «υπερ-οικογένειας» (*superfamily*) των TGF-β [Massague, 1990], οι «ισομορφές» (*isoforms*) των TGF-β συντίθενται με τη μορφή «διμερών» (*dimeric*) προδρόμων πρωτεϊνών, οι οποίες διασπώνται κατά την έκκρισή τους, για να απελευθερώσουν ώριμες κυτταροκίνες. Εντούτοις, ο ώριμος TGF-β παραμένει συνδεδεμένος με το «προπεπτίδιο» (*propeptide*) χάρη σε μη ομοιοπολικούς δεσμούς, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό το λανθάνον σύμπλεγμα από το οποίο πρέπει ο TGF-β να απελευθερωθεί ώστε να ασκήσει τη βιολογική του δράση [Lawrence et al, 1991].

Το προπεπτίδιο αυτό ονομάζεται «πεπτίδιο συσχετιζόμενο με τη λανθάνουσα κατάσταση» (*latency-associated peptide/ LAP* ή  $\beta_1$ -LAP). Επιπροσθέτως, το LAP παρουσιάζεται συνδεδεμένο και με μόρια υδρογονανθράκων, οι οποίοι φαίνεται πως είναι σημαντικοί για τη διατήρηση της λανθάνουσας κατάστασης του TGF-β [Gleizes et al, 1997].

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες είναι δυνατόν να διασπασθεί ο δεσμός TGF –  $\beta$ /LAP είναι οι εξής [Gleizes et al, 1997]:

1. Η θέρμανση στους 80° C για 10 λεπτά
2. Το αλκαλικό ή το όξινο pH.
3. Η οξείδωση με «ελεύθερες χημικές ρίζες» (*free radicals*) και με «ενεργό οξυγόνο» (*reactive oxygen species*).
4. Η δράση κάποιας γλυκοσιδάσης.
5. Η δράση της «Θρομβοσπονδίνης – I» (*Trombospondin – I/ TSP – I*).

Το λανθάνον σύμπλεγμα TGF-β/LAP ενώνεται στη συνέχεια με τη «δεσμεύουσα τον λανθάνοντα TGF-β πρωτεΐνη» (*Latent TGF-β Binding Protein/ LTBP*) και

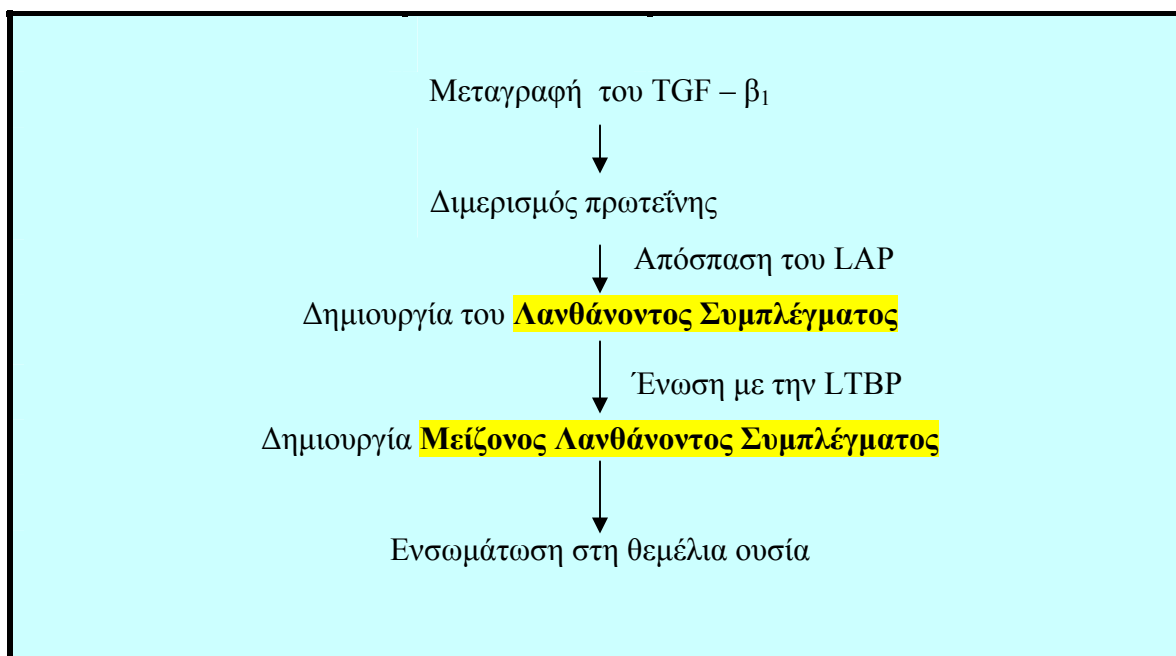


δημιουργείται με τον τρόπο αυτό το «Μείζον Λανθάνον Σύμπλεγμα του TGF-β» [Gleizes et al, 1997].

Η LTBP συμμετέχει στη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας του TGF-β<sub>1</sub> προκαλώντας την ενσωμάτωση του λανθάνοντος συμπλέγματος στη θεμέλια ουσία [Taipale et al, 1994].

Η σύνδεση της πρωτεΐνης αυτής με τη θεμέλια ουσία σταθεροποιείται με ομοιοπολικούς δεσμούς. Η συνδεδεμένη με τη θεμέλια ουσία LTBP ή το μείζον λανθάνον σύμπλεγμα απελευθερώνονται μετά από τη δράση πλασμίνης και άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων [Taipale et al, 1994; Taipale et al, 1995; Nunes et al, 1997]. Αν και η απελευθέρωση της LTBP ή του μείζονος λανθάνοντος συμπλέγματος από τη θεμέλια ουσία μετά από τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, δεν έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει και στους ζώντες οργανισμούς, ο μηχανισμός αυτός φαίνεται πως είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση του TGF-β. Επειδή υπάρχουν αρκετά είδη LTBP με συγκεκριμένη κατανομή στους διάφορους ιστούς, η βιοδιαθεσιμότητα των διαφόρων ισομορφών του TGF-β σε καθορισμένα όργανα, ίσως εν μέρει να ρυθμίζεται με το σχηματισμό διαφορετικών μείζονων λανθάνοντων συμπλεγμάτων [Gleizes et al, 1997] (*Εικόνα 1.3*).

**Εικόνα 1.3:** Η λανθάνουσα κατάσταση του TGF – β<sub>1</sub>



Αρκετές εργασίες μελέτησαν την ενεργοποίηση του λανθάνοντος TGF- $\beta$  σε διάφορα κυτταρικά συστήματα. Επί παραδείγματι, η δημιουργία του TGF- $\beta$  διεγείρεται από το ρετινοϊκό οξύ ή από τον bFGF σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων [Flaumenhaft et al, 1992; Kojima et al, 1993], το αυτό συμβαίνει και με την ενδοτοξίνη και τη μπλεομυκίνη και τα μακροφάγα [Nunes et al, 1995], τη βιταμίνη D3 και τα χονδροκύτταρα και τα γλυκοκορτικοειδή και τους οστεοβλαστες [Boulanger et al, 1995].

**1.4.4. Υποδοχείς του TGF- $\beta_1$ .** Έχουν ανακαλυφθεί τρεις πρωτεΐνες στην επιφάνεια του κυττάρου, με τις οποίες αλληλεπιδρά ο TGF- $\beta$ . Συγκεκριμένα έχουμε τον υποδοχέα τύπου I (T $\beta$ R-I/ 58kDa), τον υποδοχέα τύπου II (T $\beta$ R-II/ 70-100kDa) και τον υποδοχέα τύπου III (T $\beta$ R-III/ 200-400kDa) [Massague, 1990]. Ο T $\beta$ R-III δεν είναι απαραίτητος για τη μεταγωγή του σήματος, αλλά ίσως να είναι χρήσιμος στην παρουσίαση του συνδέτη (ligand) του TGF- $\beta$  στους T $\beta$ R-I και -II, οι οποίοι είναι και οι υπεύθυνοι για τη μεταγωγή του σήματος [Hu et al, 1998].

Για τη μεταγωγή του σήματος είναι αναγκαία η αλληλεπίδραση των υποδοχέων T $\beta$ R-I και T $\beta$ R-II μεταξύ τους και με κάποιες ειδικές πρωτεΐνες, που ονομάζονται Smads [Bottner et al, 2000].

**1.4.5. Ο TGF- $\beta_1$  και η κήση.** Φαίνεται πως ο TGF- $\beta_1$  εμπλέκεται στην εμφύτευση του εμβρύου [Chow et al, 2001]. Έχει παρατηρηθεί πως το έμβρυο παράγει TGF- $\beta_1$ , ο οποίος προκαλεί απόπτωση στο σημείο του ενδομητρίου, όπου πρόκειται να γίνει η εμφύτευση [Kamijo et al, 1998].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή του TGF- $\beta_1$  στη σύνθεση της «Ογκο-εμβρυϊκής Ινονεκτίνης» (*Oncofetal Fibronectin/ onfFN*). Η onfFN είναι μια συγκολλητική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια επαφής του πλακούντα και της μήτρας καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [Feinberg et al, 1991; Cunningham, 1993; Feinberg et al, 1993;]. Η πρωτεΐνη αυτή είναι απύσα από τη μήτρα στις έκτοπες κήσεις, αλλά παρούσα στα σημεία εμφύτευσης της έκτοπου τροφοβλάστης, κάτι που επιβεβαιώνει πως προέρχεται από την τροφοβλάστη. Η onfFN εντοπίζεται στην κυτοτροφοβλάστη ήδη από την 20<sup>η</sup> ημέρα μετά από τη σύλληψη. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, έχει διατυπωθεί η υπόθεση πως η πρωτεΐνη αυτή είναι σημαντική για την εμφύτευση του εμβρύου [Feinberg et al, 1991; Cunningham, 1993; Feinberg et al, 1993]. Με δεδομένα τα πειράματα *in vitro*, που αποδεικνύουν πως ο TGF-

$\beta_1$  είναι δυνατόν να προκαλέσει τη σύνθεση onfFN από καλλιεργούμενα κύτταρα τροφοβλάστης, φαίνεται πως ο TGF- $\beta_1$  είναι σημαντικός για την εμφύτευση του εμβρύου [Feinberg et al, 1994; Ando et al, 1998; Hennessy et al, 2002].

Όσον αφορά την επιρροή του TGF- $\beta_1$  **στη δημιουργία του αμνιακού σάκου**, ενδιαφέρον παρουσιάζει πείραμα, κατά το οποίο προκλήθηκε σε διαγονιδιακά (*transgenic*) ποντίκια η υπερέκφραση του παράγοντα αυτού [Agah et al, 2000]. Η υπερέκφραση του TGF- $\beta_1$  είχε ως αποτέλεσμα την ανώμαλη αγγειογένεση στον αμνιακό σάκο και πρόιμο θάνατο του εμβρύου. Η σημασία της δράσης του TGF- $\beta_1$  όσον αφορά την ορθή αγγείωση του αμνιακού σάκου διαπιστώνεται και από άλλες μελέτες, στις οποίες διακοπή της δράσης του TGF- $\beta_1$  είχε ως αποτέλεσμα ανωμαλίες στην αγγειογένεση στον αμνιακό σάκο [Dickson et al, 1995; Oshima et al, 1996; Li et al, 1999].

Ο TGF- $\beta_1$  όμως φαίνεται να είναι σημαντικός και για τη σωστή **ανάπτυξη** τόσο των πνευμόνων [Zhao et al, 1995; Zhou et al, 1996], όσο και άλλων **οργάνων**. Στα όργανα αυτά συμπεριλαμβάνονται το πάγκρεας, τα νεφρά [Liu et al, 1999] και η καρδιά [Engelman et al, 1994], ενώ σημαντική φαίνεται να είναι η συμβολή του TGF- $\beta_1$  στο σχηματισμό του κρανίου [Huneko et al, 2001] καθώς και στην ανάπτυξη του μυϊκού [McLennan et al, 2000] και του νευρικού [Tomoda et al, 1996] συστήματος.

Ένα από τα μυστήρια της κύησης είναι ο τρόπος, με τον οποίο επιτυγχάνεται η **καταστολή της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος** της μητέρας εναντίον του εμβρύου. Φαίνεται πως ο TGF- $\beta_1$ , που εντοπίζεται στο αίμα τόσο της εγκύου όσο και του εμβρύου εμπλέκεται στη ρύθμιση της αντίδρασης αυτής και είναι απαραίτητος για την διατήρηση της κύησης [Power et al, 2002; McLennan & Koishi, 2004].

Εξάλλου ο TGF- $\beta_1$  έχει συσχετισθεί και με παθολογικές καταστάσεις της κύησης. Υψηλά επίπεδα της κυτταροκίνης αυτής έχουν μετρηθεί στο πλάσμα εγκύων, που παρουσίασαν **προεκλαμψία** [Benian et al, 2002; Clausen et al, 2002], ενώ υψηλά επίπεδα της κυτταροκίνης αυτής στον ορό του έχουν καταμετρηθεί και σε περιπτώσεις με **υπέρταση κύησης** [Del Gobbo et al, 2000].

## 1.5. Ο Διαλυτός Συνδέτης του c-kit (*soluble c-kit Ligand/sKL*)

**1.5.1. Εισαγωγή.** Πρόκειται για ένα πολυπεπίδιο το γονίδιο του οποίου εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12 [Anderson et al, 1991; Geissler et al, 1991].

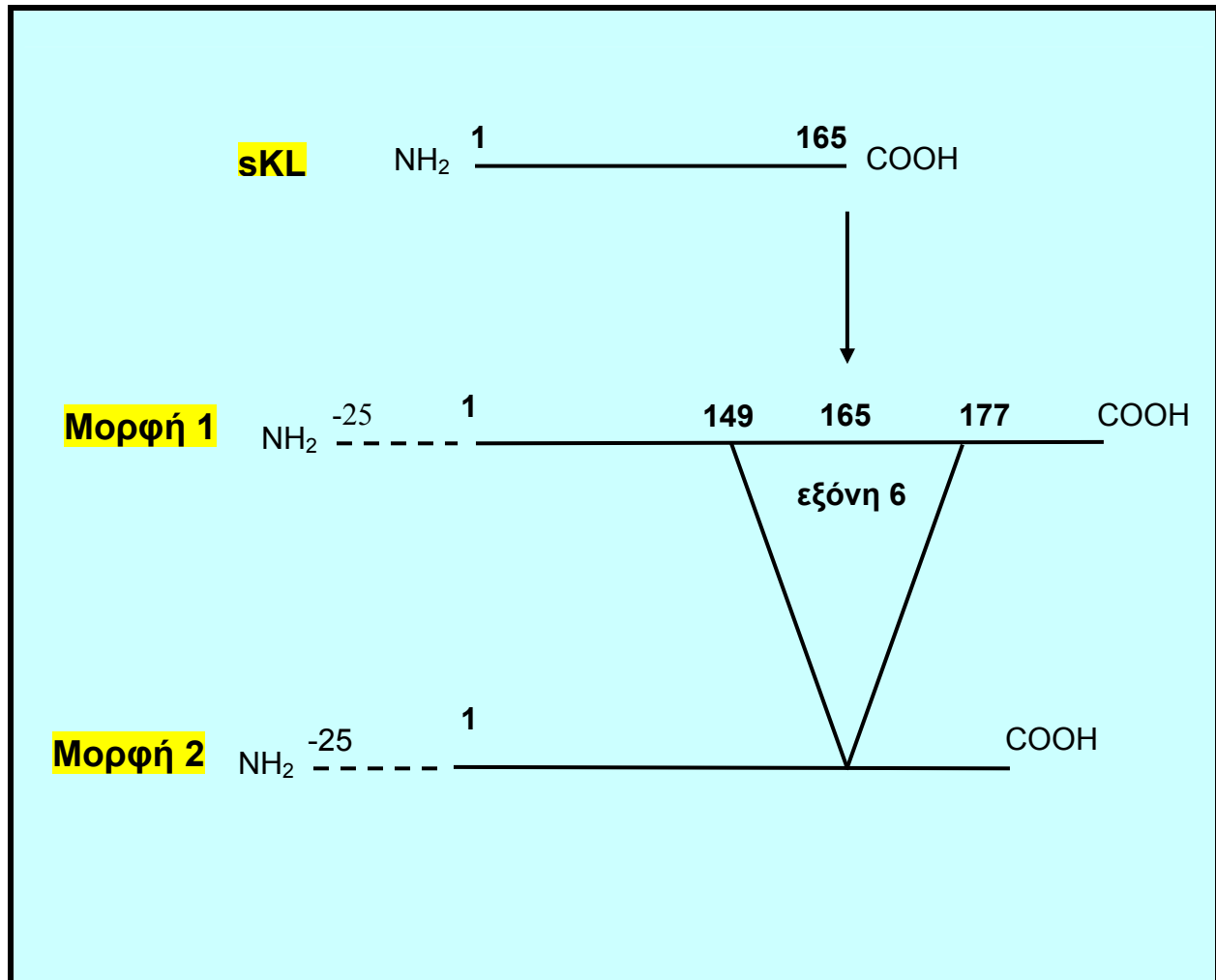
Υφίστανται δύο μορφές της διμεμβρανικής αυτής πρωτεΐνης, οι οποίες προκύπτουν από «εναλλακτικό μάτισμα» του mRNA [Anderson et al, 1991; Huang et al, 1992] και ο λόγος των mRNAs τους διαφέρει από ιστό σε ιστό [Huang et al, 1992; Huang et al, 1993]. Οι μηχανισμοί, που καθορίζουν την προκαθορισμένη αυτήν αναλογία σε κάθε ιστό [Huang et al, 1992] και σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης [Marziali et al, 1993] δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί.

Από τον κατατεμαχισμό των διαμεμβρανικών μορφών της πρωτεΐνης ή μετά από εναλλακτικό μάτισμα, προκύπτει η ενεργός διαλυτή μορφή της (**Εικόνα 1.4**) [Broudy, 1997; Lyman & Jacobsen, 1998]. Οι ρυθμιστικοί παράγοντες του κατατεμαχισμού αυτού φαίνεται πως διαφέρουν ανάλογα με τη διαμεμβρανική μορφή [Pandiella et al, 1992]. Ο κατατεμαχισμός του sKL στην επιφάνεια του κυττάρου φαίνεται πως προωθείται από την ενεργοποίηση της κινάσης της πρωτεασών ή παραγόντων, που αυξάνουν τη συγκέντρωση ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα [Huang et al, 1992]. Στη διαδικασία αυτή φαίνεται πως συμμετέχει η μεταλλοπρωτεάση 9 της θεμέλιας ουσίας (*matrix metalloproteinase-9/ MMP-9*) [Hollenbeck et al, 2004].

Ο sKL κυκλοφορεί με τη μορφή ομοδιμερούς, του οποίου τα μέρη είναι συνδεδεμένα με μη-ομοιοπολικό δεσμό και έχουν υποστεί γλυκοζιλίωση [Zsebo et al, 1990; Arakawa et al, 1991; Lu et al, 1991]. Το μοριακό του βάρος υπολογίζεται σε 18.5KDa [Broudy, 1997].

Ο sKL λαμβάνει μέρος και σε παθολογικές καταστάσεις, που σχετίζονται με τον μεσοθηλίωμα [Catalano et al, 2004], το μικροκυτταρικό καρκίνωμα των πνευμόνων [Matsuda et al, 1993], γυναικολογικούς όγκους [Inouo et al, 1994] και τον καρκίνο του μαστού [Pinos et al, 1995].

**Εικόνα 1.4:** Απεικονίζεται ο sKL και οι δύο διαμεμβρανικές μορφές του (μορφή 1 & 2), από τις οποίες προκύπτει η διαμεμβρανική μορφή. Στη βραχεία μορφή 2, η εξόνη 6 (αμινοξέα 149-177) αντικαθίσταται από μία γλυκίνη, η οποία βρίσκεται στη θέση 166. Ο τεμαχισμός του πολυπεπτιδίου, που οδηγεί στην παραγωγή του sKL, λαμβάνει χώρα μετά από την Αλανίνη στη θέση 165, επομένως και η δύο μορφές δίνουν μόνον έναν sKL [Broudy, 1997].



**1.5.2. Η παραγωγή του sKL.** Η παραγωγή του sKL εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες [Heinrich et al, 1993; Broudy et al, 1994; Linenberger et al, 1995], αλλά και στα κερατινοκύτταρα του φυσιολογικού δέρματος [Longley et al, 1993], στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου [Klimpel et al, 1995; Klimpel et al, 1996], καθώς και στις ωοθήκες τόσο του εμβρύου όσο και της ενήλικος [Abir et al, 2002]. Τα

ερεθίσματα, που επάγουν τη βιοσύνθεση της πρωτεΐνης αυτής είναι ουσιαστικά άγνωστα, ενώ η βιοσύνθεση αυτή αναστέλλεται από τον TGF-β<sub>1</sub> [Heinrich et al, 1995].

**1.5.3. Υποδοχείς και δράσεις.** Τόσο η διαλυτή, όσο και η διαμεμβρανικές μορφές του sKL είναι βιολογικά ενεργείς [Anderson et al, 1990; Toksoz et al, 1992]. Η διαλυτή και οι διαμεμβρανικές μορφές του sKL έχουν διακριτές αλλά αλληλοκαλυπτόμενες δράσεις. Έχει αποδειχθεί πως όσον αφορά τον ποντικό, η διαμεμβρανική μορφή παρουσιάζει πιο επίμονη ενεργοποίηση του ειδικού υποδοχέα, ενώ παράλληλα προωθεί και την παραμονή του στην επιφάνεια του κυττάρου σε μεγαλύτερο βαθμό από τη διαλυτή μορφή [Miyazawa et al, 1995].

Ο υποδοχέας του sKL ονομάζεται c-kit και ανήκει στην οικογένεια Τάξη II των κινασών της τυροσίνης [Yarden et al, 1987; Qiu et al, 1988]. Η αλληλεπίδραση του sKL με τον υποδοχέα του μπορεί να επιταχύνει την είσοδο των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο [Leary et al, 1992]. Η δράση του στα μαστοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της εκκριτικής τους λειτουργίας [Columbo et al, 1992; Wershmil et al, 1992]. Φαίνεται εξάλλου ότι ο sKL προωθεί την επιβίωση των πρώιμων αιμοποιητικών κυττάρων [Keller et al, 1995; Li & Johnson, 1995].

Ο sKL σε μερικές δεν δρα μόνος του, αλλά σε συνέργια με άλλες κυτταροκίνες, όπως ο GM-CSF [McNiece et al, 1991; Lennartsson et al, 2004] και η IL-3 [McNiece et al, 1991; Tanosaki et al, 1999]. Έχει τέλος παρατηρηθεί πως η δράση του sKL στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της ομφαλικής φλέβας, έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της επιβίωσης, μετανάστευσης και δημιουργίας τριχοειδών αγγείων [Matsui et al, 2004].

**1.5.4. Ο sKL και η εγκυμοσύνη.** Δεν είναι μεγάλος ο αριθμός των μελετών, που καταπιάστηκαν με την δράση του sKL κατά τη διάρκεια της κύησης. Η έκφρασή του έχει εντοπισθεί στο ανθρώπινο ενδομήτριο και στον πλακούντα και φαίνεται πως ο sKL συμμετέχει με τη δράση του στην ανάπτυξη της τροφοβλάστης [Kauma et al, 1996]. Η αλληλεπίδραση του sKL με τον υποδοχέα του, φαίνεται πως έχει εξέχουσα θέση στην ωρίμανση των αιμοποιητικών κυττάρων και των πρόδρομων γεννητικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου [Fleming et al, 1993; Abir et al, 2004]. Παράλληλα, αυξημένη συγκέντρωση sKL έχει παρατηρηθεί στον ομφάλιο λώρο, ενώ η αύξηση αυτή δεν φαίνεται να αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση του παράγοντα αυτού στο αίμα της

εγκύου [Savas et al, 1998]. Έχουν γίνει απόπειρες να συσχετισθούν τα επίπεδα του sKL στο υγρό του ωοθυλακίου με την πιθανότητα επιτυχίας εξωσωματικής γονιμοποίησης, αλλά τα αποτελέσματα των μελετών αυτών παρουσιάζονται αντιφατικά [Smikle et al, 1998; Hammadeh et al, 2004].

## 1.6. Σκοπός της μελέτης

Στην πλειοψηφία των μελετών, που καταπιάστηκαν με την αξιολόγηση των επιπέδων των κυτταροκινών αυτών στο πλάσμα της εγκύου, οι αντίστοιχες μετρήσεις έγιναν για μεμονωμένες κυτταροκίνες και σε συγκεκριμένες φάσεις της κύησης. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν καταφέραμε να βρούμε στοιχεία, που να αφορούν παράλληλες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης αυτών των κυτταροκινών καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης. Επομένως, ο σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν αφενός η καταγραφή των συγκεντρώσεων αυτών σε κάθε τρίμηνο της κύησης και την ημέρα του τοκετού, σε κύσεις, που δεν παρουσίασαν επιπλοκές, και αφετέρου η αναζήτηση πιθανής σχέσης μεταξύ των επιπέδων αυτών και της εμφάνισης υπέρτασης κύησης ή διαβήτη κύησης.



## Μέρος Δεύτερο

# Ασθενείς, Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Ασθενείς

Μελετήθηκαν 93 γυναίκες σε κύηση ηλικίας από 18 έως 40 ετών (διάμεση ηλικία 27 έτη). Οι γυναίκες αυτές κατατάχθηκαν σε τρεις ομάδες. Η Ομάδα I περιελάμβανε 77 γυναίκες κατά την κύηση των οποίων δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές, η Ομάδα II περιελάμβανε 9 γυναίκες, που παρουσίασαν υπέρταση κύησης και η Ομάδα III 7 γυναίκες, που παρουσίασαν διαβήτη κύησης.

Σε όλες τις περιπτώσεις ελήφθησαν υπόψη ο συνολικός αριθμός τοκετών, ο λόγος σωματικής μάζας (Body Mass Index-BMI), η συστολική και η διαστολική αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα γλυκόζης, κρεατινίνης και ινοδογόνου στο αίμα, η γενική αίματος, το βάρος του νεογνού, η παρουσία θυρεοειδίτιδος μετά τον τοκετό και η πιθανότητα υποβοηθούμενης γονιμοποίησης. Μεταξύ των γυναικών που εξετάστηκαν για την παρούσα έρευνα δεν παρατηρήθηκε καμία περίπτωση προεκλαμψίας, ενώ εξαιρέθηκαν περιπτώσεις, στις οποίες ο τοκετός επιτεύχθηκε με καισαρική τομή.

Οι γυναίκες, που ανήκαν στην Ομάδα I, κατατάχθηκαν σε τέσσερις υπό-ομάδες ανάλογα με το τρίμηνο της κύησης στο οποίο έγινε η αιμοληψία. Η υπο-ομάδα Α περιελάμβανε 11 γυναίκες, στις οποίες έγινε η αιμοληψία κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, η υπο-ομάδα Β περιελάμβανε 18 γυναίκες, στις οποίες έγινε η αιμοληψία κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης, η υπο-ομάδα Γ περιελάμβανε 39 γυναίκες, στις οποίες η αιμοληψία έγινε κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης και η υπο-ομάδα Δ περιελάμβανε 9 γυναίκες, στις οποίες η αιμοληψία έγινε κατά τη διάρκεια του τοκετού.

Οι γυναίκες, που ανήκαν στην Ομάδα II, αυτές δηλαδή που παρουσίασαν υπέρταση κύησης, εξετάστηκαν όλες κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης, ενώ στην

παρούσα μελέτη δεν περιελήφθησαν γυναίκες, που εμφάνισαν υπέρταση κύησης κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης.

Οι γυναίκες, που ανήκαν στην Ομάδα III, αυτές δηλαδή, που παρουσίασαν διαβήτη κύησης, εξετάστηκαν όλες κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης.

Ως υπέρταση κύησης ορίστηκε η μέτρηση συστολικής αρτηριακής πίεσης  $\geq 140$  mmHg, που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της κύησης, αλλά δεν συνδυάζονταν με πρωτεϊνουρία ή άλλες αλλοιώσεις στις εργαστηριακές εξετάσεις ή με αντικειμενικά συμπτώματα [Whitworth, 2003].

Εξ άλλου, Κατά την Επιτροπή Ορολογίας του Αμερικανικού Κολλεγίου Μαιευτήρων-Γυναικολόγων (American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Terminology) που συνήλθε το 1972 και της οποίας οι αποφάσεις αναθεωρήθηκαν από την Εν Ενεργεία Ομάδα του Εθνικού Προγράμματος για την Εκπαίδευση στην Υπέρταση (National High Blood Pressure Education Program Working Group) που συνήλθε το 2000, ως υπέρταση κύησης ορίστηκε η εμφάνιση υπέρτασης, άνευ πρωτεϊνουρίας μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης ή κατά τις πρώτες 24 ώρες της λοχείας [Danforth's Obstetrics and Gynecology, Lippincot Williams and Wilkins Ed, ninth edition, 2003 pp 257-8]. Για το λόγο αυτό δεν κρίθηκε σκόπιμη η καταγραφή της διακύμανσης των συγκεντρώσεων της ET-1 σε όλα τα τρίμηνα της κύησης στις περιπτώσεις που οι εγκυμονούσες εμφάνισαν υπέρταση, αντίθετα με ότι πράξαμε για τις κήσεις, που ήταν ελεύθερες επιπλοκών.

Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον ορισμό του διαβήτη κύησης ήταν αυτά που προτάθηκαν από τους Carpenter & Coustan το 1982. Συγκεκριμένα, ως διαβητικές χαρακτηρίζονταν όλες οι γυναίκες στο τρίτο τρίμηνο κύησης, που παρουσίαζαν τιμές γλυκόζης στο πλάσμα  $\geq 182$  mg/dl μία ώρα μετά από τη χορήγηση από στόματος 50 mg γλυκόζης. Οι γυναίκες, που παρουσίαζαν τιμές γλυκόζης πλάσματος από 135 έως 182 mg/dl στην ωριαία δοκιμασία χορήγησης 50 mg γλυκόζης και αυτές, που νήστις παρουσίαζαν τιμές γλυκόζης  $\geq 130$  mg υποβάλλονταν στην τρίωρη δοκιμασία χορήγησης 100 mg γλυκόζης από στόματος (**Πίνακας 2.1**). Όλες οι περιπτώσεις διαβήτη κύησης, στην παρούσα μελέτη αντιμετωπίστηκαν μόνο με δίαιτα.

**Πίνακας 2.1:** Όρια στην τρίωρη δοκιμασία χορήγησης 100 mg γλυκόζης.

Χρόνος (ώρες)	γλυκόζη πλάσματος (mg/dl)
Νήστις	95
1	180
2	155
3	140

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 18 μη-κυοφορούσες γυναίκες ηλικίας από 21 έως 30 ετών (διάμεση ηλικία 27 έτη), οι οποίες ανήκαν στο προσωπικό του εργαστηρίου. Οι γυναίκες αυτές πληρούσαν τα κάτωθι κριτήρια: (α) Αρνητικό ιστορικό για κακοήθεις όγκους, (β) Αρνητικό ιστορικό για ενδομητρίωση, (γ) Δεν ακολουθούσαν κύκλους ορμονικής θεραπείας για εξωσωματική γονιμοποίηση, (δ) Δεν είχαν στο ιστορικό τους μητρορραγία ή μηνορραγία, (ε) Δεν έπαιρναν αντισυλληπτικά φάρμακα, και (στ) Δεν είχαν ιστορικό πολυκυστικών ωοθηκών (ζ) δεν παρουσίαζαν χρόνιες νόσους.

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων ομάδων και υποομάδων των εγκύων ή μεταξύ των εγκύων και των μαρτύρων σε σχέση με την ηλικιακή τους κατανομή μετά από εφαρμογή της δοκιμασίας  $\chi^2$ .

Συγκατάθεση για τη μελέτη πάρθηκε από όλες τις εξετασθείσες γυναίκες, ασθενείς και μάρτυρες. Η μελέτη έγινε δεκτή από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου.

## 2.2. Υλικά-Αιμοληψία

Το φλεβικό αίμα συλλέγονταν κατευθείαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, μερικοί εκ των οποίων περιείχαν αντιπηκτική ουσία (EDTA-K<sub>3</sub>) και άλλοι όχι.

Το πλάσμα λαμβάνονταν σε αποστειρωμένες συνθήκες μετά από φυγοκέντριση μη πηχθέντος αίματος στις 2500 στροφές/λεπτό για 20 λεπτά, καταμερίζονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου Ependorff και αποθηκεύονταν στους -72°C μέχρι τη χρήση. Μετά την απόψυξη, το πλάσμα υπόκεινταν σε φυγοκέντριση στα 4000g για 20 λεπτά προκειμένου να εξαλειφθούν ίχνη πρωτεϊνικών σωματιδίων.

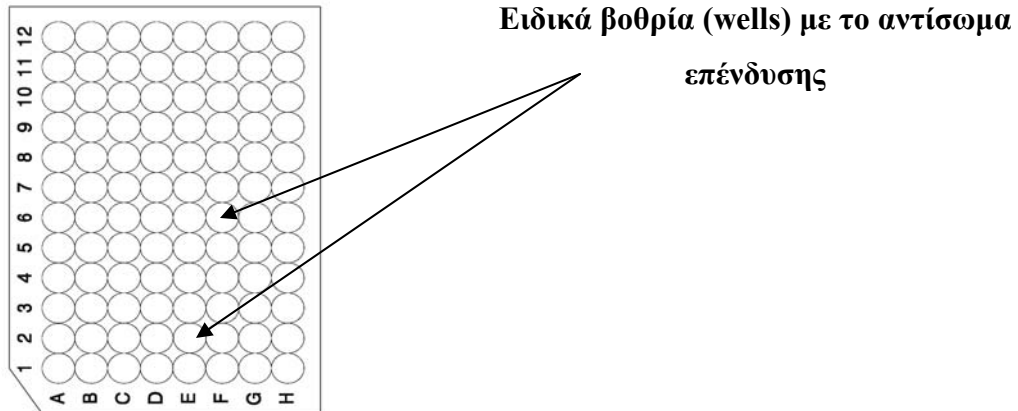
## 2.3. Μέθοδοι

**2.3.1. Μετρήσεις Αιματολογικών και Βιοχημικών Παραμέτρων.** Όλες οι εργαστηριακές μετρήσεις στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν στο κεντρικό Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου στα πλαίσια της παρακολούθησης των εγκύων. Η γενική αίματος πραγματοποιούνταν σε κυτταρομετρητή STKS Coulter (Coulter Electronics, UK) και οι τιμές εκφράζονταν ως απόλυτες τιμές κυττάρων σε  $\mu\text{l}$  αίματος. Οι μετρήσεις σακχάρου, κρεατινίνης και ινοδογόνου στο αίμα πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια των κοινών συμβατικών μεθόδων, που χρησιμοποιούνται στην κλινική πρακτική. Τα λευκώματα στα ούρα αναλύθηκαν με νεφρομετρία..

**2.3.2. Αρχή λειτουργίας της μεθόδου ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).** Υπάρχουν δύο τύποι ELISA, η «ELISA τύπου σάντουιτς» (*sandwich ELISA*) και η «ανταγωνιστική ELISA» (*competitive ELISA*). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μόνο η ELISA τύπου σάντουιτς (**Εικόνα 2.2**).

Στην ELISA τύπου σάντουιτς, που χρησιμοποιήθηκε εδώ, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (Αντίσωμα Επένδυσης-*Coating Antibody*), το οποίο αντιδρούσε με την ουσία τα επίπεδα της οποίας θέλαμε να μετρήσουμε (στην παρούσα μελέτη η ουσία αυτή ήταν κάποια κυτταροκίνη), επικολλούταν στην επιφάνεια ενός «βοθρίου» (*well*), που βρισκόταν σε έναν ειδικό δίσκο από πολυστυρένιο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι, που είχαν 12 στήλες αριθμημένες από το 1 έως το 12 και 8 γραμμές αριθμημένες από το A ως το H (**Εικόνα 2.1**).

**Εικόνα 2.1:** Δίσκος ELISA (από το εγχειρίδιο οδηγιών χρήσεως)

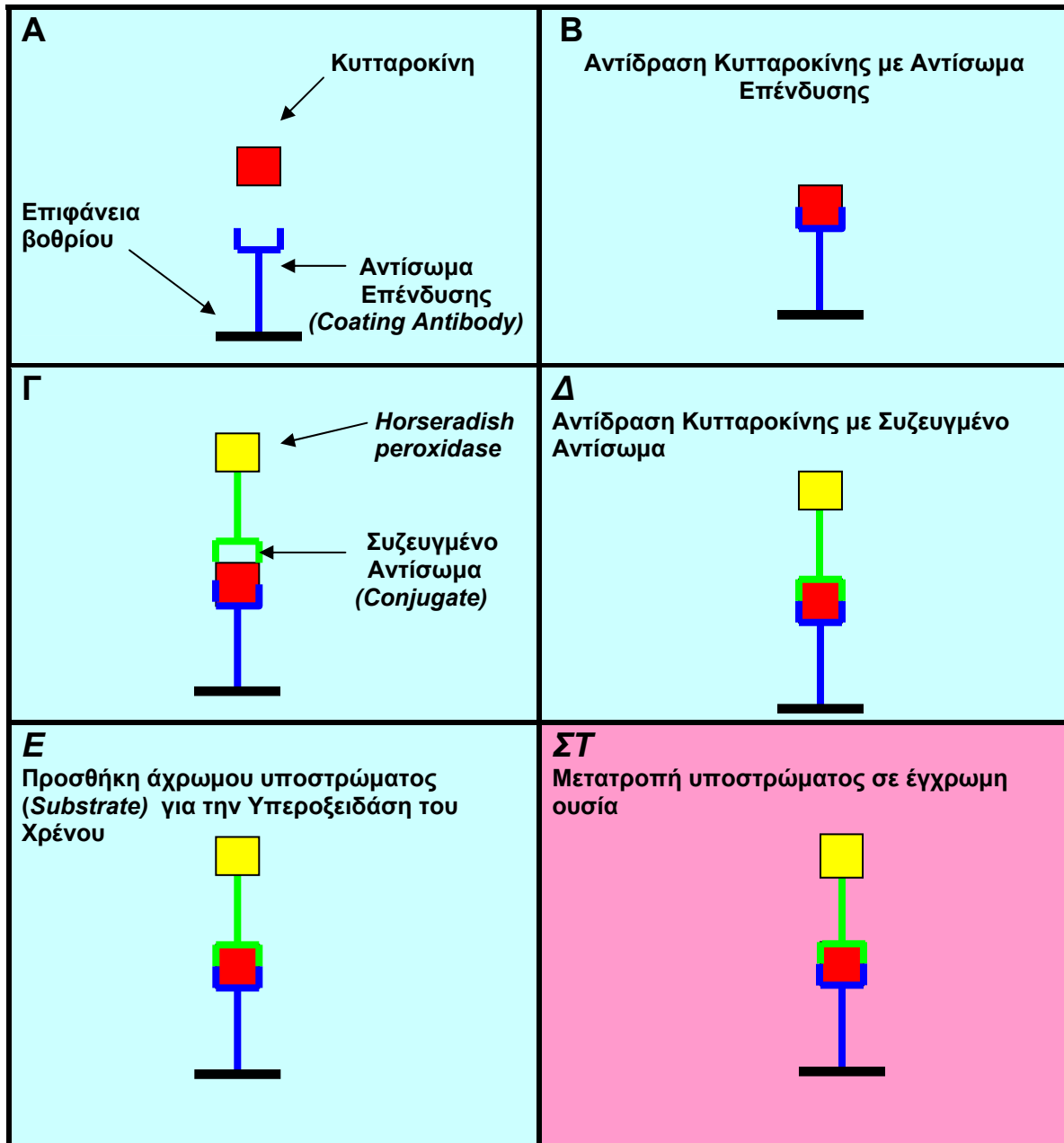


Σε προκαθορισμένα βοθρία, εγχέονταν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (*standards*) του αντιγόνου της συγκέντρωσης του οποίου θέλαμε να μετρήσουμε καθώς και δείγματα (**Εικόνα 2.2Α**). Το κάθε δείγμα ή *standard* εγχέονταν σε δύο βοθρία, ώστε η μέτρηση να γίνει δύο φορές. Το αντιγόνο συνδεόταν μέσω του Αντισώματος Επένδυσης με την επιφάνεια του βοθρίου (**Εικόνα 2.2Β**). Μετά από πλύση απομακρυνόταν όλο το υλικό που δεν ήταν συνδεδεμένο με την επιφάνεια του βοθρίου.

Στη συνέχεια στα βοθρία προσθέταμε το «Συζευγμένο Αντίσωμα» (*Conjugate*) το οποίο αντιδρούσε με το αντιγόνο, τα επίπεδα του οποίου θέλαμε να μετρήσουμε, σε σημείο διαφορετικό από το αντίσωμα ένδυσης (**Εικόνα 2.2Γ και 2.2Δ**). Το αντίσωμα αυτό ήταν συνδεδεμένο με το ένζυμο «υπεροξειδάση του χρένου» (*horseradish peroxidase*). Μετά από πλύση απομακρυνόταν όλο το υλικό που δεν ήταν συνδεδεμένο με την επιφάνεια του βοθρίου.

Τέλος προσθέταμε το ειδικό «Διάλυμα-Υπόστρωμα» (*Substrate Solution*). Το διάλυμα αυτό περιείχε μία άχρωμη ουσία, η οποία όμως αποτελούσε υπόστρωμα για το ειδικό ένζυμο (**Εικόνα 2.2Ε**). Η αντίδραση υποστρώματος-ειδικού ενζύμου είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή έγχρωμης ουσίας (**Εικόνα 2.2ΣΤ**).

Εικόνα 2.2: Η αρχή της ELISA τύπου σάντουιτς.



Ακολουθούσε ο καθορισμός της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος του κάθε βοθρίου, με τη βοήθεια συσκευής ανάγνωσης (*plate reader*) (EL<sub>x</sub> 800-Bio Tek Instruments INC), η οποία έχει ρυθμιστεί στα 450 nm.

Με τη βοήθεια του προγράμματος EXCEL και του προγράμματος ORIGIN φτιάχναμε την πρότυπη καμπύλη οπτικής πυκνότητας-συγκέντρωσης και καθορίζαμε τη συγκέντρωση της κυτταροκίνης σε κάθε δείγμα. Συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα των

δειγμάτων *standard* μετρώνταν δύο φορές. Εν συνεχεία υπολογιζόταν ο μέσος όρος των δύο αυτών τιμών και από τις τιμές που προέκυπταν αφαιρούνταν ο μέσος όρος των τιμών της οπτικής πυκνότητας του δείγματος, που αντιστοιχούσε στο «μηδέν». Και η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετρώνταν δύο φορές και εν συνεχεία υπολογιζόταν ο μέσος όρος των δύο αυτών τιμών και από τις τιμές, που προέκυπταν αφαιρούνταν ο μέσος όρος των τιμών της οπτικής πυκνότητας του δείγματος, που αντιστοιχούσε στο μηδέν. Με τη βοήθεια αυτών των τιμών οπτικής πυκνότητας υπολογίζονταν οι συντελεστές  $A$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  της εξίσωσης 3<sup>ου</sup> βαθμού  $Y=A+B_1X+B_2X^2+B_3X^3$  όπου  $Y$  είναι η συγκέντρωση της κυτταροκίνης στο δείγμα και  $X$  είναι η οπτική συγκέντρωση του δείγματος. Με τη βοήθεια της εξίσωσης αυτής υπολογίζονταν η συγκέντρωση σε όλα τα δείγματα.

**2.3.3. Μέτρηση των κυτταροκινών στο πλάσμα.** Για τη μέτρηση των επιπέδων των κυτταροκινών στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκαν ELISA kits που βρίσκονται στο εμπόριο (Quantikine; R&D Systems Inc., MN USA). Όλα τα ELISA kits, που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αποθηκευθεί σε ψυγείο, σε θερμοκρασία 8 έως 4°C για περίοδο λιγότερη από 20 ημέρες. Πριν από τη χρήση αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά περίπου, ώστε να έρθουν σε κατάλληλη θερμοκρασία.

**2.3.3.1. Μέτρηση του VEGF.** Σε όλες της μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του VEGF<sub>165</sub>. Τα ελάχιστα ανιχνεύσιμα επίπεδα της κυτταροκίνης με αυτήν τη μέθοδο ήταν χαμηλότερα των 9,0 pg/ml.

**2.3.3.2. Μέτρηση του bFGF.** Για τη μέτρηση των επιπέδων του bFGF στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για των ανθρώπινο bFGF. Τα ελάχιστα ανιχνεύσιμα επίπεδα της κυτταροκίνης με αυτήν τη μέθοδο ήταν χαμηλότερα των 3,0 pg/ml.

**2.3.3.3. Μέτρηση της ET-1.** Οι μετρήσεις των επιπέδων της κυτταροκίνης αυτής έγινε μετά από «εξαγωγή» (*extraction*) της κυτταροκίνης από πλάσμα EDTA-K<sub>3</sub> σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του ELISA kit που χρησιμοποιήθηκε. Τα ελάχιστα ανιχνεύσιμα επίπεδα της κυτταροκίνης με αυτήν τη μέθοδο ήταν χαμηλότερα του 1,0 pg/ml.

**2.3.3.4. Μέτρηση του TGF-β<sub>1</sub>.** Οι μετρήσεις των επιπέδων της κυτταροκίνης αυτής πραγματοποιήθηκαν μετά από «ενεργοποίησή» (*activation*) της σύμφωνα με τις

οδηγίες του κατασκευαστή του ELISA kit. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου αυτής ήταν από τα 2 έως τα 2000 pg/ml.

**2.3.3.5. Μέτρηση του sKL.** Οι μετρήσεις των επιπέδων του sKL έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή του ELISA kit που χρησιμοποιήθηκε. Τα ελάχιστα ανιχνεύσιμα επίπεδα της κυτταροκίνης με αυτήν τη μέθοδο ήταν χαμηλότερα των 9,0 pg/ml.

## **2.4. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.**

Η ομοιογένεια των πληθυσμών, που μελετήθηκαν ελέγχθηκε με την εφαρμογή της δοκιμασίας  $\chi^2$  ( $\chi^2$ -test). Τα αριθμητικά δεδομένα εκφράστηκαν ως μέσες τιμές  $\pm 1$  σταθερή απόκλιση (*Standard Deviation-SD*)-**m**  $\pm$  **SD** και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Η σύγκριση τιμών μεταξύ δύο σειρών μετρήσεων έγινε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Mann-Whitney U (*non-parametric Man-Whitney U test*). Οι συγκρίσεις μεταξύ πολλών σειρών μετρήσεων μεταξύ τους έγινε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis απλής ανάλυσης μεταβλητότητας (*Kruskal-Wallis non-parametric Anova test*). Η συσχέτιση δύο σειρών μετρήσεων έγινε με τη μη παραμετρική δοκιμασία του Spearman (*non-parametric Spearman's test*). Η πιθανότητα μικρότερη ή ίση του 5% θεωρούνταν στατιστικώς σημαντική.



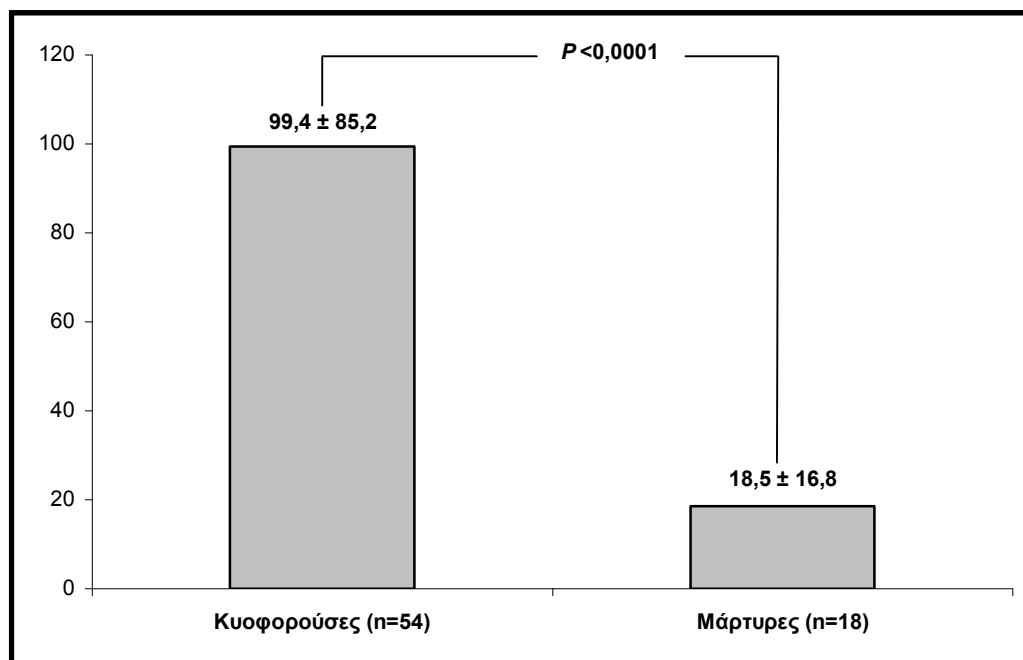
## Μέρος Τρίτο

# Αποτελέσματα

### 3.1. Τα επίπεδα των κυτταροκινών σε κήσεις ελεύθερες επιπλοκών

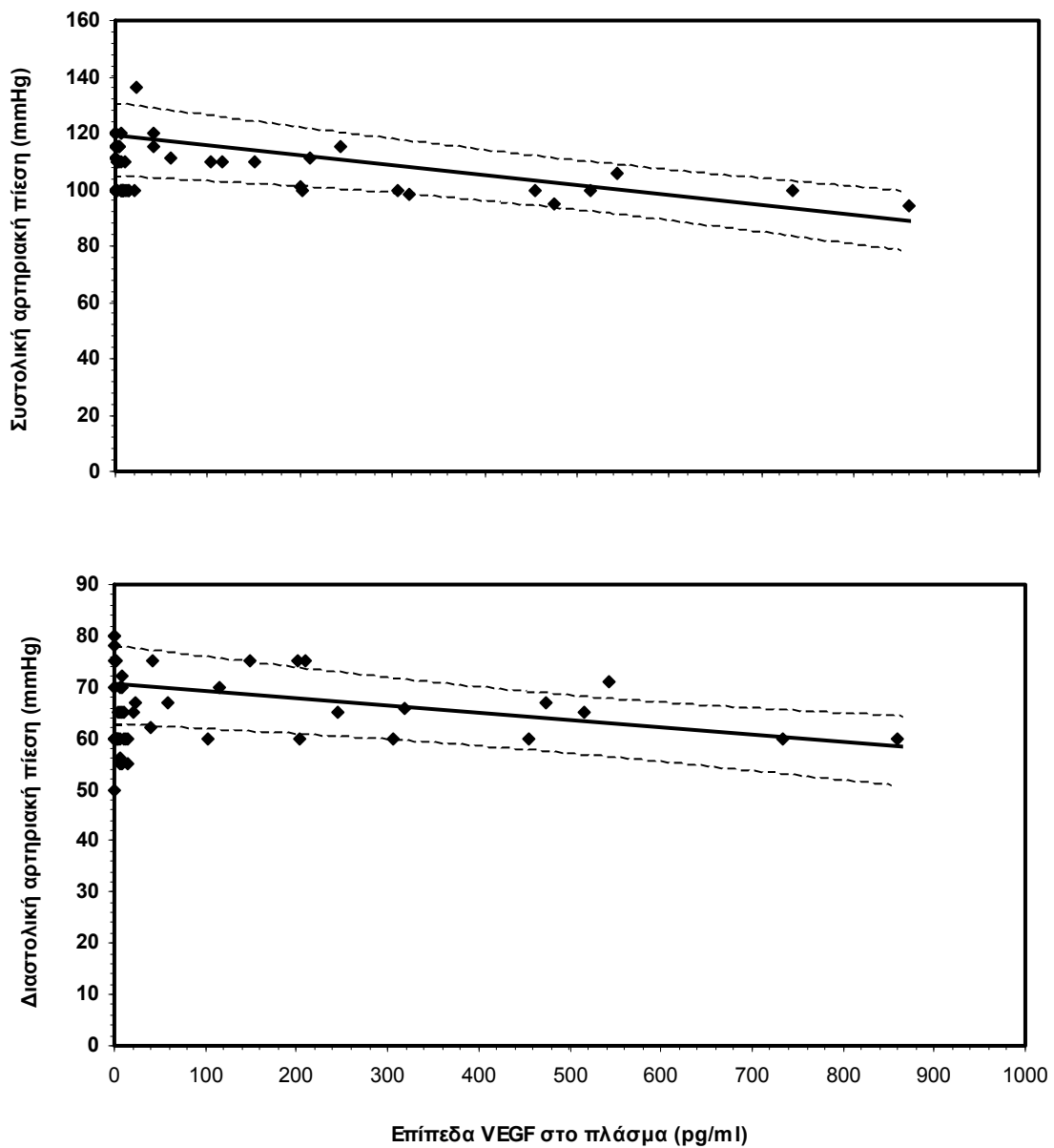
**3.1.1. Τα επίπεδα του VEGF.** Τα επίπεδα του VEGF μετρήθηκαν στο πλάσμα 54 γυναικών με κήση χωρίς επιπλοκές. Στις γυναίκες αυτές, η μέση τιμή των επιπέδων της κυτταροκίνης ήταν  $99,4 \pm 85,2$  pg/ml και εμφανιζόταν σημαντικά ανώτερη σε σύγκριση με την τιμή  $18,5 \pm 16,8$  pg/ml που καταμετρήθηκε στους μάρτυρες ( $P < 0,0001$ ; δοκιμασία Mann-Whitney) (*Εικόνα 3.1*).

**Εικόνα 3.1:** Οι τιμές των επιπέδων του VEGF (pg/ml) στη φυσιολογική κήση (στην κορυφή κάθε στήλης αναγράφεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση/ n: αριθμός δειγμάτων)



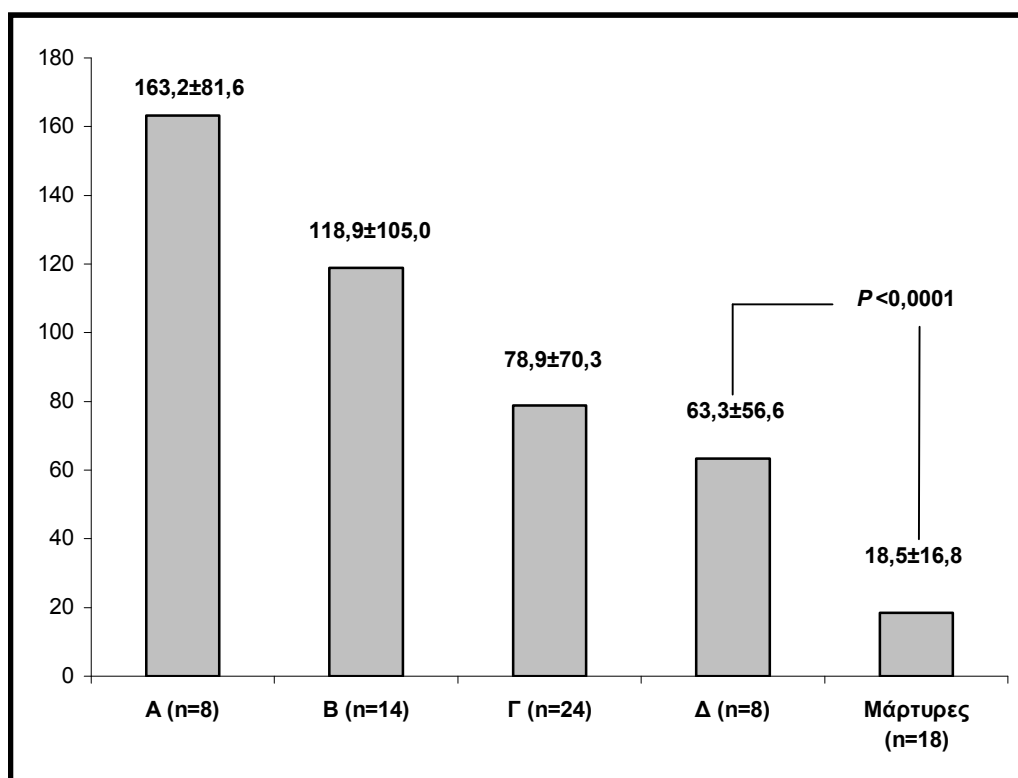
Οι παρατηρηθείσες τιμές ήταν αντιστρόφως ανάλογες τόσο με τη συστολική όσο και με τη διαστολική αρτηριακή πίεση ( $r = -0,2926$ ,  $P = 0,0318$  και  $r = -0,4225$  και  $P=0,0015$  αντιστοίχως; Δοκιμασία του Spearman) (Εικόνα 3.2), ενώ δεν παρουσίαζαν συσχέτιση με κάποια από τις αιματολογικές ή βιοχημικές παραμέτρους, που μελετήθηκαν.

**Εικόνα 3.2:** Ανάστροφη συσχέτιση επιπέδων VEGF στο πλάσμα και της συστολικής και της διαστολικής αρτηριακής πίεσης στις γυναίκες με φυσιολογική κύηση.



Η κατανομή των τιμών του VEGF στις τέσσερις υπο-ομάδες των εγκύων με κύηση ελεύθερη περιπλοκών παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.1**. Τα επίπεδα της κυτταροκίνης ήταν σημαντικά ανώτερα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης και παρουσίαζαν σταδιακή πτώση κατά τα επόμενα τρίμηνα και την ημέρα του τοκετού, αλλά παρέμεναν σημαντικά υψηλότερα από αυτά των μαρτύρων ( $P < 0,0001$ ; δοκιμασία Kruskal-Wallis Anova) (**Εικόνα 3.3**).

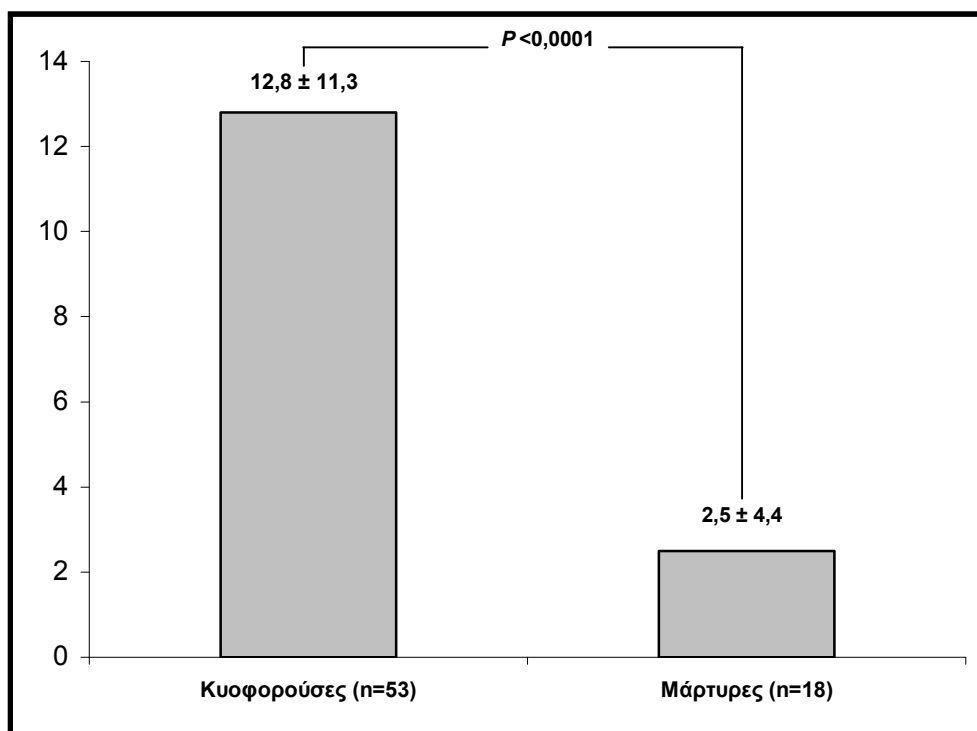
**Εικόνα 3.3:** Ο VEGF (σε pg/ml) στις διάφορες υπό-ομάδες στη φυσιολογική κύηση (Α, Β, Γ, Δ είναι αντιστοίχως οι υπο-ομάδες Α, Β, Γ και Δ/ στην κορυφή κάθε στήλης αναγράφεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση/ n: αριθμός δειγμάτων)



**3.1.2. Τα επίπεδα του bFGF.** Τα επίπεδα του bFGF μετρήθηκαν στο πλάσμα 53 γυναικών με κύηση χωρίς επιπλοκές. Στις γυναίκες αυτές, η μέση τιμή των επιπέδων της κυτταροκίνης ήταν  $12,8 \pm 11,3$  pg/ml και εμφανιζόταν σημαντικά ανώτερη σε σύγκριση

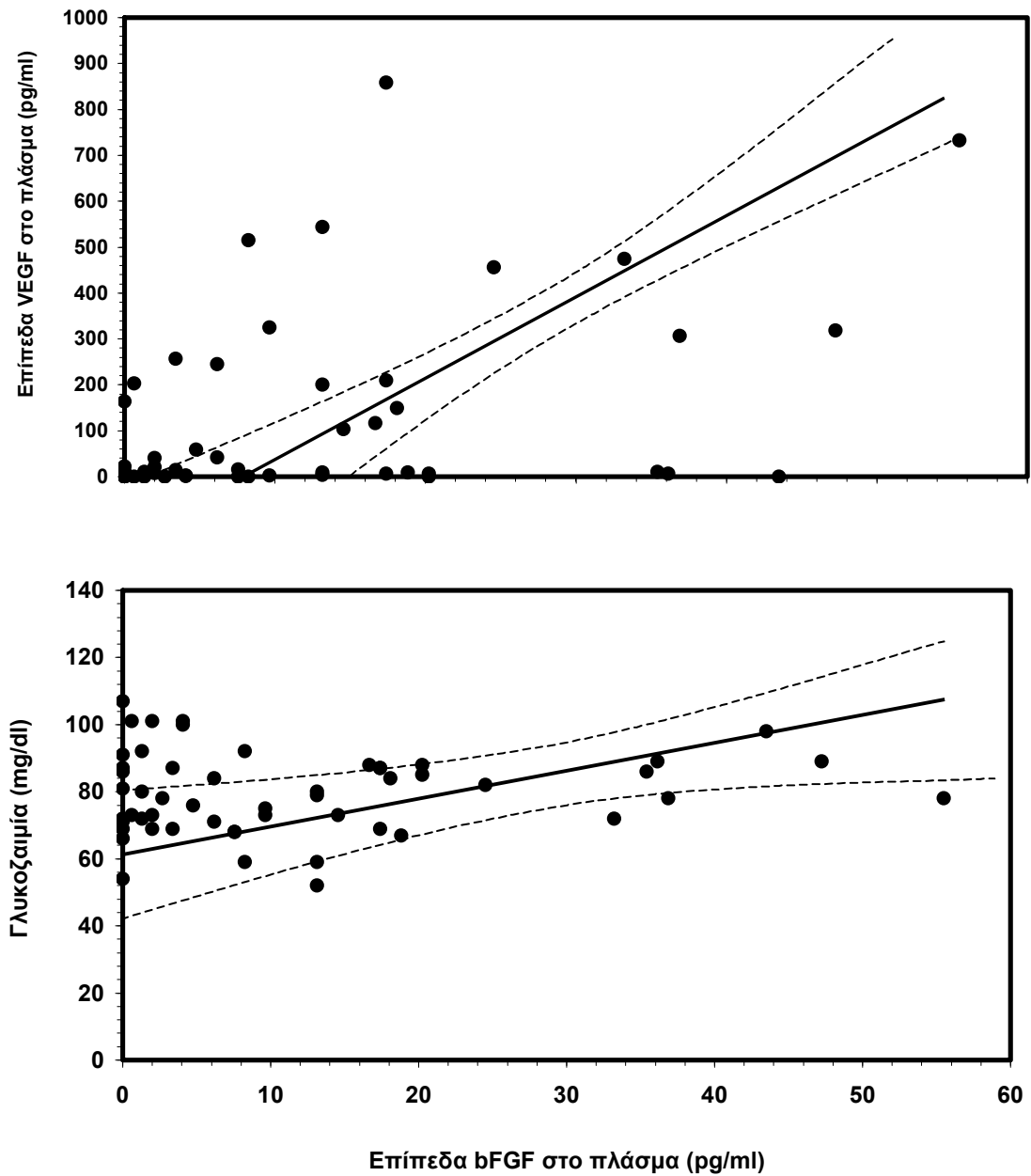
με την τιμή  $2,5 \pm 4,4$  pg/ml, που καταμετρήθηκε στους μάρτυρες ( $P < 0,0001$ ; δοκιμασία Mann-Whitney) (*Εικόνα 3.4*).

**Εικόνα 3.4:** Οι τιμές των επιπέδων του bFGF (pg/ml) στη φυσιολογική κύηση (στην κορυφή κάθε στήλης αναγράφεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση/ n: αριθμός δειγμάτων)



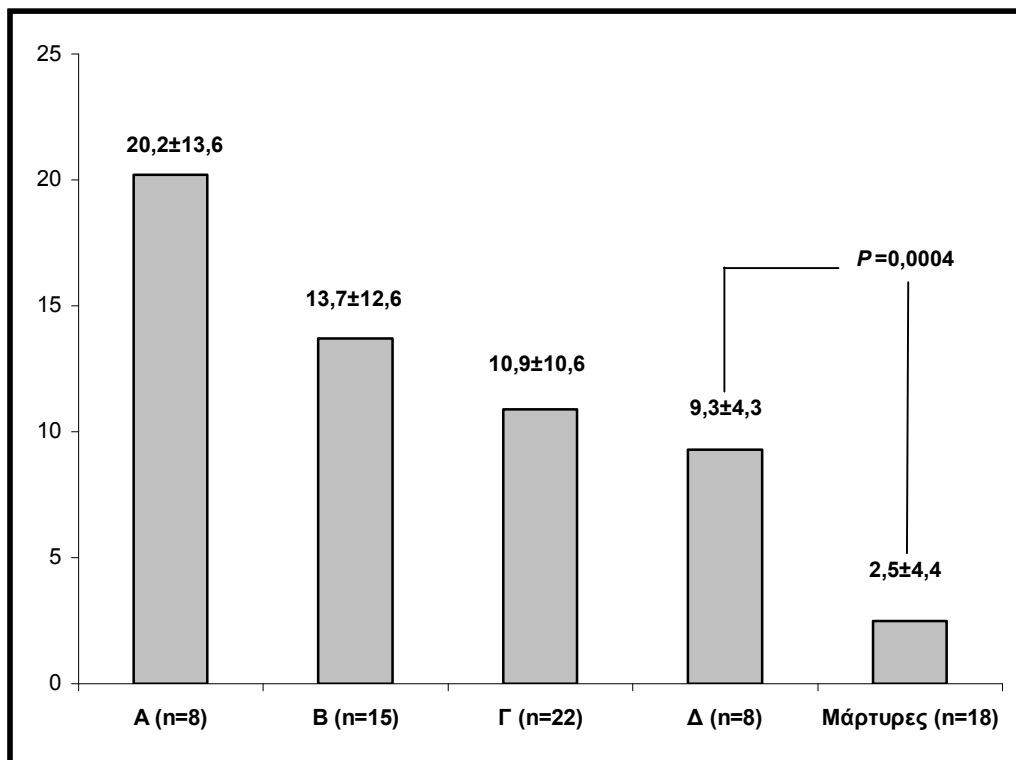
Οι τιμές του bFGF παρουσίαζαν σημαντική συσχέτιση με τις αντίστοιχες τιμές του VEGF ( $r = 0,5121$ ,  $P < 0,0001$ ; δοκιμασία του Spearman) (*Εικόνα 3.5*). Σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε και μεταξύ των τιμών bFGF και γλυκόζης στο αίμα ( $r = 0,1521$ ,  $P=0,0039$ ; δοκιμασία του Spearman) (*Εικόνα 3.5*), ενώ οι τιμές αυτές δεν παρουσίαζαν καμία συσχέτιση με κάποια από τις αιματολογικές ή βιοχημικές παραμέτρους, που μελετήθηκαν.

**Εικόνα 3.5:** Η συσχέτιση των επιπέδων του bFGF στο πλάσμα με τα επίπεδα του VEGF και με τη γλυκοζαιμία στη φυσιολογική κήση



Η κατανομή των τιμών του bFGF ανάμεσα στις τέσσερις υπο-ομάδες των εγκύων γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**. Τα επίπεδα της κυτταροκίνης ήταν σημαντικά ανώτερα κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης και ακολουθούσαν πτωτική τάση κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης κύησης, αλλά παρέμεναν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των μαρτύρων την ημέρα του τοκετού ( $P = 0,0004$ ; δοκιμασία Kruskal-Wallis Anova) (**Εικόνα 3.6**).

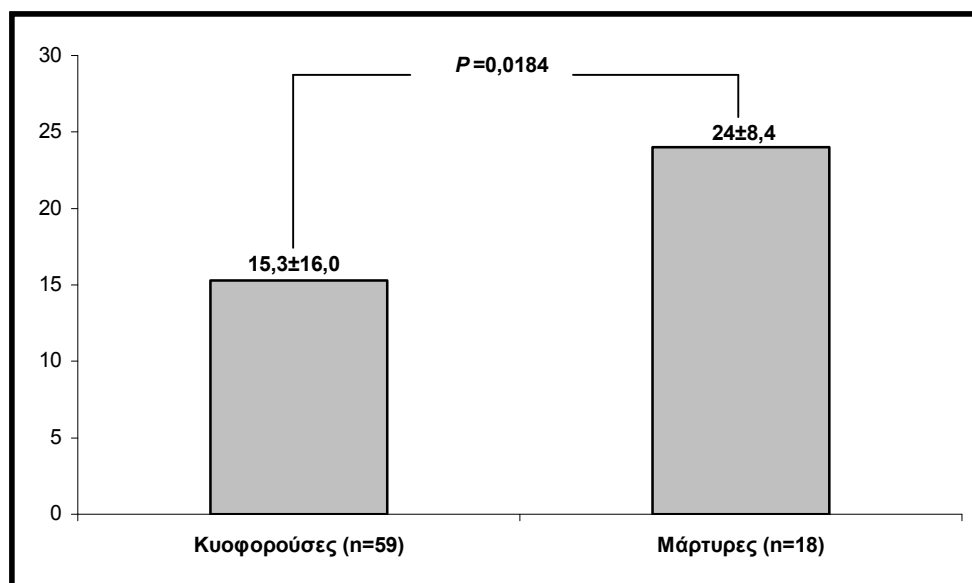
**Εικόνα 3.6:** Ο bFGF (σε pg/ml) στις διάφορες υπό-ομάδες στη φυσιολογική κύηση (Α, Β, Γ, Δ είναι αντιστοίχως οι υπο-ομάδες Α, Β, Γ και Δ/ στην κορυφή κάθε στήλης αναγράφεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση/ n: αριθμός δειγμάτων)



**3.1.3 Τα επίπεδα της ET-1.** Τα επίπεδα της ET-1 μετρήθηκαν στο πλάσμα 59 γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών. Η μέση τιμή των επιπέδων της κυτταροκίνης σε αυτή την ομάδα γυναικών ήταν  $15,3 \pm 16,0$  pg/ml, η οποία ήταν σημαντικά

χαμηλότερη από την τιμή  $24,0 \pm 8,4$  pg/ml, που μετρήθηκε στους μάρτυρες ( $P = 0,0184$ ; δοκιμασία του Spearman) (*Εικόνα 3.7*).

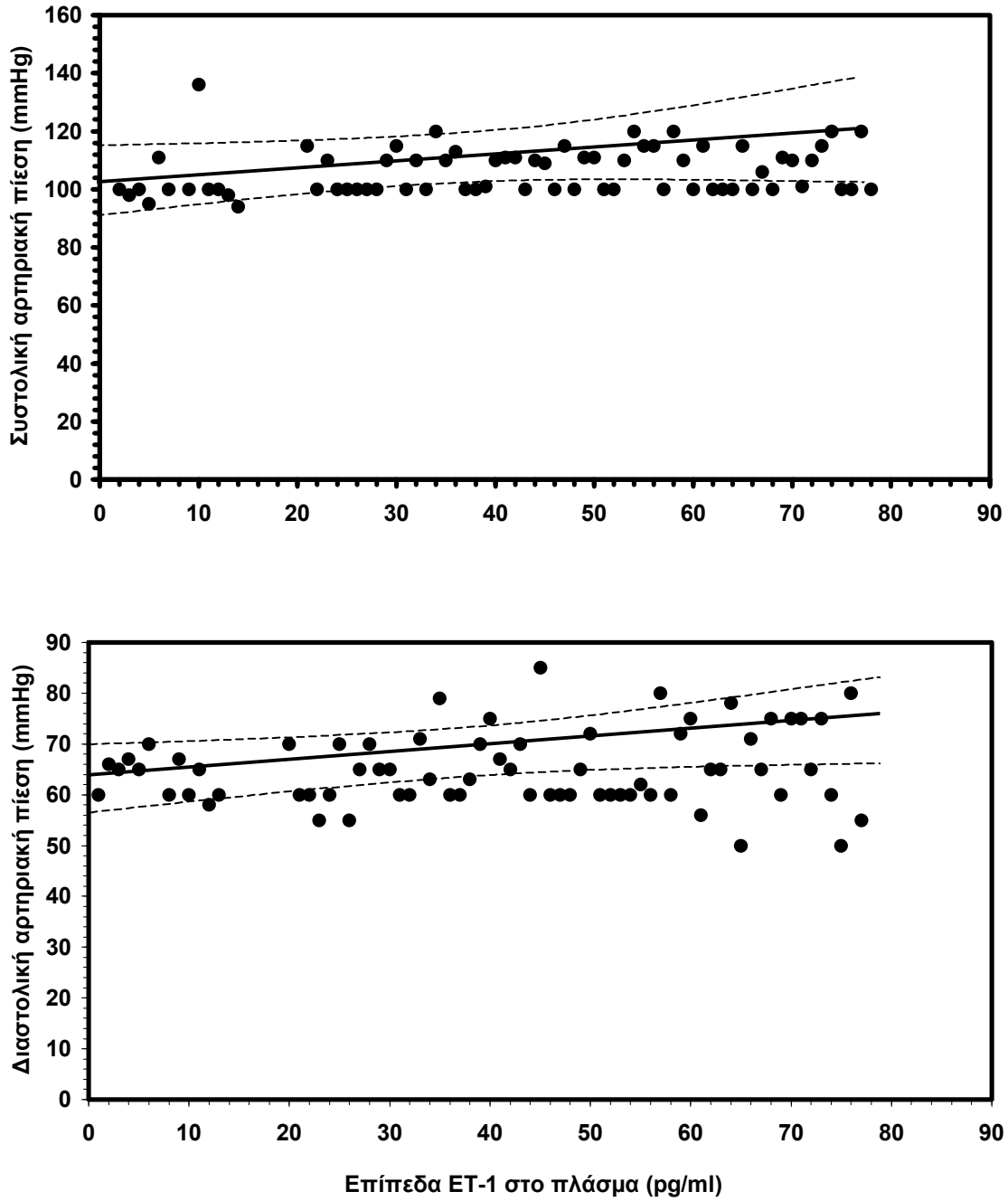
**Εικόνα 3.7:** Οι τιμές των επιπέδων της ET-1 (pg/ml) στη φυσιολογική κύηση (στην κορυφή κάθε στήλης αναγράφεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση/ n: αριθμός δειγμάτων)



Οι τιμές αυτές παρουσίαζαν συσχέτιση τόσο με τη συστολική, όσο και με η διαστολική πίεση ( $r = 0,4047$ ,  $P = 0,0015$  και  $r = 0,2714$ ,  $P = 0,0376$ , αντίστοιχα; Δοκιμασία του Spearman) (*Εικόνα 3.8*).

Τα επίπεδα της κυτταροκίνης αυτής δεν παρουσίαζαν συσχέτιση με τα αντίστοιχα επίπεδα των VEGF, bFGF ή TGF- $\beta_1$ . Η κατανομή των τιμών της ET-1 ανάμεσα στις τέσσερις υπο-ομάδες των εγκύων γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών παρουσιάζονται στον *Πίνακα 3.1*. Δεν παρουσιάσθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων της κυτταροκίνης αυτής μεταξύ των διαφόρων υπο-ομάδων ( $P = 0,9509$ ; δοκιμασία Kruskal-Wallis Anova).

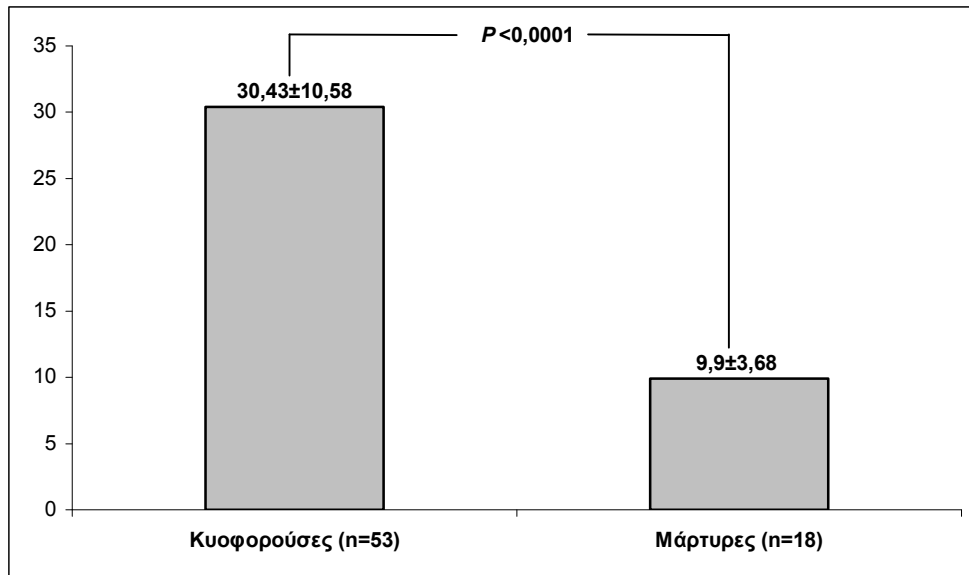
**Εικόνα 3.8:** Η συσχέτιση της συγκέντρωσης της ET-1 στο πλάσμα και της συστολικής και διαστολικής αρτηριακής πίεσης στις γυναίκες με κύηση ελεύθερη επιπλοκών





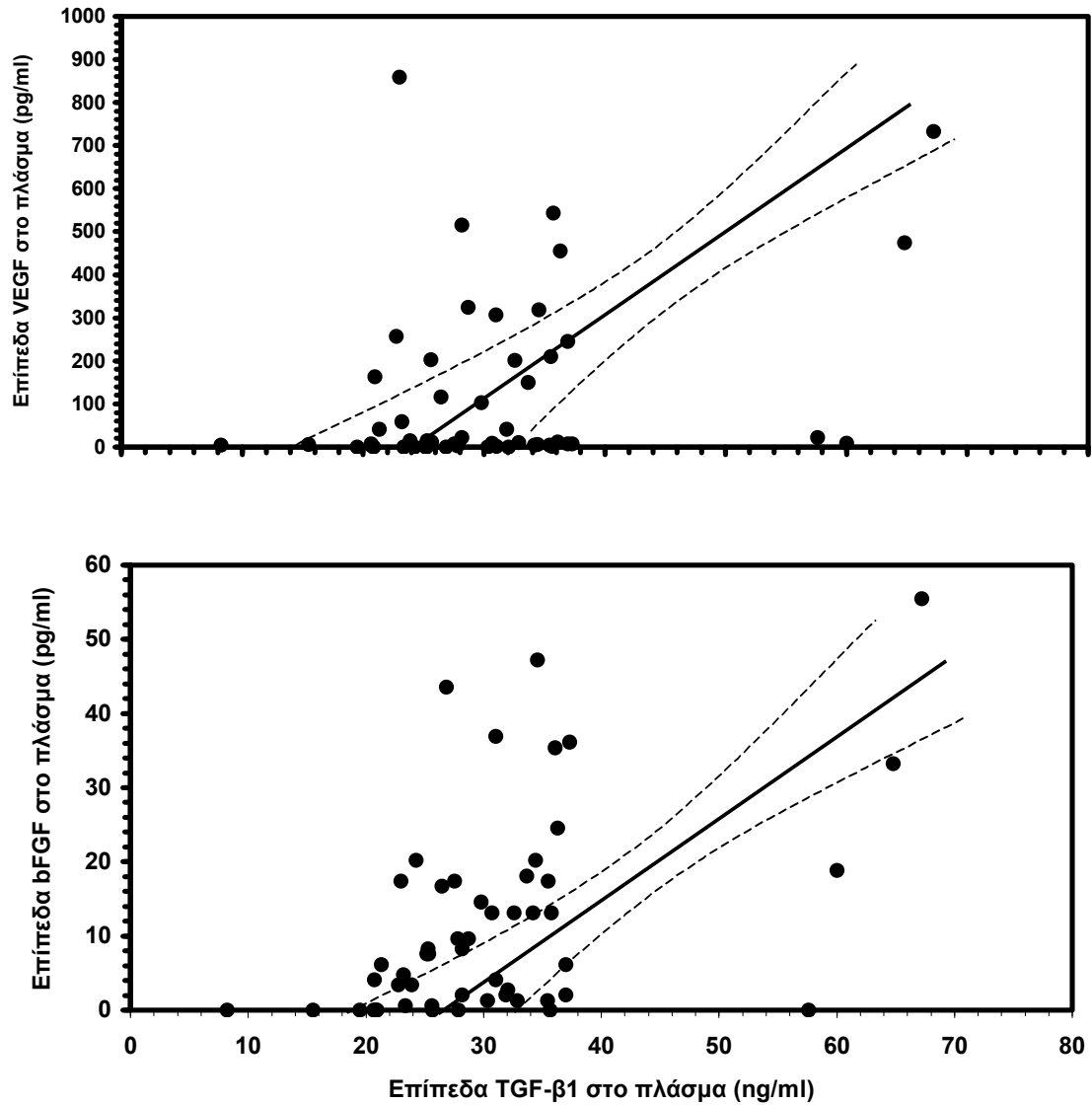
**3.1.4. Τα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub>.** Τα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub> μετρήθηκαν σε 53 γυναίκες με κύηση ελεύθερη επιπλοκών. Η μέση τιμή των επιπέδων της κυτταροκίνης στις γυναίκες αυτές ήταν  $30,43 \pm 10,58$  ng/ml και εμφανίζονταν σημαντικά ανώτερη από την τιμή  $9,90 \pm 3,68$  ng/ml, που μετρήθηκε στους μάρτυρες ( $P < 0,0001$ ; δοκιμασία Mann-Whitney) (**Εικόνα 3.9**).

**Εικόνα 3.9:** Οι τιμές των επιπέδων TGF-β<sub>1</sub> (ng/ml) στη φυσιολογική κύηση (στην κορυφή κάθε στήλης αναγράφεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση/ n: αριθμός δειγμάτων)



Οι τιμές TGF-β<sub>1</sub> παρουσίαζαν συσχέτιση τόσο με τις τιμές του VEGF όσο και με τις τιμές του bFGF ( $r = 0,4956$ ,  $P < 0,0001$ ; δοκιμασία του Spearman) (**Εικόνα 3.10**).

**Εικόνα 3.10:** Η συσχέτιση των επιπέδων TGF- $\beta_1$  στο πλάσμα με τα επίπεδα των VEGF και bFGF κατά τη φυσιολογική κύηση,



Η κατανομή των τιμών του TGF-β<sub>1</sub> ανάμεσα στις τέσσερις υπο-ομάδες των εγκύων γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub> ανάμεσα στις διάφορες υπο-ομάδες, αλλά, ακόμα και την ημέρα του τοκετού, παρουσιάζονταν σημαντικά ανώτερα σε σχέση με αυτά των μαρτύρων ( $P < 0,0001$  δοκιμασία Mann-Whitney).

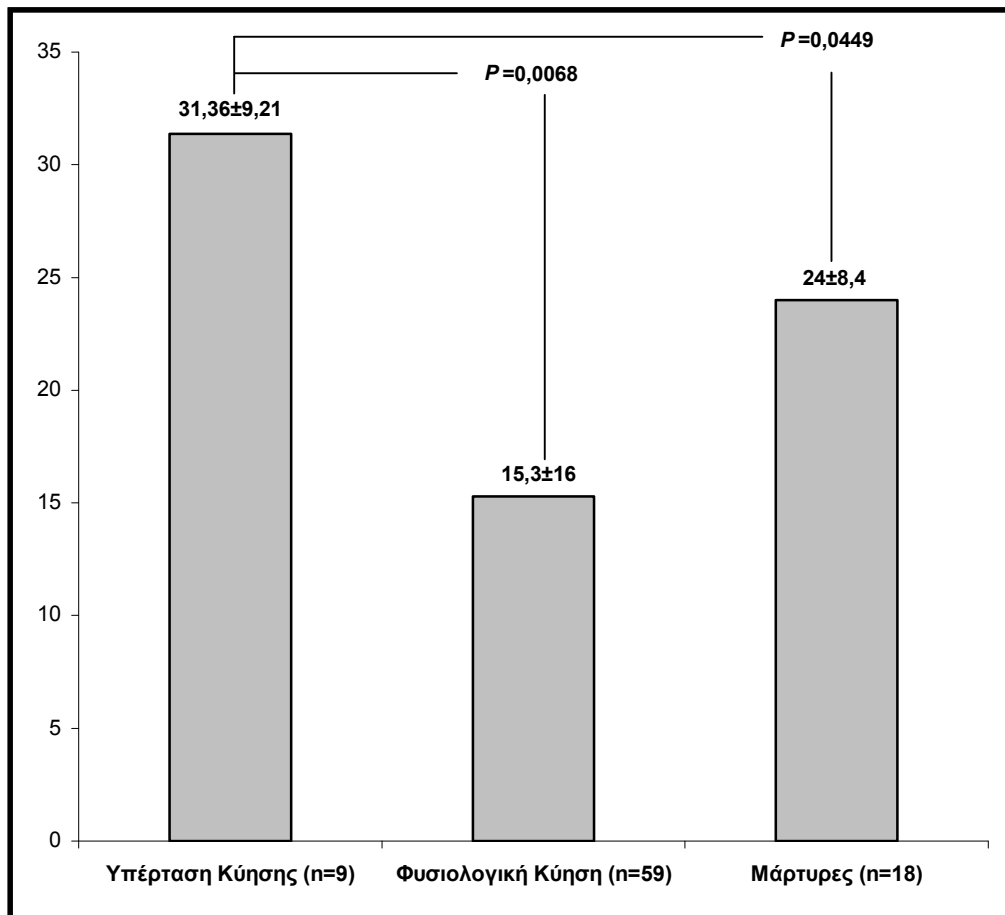
**3.1.5. Τα επίπεδα του sKL.** Τα επίπεδα του sKL στο πλάσμα μετρήθηκαν σε 45 γυναίκες με κύηση ελεύθερη επιπλοκών. Σε αυτήν την ομάδα γυναικών, η μέση τιμή των επιπέδων της κυτταροκίνης ανέρχονταν σε  $665 \pm 312$  pg/ml, η οποία δεν διέφερε σημαντικά από την τιμή  $715 \pm 241$  pg/ml, που καταγράφηκε στους μάρτυρες ( $P = 0,9361$ ; δοκιμασία Mann-Whitney). Η κατανομή των τιμών των επιπέδων του sKL ανάμεσα στις τέσσερις υπο-ομάδες των εγκύων γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**. Τα επίπεδα του sKL δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάφορες υπο-ομάδες των εγκύων και των μαρτύρων ( $P = 0,6579$ ; δοκιμασία Kruskal-Wallis Anova). Τα επίπεδα του sKL δεν παρουσίαζαν καμία συσχέτιση με τα επίπεδα κάποιας από τις άλλες κυτταροκίνες ή με κάποια από τις αιματολογικές ή άλλες παραμέτρους, που μελετήθηκαν.

## **3.2. Επίπεδα κυτταροκινών στο πλάσμα σε εγκυμοσύνες με Υπέρταση Κύησης.**

Τα επίπεδα των κυτταροκινών στο πλάσμα εγκύων, που παρουσίασαν υπέρταση κύησης καταγράφονται στον **Πίνακα 3.2**. Τα επίπεδα των VEGF, bFGF και TGF-β<sub>1</sub> στο πλάσμα των εγκύων παρουσιάζονταν όλα σαφώς ανώτερα από αυτά των μαρτύρων ( $P = 0,0005$ ,  $P = 0,0035$ ,  $P = 0,0004$ , αντιστοίχως, δοκιμασία Mann-Whitney), αλλά δεν παρουσίαζαν σημαντική διαφορά από τα αντίστοιχα επίπεδα των γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών. Σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των επιπέδων του VEGF και των επιπέδων του bFGF ( $r = 0,8060$ ,  $P < 0,0001$ , δοκιμασία Spearman), ενώ τα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub> παρουσίαζαν αντίστροφη συσχέτιση με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και ινοδογόνου ( $r = - 0,8505$ ,  $P = 0,0153$  και  $r = - 0,6459$ ,  $P = 0,0004$  αντιστοίχως, δοκιμασία του Spearman).

Τα επίπεδα στο πλάσμα της ET-1 στις γυναίκες, που παρουσίασαν υπέρταση κύησης ανέρχονταν σε  $31,36 \pm 9,21$  pg/ml, τα οποία παρουσιάζονταν σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα στους μάρτυρες ( $P = 0,0449$ , δοκιμασία Mann-Whitney) και υψηλότερα και από τα επίπεδα, που μετρήθηκαν στις γυναίκες των οποίων η κύηση δεν παρουσίαζε επιπλοκές ( $P = 0,0068$ , δοκιμασία Mann-Whitney) (**Εικόνα 3.11**).

**Εικόνα 3.11:** Οι τιμές των επιπέδων ET-1 (pg/ml) στις περιπτώσεις υπέρτασης κύησης (στην κορυφή κάθε στήλης αναγράφεται η μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση/ n: αριθμός δειγμάτων)



Στην παρούσα μελέτη σημειώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των τιμών της ET-1 στο πλάσμα των εγκύων με κύηση ελεύθερη επιπλοκών και των τιμών της συστολικής και διαστολικής πίεσης. Η προσπάθεια αναζήτησης ανάλογης συσχέτισης και στις

γυναίκες, που εκλεκτικά παρουσίασαν υπέρταση κύησης δεν απέδωσε τελικά το προσδοκώμενο αποτέλεσμα προφανώς για το λόγο ότι ενώ οι τιμές της ET-1 ακολουθούσαν τους κανόνες της τυχαίας μεταβλητής, δεν συνέβαινε το ίδιο και με τις υπερτασικές γυναίκες στις οποίες οι τιμές της υπέρτασης διακόπτονταν από τον ορισμό ενός ορίου βάση του οποίου μια έγκυος χαρακτηριζόταν ή όχι υπερτασική (cut-off values).

Τα επίπεδα του sKL στο πλάσμα δεν εμφάνιζαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των γυναικών, που παρουσίασαν υπέρταση κύησης και των μαρτύρων ή των γυναικών των οποίων η κύηση ήταν ελεύθερη επιπλοκών. Τα επίπεδα τόσο της ET-1 όσο και του sKL δεν παρουσίαζαν καμία συσχέτιση με κάποια από τις άλλες κλινικές ή βιολογικές παραμέτρους, που μελετήθηκαν.

### **3.3. Επίπεδα κυτταροκινών στο πλάσμα σε εγκυμοσύνες με Διαβήτη Κύησης.**

Τα επίπεδα των κυτταροκινών στο πλάσμα γυναικών, που παρουσίασαν διαβήτη κύησης, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**. Τα επίπεδα των VEGF, bFGF και TGF-β<sub>1</sub> παρουσιάζονταν σημαντικά ανώτερα σε αυτήν την ομάδα των γυναικών σε σχέση με τα αντίστοιχα των μαρτύρων ( $P < 0,0001$ ,  $P = 0,0049$  και  $P = 0,0004$  αντιστοίχως, δοκιμασία Mann-Whitney), αλλά δεν διέφεραν σημαντικά από τα αντίστοιχα επίπεδα στις γυναίκες, που παρουσίασαν υπέρταση κύησης ή σε αυτές των οποίων η κύηση ήταν ελεύθερη επιπλοκών. Μία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των επιπέδων του bFGF και των επιπέδων γλυκοζαιμίας ( $r = 0,8214$ ,  $P = 0,0341$ , δοκιμασία του Spearman).

Τα επίπεδα των ET-1 και sKL σε γυναίκες με διαβήτη κύησης δεν διέφεραν σημαντικά από τις αντίστοιχες των γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών ή με υπέρταση κύησης. Οι τιμές των ET-1 και sKL δεν παρουσίασαν καμία συσχέτιση με κάποια από τις κλινικές ή εργαστηριακές παραμέτρους, που μελετήθηκαν, αλλά ούτε και με τα επίπεδα των VEGF, bFGF και TGF-β<sub>1</sub> στο πλάσμα.

**Πίνακας 3.1:** Τα επίπεδα των κυτταροκινών στο πλάσμα σε γυναίκες με κύηση ελεύθερη επιπλοκών

Κυτταροκίνη	Υπο-ομάδα Α	Υπο-ομάδα Β	Υπο-ομάδα Γ	Υπο-ομάδα Δ	Μάρτυρες
<b>VEGF (pg/ml)</b>					
Μέση τιμή ± ΣΑ	163,2 ± 81,6	118,9 ± 105,0	78,9 ± 70,3	63,3 ± 56,6	18,5 ± 16,8
Διάμεση τιμή	176,4	74,5	51,9	41,2	11,1
Όρια	54,9 - 257,4	12,1 - 374,3	14,2 - 257,3	10,1 - 58,9	0 - 47,8
Περιπτώσεις (n)	n = 8	n = 14	n = 24	n = 8	n = 18
<b>bFGF (pg/ml)</b>					
Μέση τιμή ± ΣΑ	20,2 ± 13,6	13,7 ± 12,6	10,9 ± 10,6	9,3 ± 4,3	2,5 ± 4,4
Διάμεση τιμή	22,1	9,6	10,0	8,2	0,63
Όρια	1,3 - 40,2	0 - 34,9	3,2 - 35,4	3,2 - 14,6	0 - 14,1
Περιπτώσεις (n)	n = 8	n = 15	n = 22	n = 8	n = 18
<b>ET - 1 (pg/ml)</b>					
Μέση τιμή ± ΣΑ	13,4 ± 12,6	14,5 ± 15,8	15,9 ± 17,3	16,5 ± 17,7	24,0 ± 8,4
Διάμεση τιμή	10,2	10,6	8,9	7,1	21,4
Όρια	0 - 41,7	0 - 40,1	0 - 47,8	0 - 43,9	10,9 - 43,2
Περιπτώσεις (n)	n = 10	n = 12	n = 28	n = 9	n = 18
<b>TGF - β<sub>1</sub> (ng/ml)</b>					
Μέση τιμή ± ΣΑ	37,1 ± 17,6	30,9 ± 10,9	28,2 ± 7,2	28,9 ± 5,3	9,9 ± 3,7
Διάμεση τιμή	32,5	28,7	28,5	28,7	11,2
Όρια	15,5 - 67,2	20,7 - 64,8	8,2 - 37,3	21,3 - 37,3	4,1 - 15,5
Περιπτώσεις (n)	n = 8	n = 15	n = 22	n = 8	n = 18
<b>sKL (pg/ml)</b>					
Μέση τιμή ± ΣΑ	693 ± 288	661 ± 226	596 ± 336	824 ± 336	715 ± 241
Διάμεση τιμή	774	682	749	822	710
Όρια	171 - 961	188 - 992	131 - 1094	824 - 336	342 - 1358
Περιπτώσεις (n)	n=7	n=9	n=21	n=8	n=14

Όλες οι τιμές εκφράζονται σε μέσες τιμές ± ΣΑ (σταθερή απόκλιση). Η υπο-ομάδα Α περιλαμβάνει γυναίκες που εξετάστηκαν κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, η υπο-ομάδα Β γυναίκες που εξετάστηκαν κατά το δεύτερο τρίμηνο, η υπο-ομάδα Γ γυναίκες που εξετάστηκαν κατά το τρίτο τρίμηνο και η υπο-ομάδα Δ γυναίκες που εξετάστηκαν την ημέρα του τοκετού.

**Πίνακας 3.2:** Επίπεδα κυτταροκινών στο πλάσμα γυναικών με υπέρταση και διαβήτη κύησης\*

<b>Κυτταροκίνη</b>	<b>Υπέρταση κύησης**</b>	<b>Διαβήτης κύησης**</b>
<b>VEGF (pg/ml)</b>		
Μέση τιμή ± ΣΑ	108,4 ± 62,4	121,8 ± 97,4
Διάμεση τιμή	103,3	104,9
Όρια	11,1 – 232,9	10,05 – 255,49
Περιπτώσεις (n)	n = 8	n = 6
<b>bFGF (pg/ml)</b>		
Μέση τιμή ± ΣΑ	9,96 ± 6,00	6,81 ± 4,00
Διάμεση τιμή	9,99	6,85
Όρια	0,63 – 17,80	2,86 – 14,75
Περιπτώσεις (n)	n = 8	n = 7
<b>ET – 1 (pg/ml)</b>		
Μέση τιμή ± ΣΑ	31,36 ± 9,21	23,10 ± 21,59
Διάμεση τιμή	32,00	18,35
Όρια	13,26 – 43,14	0 – 57,66
Περιπτώσεις (n)	n = 9	n = 7
<b>TGF – β<sub>1</sub> (ng/ml)</b>		
Μέση τιμή ± ΣΑ	29,66 ± 13,84	25,14 ± 4,66
Διάμεση τιμή	26,20	26,21
Όρια	11,34 – 57,60	18,00 – 30,26
Περιπτώσεις (n)	n = 8	n = 6
<b>sKL (pg/ml)</b>		
Μέση τιμή ± ΣΑ	897 ± 233	681 ± 284
Διάμεση τιμή	836	603
Όρια	663 – 1316	352 - 1128
Περιπτώσεις (n)	n=8	n=6

\* Όλες οι τιμές εκφράζονται σε μέση τιμή ± ΣΑ (σταθερή απόκλιση)

\*\* Όλες οι γυναίκες εξετάστηκαν κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης

## Μέρος Τέταρτο

# Συζήτηση-Συμπεράσματα

### 4.1. Φυσιολογική κύηση

**4.1.1. Η παραγωγή του VEGF και του bFGF κατά την κύηση.** Η αυξημένη συγκέντρωση των VEGF και bFGF στο πλάσμα του αίματος της εγκύου σε σχέση με την αντίστοιχη στο πλάσμα των μαρτύρων, που διαπιστώθηκε στην παρούσα μελέτη, οδηγεί στην υπόθεση πως η παραγωγή των παραγόντων αυτών παρουσιάζεται αυξημένη κατά τη διάρκεια της κύησης. Επιπροσθέτως, η συσχέτιση των επιπέδων των VEGF και bFGF μεταξύ τους, που παρατηρήθηκε στο πλάσμα γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών, ίσως να σημαίνει αφενός πως οι παράγοντες αυτοί έχουν κοινή έδρα παραγωγής και αφετέρου πως τα ερεθίσματα, που επάγουν την παραγωγή τους είναι κοινά. Είναι λογικό εξάλλου, να υποθέσει κανείς πως κατά τη διάρκεια της κύησης, υπάρχουν ιστοί, που παράγουν επιπλέον ποσότητες αυτών των παραγόντων, αλλά και ειδικά ερεθίσματα, που προκαλούν την αύξηση της παραγωγής αυτής.

Τόσο το mRNA όσο και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες των VEGF και VEGFR ανευρίσκονται σε ιστούς του ανθρώπινου *εμβρύου* και *πλακούντα* [Maglione et al, 1991; Sharkey et al, 1993; Barleon et al, 1994; Charomock-Jones et al, 1994; Shifren et al, 1994; Cooper et al, 1995], ενώ αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει πως ο VEGF παράγεται από τους ιστούς του πλακούντα προβάτων καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [Cheung et al, 1995; Redmer et al, 1998; Reynolds et al, 1998c]. Το ύψος άλλωστε της συγκέντρωσης του VEGF στον ορό του αίματος έχει συσχετισθεί και με το μέγεθος του πλακούντα [Wheeler et al, 1999].

Φαίνεται πως η και προέλευση του bFGF κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης εντοπίζεται τόσο στους *εμβρυϊκούς ιστούς*, όσο και στον *πλακούντα* και στο *ενδομήτριο (ή φθαυτό)* [Ferriani et al, 1994; Arany & Hill, 1998; Zygnunt et al, 2003].



Η *υποξία* είναι το βασικότερο ερέθισμα, που προκαλεί την αύξηση της παραγωγής του VEGF [Wheeler et al, 1995; Gerber et al, 1997] και προάγει την παραγωγή [Wang et al, 2000] και την απελευθέρωση [Kuwabara et al, 1995; Ishibashi et al, 2001] του bFGF. Κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της κύησης η ταχεία αύξηση του πλακούντα και γενικότερα η εμβρυογένεση επιτυγχάνεται σε περιβάλλον *υποξίας*, αφού δεν έχουν αναπτυχθεί ακόμα τα απαραίτητα αγγεία [Rodesch et al, 1992; Khaliq et al, 1999; Kingdom & Kaufmann, 1999]. Κατά την περίοδο αυτή φαίνεται λοιπόν πως η υποξία είναι το βασικότερο ίσως ερέθισμα, που προκαλεί την αυξημένη παραγωγή των VEGF και bFGF.

Ένα άλλο ερέθισμα, που είναι πιθανό να συμμετέχει στην αυξημένη παραγωγή VEGF και bFGF, είναι και η άνοδος των επιπέδων των *οιστρογόνων*, που παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες κατά την κύηση. Η έκφραση μάλιστα στο *ενδομήτριο* του mRNA του VEGF και του bFGF αυξάνεται κατά 3 έως και 10 φορές σε αμνούς και ποντίκια, που έχουν υποβληθεί σε ωθηκεκτομή, μετά από τη χορήγηση οιστρογόνων [Cullian-Bove & Koos, 1993; Reynolds et al, 1998a; Reynolds et al, 1998b,]. Στον άνθρωπό, η αύξηση της παραγωγής VEGF από το ενδομήτριο επιτυγχάνεται μετά από τη χορήγηση οιστρογόνων [Mirkin et al, 2003], ενώ ανάλογες παρατηρήσεις έχουν γίνει *in vitro* σε καρκινικά κύτταρα [Stoner et al, 2004] και σε όγκους *in vivo* [Dabrosin et al, 2003]. Όσον αφορά την επιρροή των οιστρογόνων στην παραγωγή bFGF, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η παραγωγή αυτή από κύτταρα προερχόμενα από τον προστάτη αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των υποδοχέων για τα οιστρογόνα στην επιφάνειά τους [Smith et al, 2002; Smith et al, 2004].

Ένα άλλο στοιχείο, που προέκυψε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσης μελέτης είναι και η τάση για σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης του VEGF στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της κύησης, αν και οι τιμές αυτές παραμένουν υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των μαρτύρων.

Η σταδιακή μείωση αυτή είναι δυνατόν να ερμηνευθεί, αν ληφθούν υπόψη τα ερεθίσματα, που προάγουν την άνοδο των επιπέδων των bFGF και VEGF κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, δηλαδή την υποξία και τα οιστρογόνα.

Η παραγωγή οιστρογόνων από τον πλακούντα και τους εμβρυϊκούς ιστούς αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [Grella et al, 1996], μπορεί λοιπόν να

υποθέσει κανείς πως με ανάλογο τρόπο αυξάνεται και η παραγωγή των bFGF και VEGF από το ενδομήτριο (ή φθαρτό). Όμως, το περιβάλλον υποξίας, που αποτελεί και τον ισχυρότερο επαγωγέα της παραγωγής VEGF και bFGF, στο οποίο αρχικά αναπτύσσονταν ο πλακούντας και το έμβρυο, περιορίζεται σταδιακά.

Ο περιορισμός της υποξίας φαίνεται πως οφείλεται στην αύξηση της ροής του αίματος προς τον πλακούντα. Έτσι αυξάνεται η *διακίνηση ουσιών* (και O<sub>2</sub>) και περιορίζεται η υποξία.

Κατά τα πρώτα στάδια της κύησης δεν υπάρχει καμία επαφή του εμβρύου και της μητρικής κυκλοφορίας. Η επαφή αυτή εγκαθιδρύεται σταδιακά μεταξύ 8<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> εβδομάδας με τη δημιουργία αγγείων [Rodesch et al, 1992; Kingdom & Kaufman, 1999], οπότε και διαπιστώθηκε η πτώση της συγκέντρωσης των bFGF και VEGF στο πλάσμα της εγκύου.

Η προοδευτική αύξηση της ροής του αίματος στον πλακούντα είναι αποτέλεσμα αφενός της από τους VEGF και bFGF επαγόμενης αγγειογένεσης σε αυτόν και αφετέρου της δράσης του παραγόμενου NO [Reynolds & Redmer, 2001].

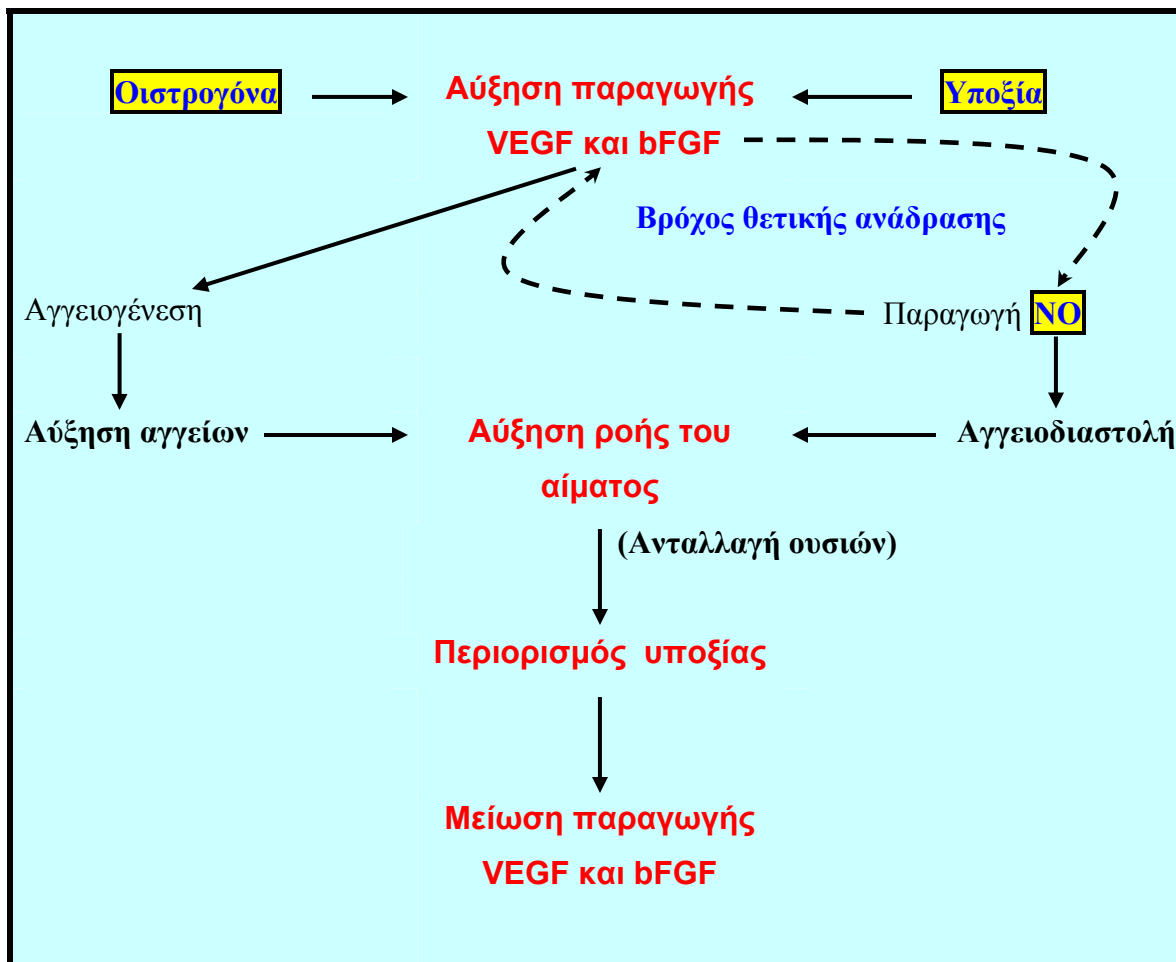
Κατά τη διάρκεια της κύησης έχουμε αύξηση της παραγωγής NO [Conrad et al, 1993; Choi et al, 2002], η οποία αντικατοπτρίζεται και στην αυξημένη συγκέντρωση του NO στον ορό του αίματος τόσο της εγκύου όσο και του εμβρύου [Jo et al, 1998; Shaamash et al, 2000]. Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί πως στην εγκυμοσύνη αυξάνεται στο μυομήτριο και η έκφραση της Συνθετάσης του Νιτρικού Οξέως» (*nitric oxide synthase - NOS*), η οποία είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση του NO [Bansal et al, 1997; Norman et al, 1999].

Οι Reynolds & Redmer παρουσίασαν ένα θεωρητικό μηχανισμό, για να εξηγήσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των VEGF και bFGF και του NO στον πλακούντα. Τα οιστρογόνα δρουν πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου και προάγουν την παραγωγή VEGF και bFGF. Ο παράγων αυτός, προάγει με τη δράση του στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αφενός την αγγειογένεση και αφετέρου την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του πλακούντα, της μήτρας, του ενδομητρίου (ή φθαρτού) και του εμβρύου. Το παραγόμενο NO δρα στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων και προκαλεί αγγειοδιαστολή, ενώ παράλληλα προάγει την περαιτέρω παραγωγή VEGF και bFGF, συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό σε έναν «βρόχο θετικής ανάδρασης» (*positive*

*feedback loop*), συμβάλλοντας έτσι περαιτέρω στην αγγειογένεση και την αύξηση της ροής του αίματος στον πλακούντα [Reynolds & Redmer, 2001].

Φαίνεται λοιπόν πως κατά την εξέλιξη της κύησης υφίσταται περιορισμός της υποξίας. Έχει όμως διαπιστωθεί πως το έμβryo συνεχίζει να αναπτύσσεται σε συνθήκες υποξίας [Hurch et al, 1994; Siggaard-Andersen & Hurch, 1995]. Η παραμονή της υποξίας, σε συνδυασμό με την προοδευτική αύξηση του επιπέδου των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια της κύησης, ίσως να είναι αρκετές, για να διατηρήσουν τα επίπεδα των VEGF και bFGF στο πλάσμα της εγκύου σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά των μαρτύρων (*Εικόνα 4.1*).

**Εικόνα 4.1:** Η παραγωγή VEGF και bFGF κατά τη διάρκεια της κύησης



Υπάρχουν δύο ακόμα στοιχεία, που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, που ενισχύουν τρόπον τινά την υπόθεση αυτή, της παραγωγής VEGF και bFGF κατά τη

διάρκεια της κύησης. Καταρχήν, η ανάστροφη συσχέτιση των επιπέδων VEGF και συστολικής και διαστολικής πίεσης, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, θα μπορούσε να συνδέεται με την αύξηση παραγωγής NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που προκαλείται από αυτήν την κυτταροκίνη, η οποία οδηγεί σε αγγειοδιαστολή και πτώση της αρτηριακής πίεσης [Cuevas et al, 1991; Cuevas et al, 1996]. Επομένως η ανάστροφη αυτή συσχέτιση ενισχύει περαιτέρω την πιθανότητα εμπλοκής του VEGF στην παραγωγή NO και τη συμμετοχή του στο βρόχο θετικής ανάδρασης της παραπάνω υπόθεσης.

Εξάλλου τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα γυναικών με κύηση ελεύθερη επιπλοκών παρουσίαζαν συσχέτιση με τα επίπεδα του bFGF. Φαίνεται πως σε διαβητικούς ασθενείς αυξάνεται η γλυκοζυλίωση του bFGF, ο οποίος απενεργοποιείται [Duraisamy et al, 2001]. Θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει πως σε συνθήκες, που η ανάγκη για παραγωγή bFGF είναι αυξημένη, η αύξηση της γλυκόζης στο αίμα, ακόμα και αν δεν φθάνει στα επίπεδα των διαβητικών, προκαλεί απενεργοποίηση μέρους του παραγόμενου bFGF και ο οργανισμός προβαίνει σε αύξηση της παραγωγής της κυτταροκίνης αυτής, προκειμένου να ανταπεξέλθει στις αυξημένες αυτές ανάγκες. Βασικό στοιχείο της υπόθεσής, που διατυπώθηκε στην παρούσα μελέτη, σχετικά με την παραγωγή bFGF κατά τη διάρκεια της κύησης, ήταν το γεγονός πως ο παράγων αυτός συμμετέχει στην αγγειογένεση του πλακούντα. Άρα φαίνεται λογική η υπόθεση, κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης, ο οργανισμός της γυναίκας να παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία στα επίπεδα γλυκοζυλίωσης του bFGF και να αντιδρά με αύξηση της παραγωγής της κυτταροκίνης αυτής ακόμα και σε μικρές αυξήσεις της γλυκοζαιμίας, που οδηγεί σε αύξηση της γλυκοζυλίωσης και απενεργοποίησής της.

**4.1.2. Η ET-1 και φυσιολογική κύηση.** Από τα στοιχεία της παρούσης μελέτης προκύπτει πως η συγκέντρωση της ET-1 στο πλάσμα του αίματος της εγκύου, της οποίας η κύηση είναι ελεύθερη επιπλοκών, παρουσιάζεται μειωμένη σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος των μαρτύρων. Η μείωση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται είτε σε *αύξηση του καταβολισμού* της ET-1, είτε σε *μείωση της παραγωγής* της.

Όσον αφορά το μεταβολισμό της ET-1, υπάρχουν αρκετά ένζυμα, που συμμετέχουν στον καταβολισμό του μορίου αυτού [Jackman et al, 1993; Deng et al,

1994; Perez-Vizcaino et al, 1995] μεταξύ των οποίων το πιο σημαντικό είναι η Ουδέτερη Ενδοπεπτιδάση (*Neutral Endopeptidase/ NEP*) [Abassi et al, 1992]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως στη μήτρα του αρουραίου η συγκέντρωση του mRNA της NEP αυξάνεται υπό την επίδραση οιστρογόνων και συγκεκριμένα της οιστραδιόλης [Pinto et al, 1999], θα ήταν ενδιαφέρον να δούμε αν και η Οιστριόλη, που είναι και το κυρίαρχο οιστρογόνο, που απαντάται στο αίμα κατά τη διάρκεια της κύησης [Grella et al, 1996], είναι σε θέση να επηρεάσει τη βιοσύνθεση της NEP. Επίσης η παραγωγή NEP στη μήτρα αυξάνεται και μετά από τη χορήγηση Προγεστερόνης [Pinto et al, 1999], τα επίπεδα της οποίας κατά τη διάρκεια της κύησης είναι σαφώς αυξημένα [Grella et al, 1996]. Εξάλλου, έχει επιβεβαιωθεί πως η NEP είναι παρούσα στη μήτρα του κυοφορούντος προβάτου και στο ενδομήτριο καθώς και στα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου και των αγγείων κατά την πρόωμη κύηση [Riley et al, 1995].

Η μείωση της παραγωγής της ET-1 κατά τη διάρκεια της κύησης θα μπορούσε να εξηγηθεί με βάση τις ουσίες, που την αναστέλλουν. Μεταξύ των ουσιών αυτών περιλαμβάνεται το NO [Boulangier & Luscher, 1990; Luscher et al, 1992; Kourembanas et al, 1993], του οποίου η παραγωγή αυξάνεται κατά τη διάρκεια της κύησης, όπως αναφέρθηκε σε άλλο τμήμα της παρούσης. Πειραματικά δεδομένα εξάλλου, καταδεικνύουν πως η παραγωγή της ET-1 αναστέλλεται και από τη δράση των οιστρογόνων [Bilsel et al, 2000; Webb et al, 2000; Heigl et al, 2002; Grande et al, 2002; Hong et al, 2004; Juan et al, 2004], των οποίων τα επίπεδα παρουσιάζονται υψηλά κατά τη διάρκεια της κύησης. Από τα παραπάνω προκύπτει πως η μείωση των επιπέδων της ET-1 κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να οφείλεται σε ένα συνδυασμό μείωσης της παραγωγής της και αύξησης του καταβολισμού της.

Μία τρίτη πιθανότητα, που θα μπορούσε να εξηγήσει την κάμψη των επιπέδων της ET-1 στο πλάσμα της εγκύου, θα μπορούσε να ήταν η **αύξηση της απομάκρυνσης** (*clearance*) της κυτταροκίνης αυτής από το πλάσμα. Με δεδομένο πως οι υποδοχείς ET<sub>B</sub> φαίνεται πως εμπλέκονται και στην απομάκρυνση της ET-1 από το πλάσμα [Depuis et al, 1996; Orgenorth et al, 2000], ίσως κατά τη διάρκεια της κύησης να υφίσταται μία αύξηση των υποδοχέων αυτών στο ενδοθήλιο.

Το φαινόμενο της χαμηλότερης συγκέντρωσης ET-1 κατά τη διάρκεια της κύησης σε σχέση με τους μάρτυρες, που καταγράφηκε, ίσως να συνδέεται με την ευαισθησία του

μυός της ανθρώπινης μήτρας στη δράση της ET-1 [Heluy et al, 1995; Osada et al, 1997]. Η από την ET-1 επαγόμενη συστολή της μήτρας είναι σημαντικά αυξημένη στο τέλος της κύησης [Osada et al, 1997]. Επιπροσθέτως, η συσταλτική ανταπόκριση της μήτρας του αρουραίου στην ET-1 είναι αυξημένη κατά τη διάρκεια του τοκετού και μειώνεται μετά από αυτόν. Η αυξημένη ανταπόκριση συνοδεύεται από αυξήσεις στην πυκνότητα των υποδοχέων της ET-1 στο μυομήτριο [Yallampalli et al, 1997]. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν την ιδιότητα της ET-1 να αυξάνει τη συσταλτικότητα της μήτρας, γεγονός, που είναι σημαντικό για την έναρξη του τοκετού, αλλά μπορεί να προκαλέσει προβλήματα αν επέλθει άκαιρα κατά τη διάρκεια της κύησης.

**4.1.3. Ο TGF-β<sub>1</sub> και η φυσιολογική κύηση.** Οι μετρήσεις στην παρούσα μελέτη κατέδειξαν μία αύξηση της συγκέντρωσης του TGF-β<sub>1</sub> στο πλάσμα του αίματος της εγκύου σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές, που παρατηρήθηκαν στους μάρτυρες. Φαίνεται λοιπόν πως κατά τη διάρκεια της κύησης έχουμε μία αύξηση της παραγωγής του TGF-β<sub>1</sub> κατά την περίοδο αυτή. Οι δομές, που συμμετέχουν στην αύξηση αυτή πιθανώς είναι ο *πλακούντας*, το *έμβρυο* το *ενδομήτριο (ή φθαρτός)* και η *μήτρα*.

Μελέτες σε ζώα επιβεβαιώνουν πως ο πλακούντας, το έμβρυο, το ενδομήτριο (ή φθαρτός) και η μήτρα αποτελούν τη θέση της βιοσύνθεσης του TGF-β<sub>1</sub> κατά την εγκυμοσύνη [Akhurst et al, 1991; Lyons et al, 1991; Crisera et al, 2000; Chow et al, 2001].

Σύμφωνα με στοιχεία, που προκύπτουν από παρατηρήσεις στον άνθρωπο, ο TGF-β<sub>1</sub> εντοπίζεται στην επιφάνεια επαφής των ιστών της μητέρας και του εμβρύου. [Lysiak JJ et al, 1995].

Σημαντικές παρατηρήσεις, που καταδεικνύουν την πιθανότητα τόπος παραγωγής του TGF-β<sub>1</sub> να είναι η μήτρα της εγκύου [Slater & Murphy, 2000] ή ο πλακούντας [Rama et al, 2001; Schilling & Yeh, 2000], έχουν γίνει και στον άνθρωπο. Εξάλλου στην παρούσα μελέτη, κατά την κύηση, που δεν παρουσίασε επιπλοκές, τα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub> παρουσίαζαν συσχέτιση με τα επίπεδα των VEGF και bFGF. Το στοιχείο αυτό, ίσως να καταδεικνύει την κοινή πηγή παραγωγής των κυτταροκινών αυτών. Αφού λοιπόν φαίνεται πως η εστία παραγωγής και για τους VEGF και bFGF φαίνεται πως είναι ο πλακούντας, το έμβρυο ή ο φθαρτός, ενισχύεται η υπόθεση πως τόπος παραγωγής και του TGF-β<sub>1</sub> είναι ο πλακούντας.

**4.1.4. Ο sKL και η φυσιολογική κύηση.** Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα του sKL στο πλάσμα δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων υπο-ομάδων των εγκύων και μεταξύ των εγκύων και των μαρτύρων. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με συμπεράσματα άλλων ανάλογων μελετών [Savas et al, 1998; Hammadeh et al, 2004].

## 4.2. Υπέρταση Κύησης

Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα μόνο της ET-1 εμφανίστηκαν υψηλότερα στις κύησεις, που παρουσίασαν υπέρταση, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα, που μετρήθηκαν σε κύησεις, που δεν παρουσίασαν επιπλοκές. Τα επίπεδα των άλλων κυτταροκινών δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των κύησεων, που δεν παρουσίασαν επιπλοκές και των κύησεων που παρουσίασαν υπέρταση. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα της ET-1 παρουσίαζαν συσχέτιση τόσο με τη συστολική όσο και με τη διαστολική πίεση και κατά τη φυσιολογική κύηση. Τα στοιχεία αυτά συνάδουν με την πιθανότητα της εμπλοκής της ET-1 στην παθογένεση της υπέρτασης κύησης. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί αν ληφθεί υπόψη η ιδιότητα της ET-1 να προκαλεί αγγειοσυστολή [Yanagisawa et al, 1988; Bobik et al, 1990] Τα συμπεράσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία [Tong et al, 1999; Heimarh et al, 2002].

Η συσχέτιση που παρουσίασαν τα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub> στις κύησεις με υπέρταση με τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και ινοδογόνου δεν μπορέσαμε να τον αιτιολογήσουμε.

## 4.3. Διαβήτης Κύησης

Από τις κυτταροκίνες, με τις οποίες καταπιαστήκαμε στην παρούσα εργασία, η μόνη, που έχει εμπλακεί με την παθογένεση του διαβήτη κύησης είναι ο bFGF [Hill et al, 1995a; Hill et al, 1995b; Di Blasio et al, 1997; Hill et al, 1997; Arany et al, 1998]. Εντούτοις, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων των VEGF, TGF-β<sub>1</sub>, ET-1, sKL αλλά και bFGF στο πλάσμα των

γυναικών, που εμφάνισαν διαβήτη κύησης σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές, που καταμετρήθηκαν σε κύσεις ελεύθερες επιπλοκών ευρισκόμενες στο αυτό στάδιο.

#### 4.4. Τελικό Συμπέρασμα

Όσον αφορά τις κύσεις χωρίς επιπλοκές, τα στοιχεία που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη κατέδειξαν πως τα επίπεδα VEGF και bFGF στο πλάσμα γυναικών αυτών παρουσιάζονταν υψηλά σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα των μαρτύρων. Οι τιμές των κυτταροκινών αυτών παρουσίαζαν σημαντική αύξηση κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης και στη συνέχεια μειώνονταν σταδιακά κατά τα δύο ακόλουθα τρίμηνα και την ημέρα του τοκετού, αλλά παρέμεναν υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα των μαρτύρων.

Τα επίπεδα του TGF-β<sub>1</sub> παρουσιάζονταν επίσης υψηλά στη φυσιολογική κύηση, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν διακυμάνσεις στη συνέχεια.

Αντίθετα τα επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα παρουσιάζονταν μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα των μαρτύρων και παρέμεναν χαμηλά καθ' όλη την διάρκεια της κύησης, ενώ εμφάνιζαν και συσχέτιση τόσο με τη συστολική, όσο και με τη διαστολική πίεση.

Τα επίπεδα του sKL δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των διαφόρων υποομάδων εγκύων με κύηση ελεύθερη επιπλοκών, αλλά ούτε και μεταξύ εγκύων και μαρτύρων.

Σε γυναίκες που παρουσίασαν υπέρταση κύησης, τα επίπεδα VEGF, bFGF, TGF-β<sub>1</sub> και sKL κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα με αυτά των γυναικών με κύηση χωρίς επιπλοκές, ενώ τα επίπεδα της ET-1 παρουσιάζονταν αυξημένα.

Όσον αφορά το διαβήτη κύησης, καμία από τις κυτταροκίνες, των οποίων τα επίπεδα μετρήθηκαν δεν εμφάνισαν σχέση με την παθολογία αυτή.

Συνοψίζοντας, τα ευρήματα της μελέτης μας καταδεικνύουν αφενός πιθανή εμπλοκή και ρυθμιστική δράση των VEGF, bFGF, TGF-β<sub>1</sub> και ET-1 στην κύηση χωρίς επιπλοκές, αφετέρου την πιθανότητα εμπλοκής των αυξημένων επιπέδων ET-1 στην παθογένεση της υπέρτασης κύησης.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR (1992). Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 20: 89 – 95
2. Abir R, Fisch B, Jin S, Barnet M, Kessler-Icekson G, Ao A (2004). Expression of stem cell factor and its receptor in human fetal and adult ovaries. *Fertility and Sterility* 82(Supplement 3):1235-1243
3. Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman F, Hjertild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986a). Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic Fibroblast growth factor. *Science* 233: 545 – 548
4. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Diddes JC (1986b). Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization *EMBO J* 5: 2523 – 2528
5. Acarregui MJ, Penisten ST, Goss KL, Ramirez K, Snyder JM (1999). Vascular endothelial growth factor gene expression in human fetal lung in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* Jan; 20(1): 14 – 23
6. Agah R, Prasad KSS, Linnemann R, Firpo M, Quertermous T, Dichek DA (2000). Cardiovascular overexpression of transforming growth factor –  $\beta_1$  causes abnormal yolk sac vasculogenesis and early embryonic death. *Circ Res* 86: 1024 – 1030
7. Agrotis A, Saltis J, Dilley R, Bray P, Bobik A (1995). Transforming growth factor beta – 1 and the development of vascular hypertrophy in hypertension. *Blood Press Suppl* 2: 43 – 48
8. Akhurst RJ, FitzPatrick DR, Gatherer D et al, (1991). Transforming growth factor betas in mammalian embryogenesis. *Prog Growth Factor Res.* 2, 153 – 168
9. Albertson S, Hummel RP, Bresden M, Greenshalgh DG (1993). PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein – malnourishment diabetic mice. *Surgery* 11: 368 –372
10. Allouche M & Bikfalvi A (1995). The role of fibroblast growth factor – 2 in hematopoiesis. *Prog Growth Factor Res* 6: 35 – 48
11. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C, March CJ, Boswell HS, Gimpel SD, Cosman D, Williams DE (1990). Molecular cloning of mas cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell.* Oct 5:63(1):235-243

12. Anderson DM, Williams DE, Tushinski R, Gimpel S, Eisenman J, Cannizzaro LA, Aronson M, Croce CM, Kuebner K, Cosman D (1991). Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24. *Cell Growth Differ* 2(8):373-378
13. Ando N, Hirahara F, Fukushima J et al., (1998). Differential gene expression of TGF – beta isoforms and TGF – beta receptors during the first trimester of pregnancy and the human maternal – fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 40: 48 – 56
14. Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, K Murata K and Suzuki T, (1995). Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268: H2084-H2091
15. Arakawa T, Yphantis DA, Lary JW, Narhi LO, Lu HS, Prestrelski SJ, Clogston CL, Zsebo KM, Menidaz EA, Wypych J (1991). Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. *J Biol Chem* 266(28):18942-18948
16. Arany E & Hill DJ (1998). Fibroblast growth factor – 2 and fibroblast growth factor – 1 mRNA expression and peptide localization in placenta from normal and diabetic pregnancies. *Placenta* Mar – Apr; 19(2 – 3): 133 – 142
17. Armstead WM, (1996). Role of endothelin in pial artery vasoconstriction and altered responses to vasopressin after brain injury. *J Neurosurg*. Nov;85(5):901-7
18. Baird A & Bohlen P. (1990). In “ Handbook of Experimental Pharmacology (M.B. Sporn and A.B. Roberts eds) Vol 95 pp 369 – 418. Springer – Verlag. Berlin
19. Baker PN, Krasnow J, Roberts JM and Yeo KT (1995). Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 86: 815 – 821
20. Bansal RK, Goldsmith PC, He Y, et al (1997). A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery. *J Clin Invest*, 99, 2502 – 2508
21. Barleon B, Hauser S, Schollmann C, Weindel K, Marme D, Yayon A, Weich HA (1994). Differential expression of two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells. *J Cell Biochem* 54: 56 – 66
22. Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I. (1989) *Biochemistry* 28: 1737 – 1743
23. Basilico C & Moscatelli D (1992) The FGF family of growth factors and oncogens. *Advances in Cancer Research* 59: 115 – 165
24. Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T (1995). Transforming growth factor –  $\beta$ 1 (TGF –  $\beta$ 1) and TGF –  $\beta$ 1 receptors in normal cirrhotic and neoplastic human livers. *Hepatology* 21: 760 – 766

25. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin – 1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 372: 83 – 87
26. Benian A, Madazli R, Aksu F, Uzun H, Aydin S (2002). Plasma and placental levels of interleukin – 10, transforming growth factor beta – 1 and epithelial – cadherin in preeclampsia. *Obstet Gynecol Aug*; 100(2): 327 – 331
27. Bhushan M, McLaughlin B, Weiss JB, Griffiths CE, (1999) Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular growth factor are elevated in psoriasis. *Br J Dermatol. Dec*; 141(6): 1054 – 1060
28. Bikfalvi A & Han ZC (1994) Angiogenic growth factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia* 8: 523 – 529
29. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB (1997) Biological Roles of Fibroblast Growth Factor – 2. *Endocrine Reviews Vol 18, No. 1*: 26 – 45
30. Bisel AS, Moini H, Tetik E, Aksungar F, Kayanak B, Ozer A (2000). 17 $\beta$ -Estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovascular Research* 46:579-584
31. Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T (1989). cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin – 3. *J Biol Chem* 264: 18156 – 18161
32. Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchel A, Grinpukel S (1990). Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 258: C408 – 415
33. Bode-Boger SM, Boger RH, Kuhn M, Radermacher J, Frolich JC (1996). Recombinant human erythropoietin enhances vasoconstrictor tone via endothelin-1 and constrictor prostanoids. *Kidney Int. Oct*;50(4):1255-61.
34. Bogic LV, Brace RA, Cheung CY (2000) Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes; *Placenta Mar – Apr*; 21(2 – 3): 203 – 209
35. Bosio PM, Wheeler T, Anthony F, Conroy R, O'herlihy C, McKenna P (2001). Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol* 184: 146 – 152
36. Bottner M, Krieglstein K, Unsicker K (2000) The Transforming growth factor –  $\beta$ s: Structure, signaling and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75(6): 2227 – 2240
37. Boulanger C & Luscher TF (1990). Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium – derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85: 587 – 590
38. Boulanger J, Reyes – Moreno C, Koutsilieris M (1995). Mediation of glucocorticoid receptor function by the activation of latent transforming growth factor –  $\beta$ 1 in MG – 63 human osteosarcoma cells. *Int J Cancer* 61: 692 – 697

39. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 114: 521 – 532
40. Brigstock DR, Klagsbrun M, Sasse J, Farber PA, Iberg N (1990) Species specific high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor. *Growth Factors* 4: 45 – 52
41. Brockelsby J, Hayman R, Ahmed A, Warre A, Johnson I, Baker P (1999) VEGF via VEGF receptor – 1 (Flt – 1) mimics preeclamptic plasma in inhibiting uterine blood vessel relaxation in pregnancy: implications in the pathogenesis of PE. *Lab Invest* 79: 1101 – 1111
42. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM (1994). Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 90: 649 – 652
43. Broudy VC (1997). Stem Cell Factor and Hematopoiesis. *Blood* 90(4):1345-1364
44. Broudy VC, Kovach NL, Bennett LG, Lin N, Jacobsen FW, Kidd PG (1994). Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor. *Blood*.83(8):2145-2152
45. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Song HY, Known BS, Warren RS, Donner DB (1995). Myeloid progenitor cells regulatory effects of vascular endothelial growth factor. *Int J Hematol* 62: 203 – 215
46. Brugaloras J & Kaelin WG Jr (2004). Dysregulation of HIF and VEGF is a unifying feature of the familiar hamartoma syndromes. *Cancer Cell*. Jul; 6(1): 1 – 10.
47. Buczek – Thomas JA & Nugent MA (1999). Elastase-mediated release of heparan sulfate proteoglycans from pulmonary fibroblast cultures. A mechanism for basic fibroblast growth factor (bFGF) release and attenuation of bfgf binding following elastase-induced injury. *J Biol Chem* 274: 25167 – 25172
48. Burgess WH & Maciag T (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 11: 575 – 606
49. Bussen S, Sutterlin M, Steck T (1999) Plasma endothelin and big endothelin levels in women with severe preeclampsia or HELLP syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 262(3 – 4): 113 – 119
50. Carbonne B, Mignot TM, Tsatsaris V, Ferre F. Changes in plasma and amniotic fluid endothelin levels during pregnancy: facts or artefacts? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998 Jan;76(1):15-9.
51. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435 – 439

52. Carpenter MW & Coustan DR (1982). Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 144:168-173
53. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, Smith SK (1994). Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and coriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 51: 524 – 530
54. Chen J, Wen A, Hong D (2000). Changes and significance of concentrations of serum vascular endothelial growth factor in patients with pregnancy induced hypertension (Abstract). *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi Feb*; 35(2): 72 – 74
55. Chen WY, Rogers AA, Lydon MJ (1992). Characterization of biologic properties of wound fluid collected during early stages of wound healing. *J Invest Dermatol* 99: 559 – 564
56. Cheng Z, Lin Q, Shen Z (2001) Study on association of vascular endothelial growth factor with the pathogenesis of pregnancy induced hypertension (Abstract). *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi Feb*; 36(2): 72 – 75
57. Cheung CY, Sing M, Ebaugh MJ, Brace RA (1995). Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 173: 753 – 759
58. Choi JW, Im MW, Pai SH, (2002). Nitric Oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 32: 257 – 263
59. Chow JFC, Lee KF, Chan STH, Yeung SBW (2001). Quantification of transforming growth factor  $\beta$ 1 mRNA expression in mouse preimplantation embryos and determination of TGF $\beta$  receptor (type I and type II) expression in mouse embryos and reproductive tract. *Molecular Human Reproduction*, November Vol. 7, No 11, 1047 – 1056.
60. Claffey KP, Wilkinson WO, Spiegelman BM (1992). Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* 267: 16317 – 16322
61. Clausen T, Djurovic S, Reseland JE, Berg K, Drevon CA, Henriksen T (2002) Altered plasma concentrations of leptin, transforming growth factor – beta (1) and plasminogen activator inhibitor type 2 at 18 weeks of gestation in women destined to develop pre – eclampsia. Circulating markers of disturbed placentation? *Placenta* May; 23(5): 380 – 385
62. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271: 736 – 741
63. Columbo M, Horowitz EM, Botana LM, MacGlashan DW, Bochner BS, Gillis S, Zsebo KM, Galli SJ, Lichtenstein LM (1992). The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol* 149(2):599-608

64. Conn G, Bayne M, Soderman L, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA (1990). Amino acid and cDNA sequence of a vascular endothelial -cell mitogen homologous to platelet – derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2628 – 2632
65. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JC, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470 – 1478
66. Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD (1993). Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *The FASEB Journal*, Vol 7, 566 – 571
67. Cooper JC, Sharkey AM, McLaren J, Charnock – Jones DS, Smith SK (1995). Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and deciduas by immunohistochemistry. *J Reprod Fertil* 105: 205 – 213
68. Coulier F, Pontarotti P, Roubin R, Hartung H, Goldfarb M, Birnbaum D (1997). Of worms and men: An evolutionary perspective on the fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor families . *J Mol Evol* 44: 43 – 56
69. Crisera CA, Maldonado TS, Kadison AS, Li M, Alkasab SL, Longaker MT, Gittes GK (2000). Transforming growth factor – beta 1 in the developing mouse pancreas: a potential regulator of exocrine differentiation. *Differentiation*. May; 65(5): 255 – 259
70. Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zaro M, Nieto I, Gimenez-Gallego G (1991). Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 254: 1208 – 1210
71. Cuevas P, Garcia-Calvo M, Carceller F, Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Munoz-Willery I, Martinez-Corso V, Lamas S, Gimenez-Gallego G (1996). Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11996 – 12001
72. Cullinan-Bove K & Koos RD (1993). Vascular endothelial growth factor/ Vascular Permeability Factor expression in the rat uterus: rapid stimulation correlates with estrogen – induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 133: 829 – 837
73. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ (1993) *William’s obstetrics* 19<sup>th</sup> ed Norwalk: Appleto, Lange; 122
74. Dabrosin C, Margetts PJ, Gauldie J (2003). Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. *Int J Cancer*. Nov 20;107(4):535-540
75. De Larco JE & Todaro GJ (1978). Growth factors from murine sarcoma virus – transformed cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4001 – 4005
76. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT (1992). The fms – like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989 – 991

77. Dekker GA, Kraayenbrink AA, Zeeeman GG, van Kamp GJ, (1991). Increased plasma levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 40: 215 – 220
78. Del Gobbo V, Giganti MG, Zenobi R, Villani V, Premrov MG (2000). The immunosuppressive cytokines influence the fetal survival in patients with pregnancy-induced hypertension. *Am J Reprod Immunol*. Oct;44(4):214-21.
79. Deng AY, Martin LL, Balwierzak JL, Jeng AY (1994). Purification and characterization of an endothelin degradation enzyme from rat kidney. *J Biochem (Tokyo)* 115: 120 – 125
80. Dennis P, Saksela O, Harpel P, Rifkin DB (1989).  $\alpha 2$  – macroglobulin is a binding protein for basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 264: 7210 – 7216
81. Depuis J, Goresky CA, Fournier A (1996). Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 81:1510-1515
82. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF (1994) Overexpression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 180: 1141 – 1146
83. Di Blasio AM, Carniti C, Vigano P, Florio P, Peraglia F, Vignali M (1997) Basic fibroblast growth factor messenger ribonucleic acid levels in human placentas from normal and pathological pregnancies. *Mol Hum Reprod Dec*; 3(12): 1119 – 1123
84. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor –  $\beta 1$  knock out mice. *Development* 121: 1845 – 1854
85. Dignas AU, Tsunekawa S, Podolsky DK (1994) Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 106: 1254 – 1262
86. Docagne F, Ali C, Lesne S, Nicole O, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D (2003) Does transforming growth factor – beta (TGF – beta) act as a neuroprotective agent in cerebral ischemia? *J Soc Biol* 197(2): 145 – 150
87. Duraisamy Y, Slevin M, Smith N, Bailey J, Zweit J, Smith C, Ahmed N, Gaffney J (2001). Effect of glycation on basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and activation of associated signal transduction pathways in vascular endothelial cells: possible relevance to wound healing in diabetes. *Angiogenesis* 4(4):277-288
88. Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650 – 1659
89. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/ Vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029 – 1039

90. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM, (1987). Fibrin containing gels induce angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 57: 673 – 686
91. Emori T, Hirata Y, Imai T, Eguchi S, Kano K (1993). Cellular mechanism of natriuretic peptides induced inhibition of endothelin – 1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology* 133: 2474 – 2480
92. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Kanno K, Eguchi S, Imai T, Schichiri M, Marumo F (1991). Cellular mechanism of endothelin – 1 release by angiotensin and vasopresin. *Hypertension* 18: 165 – 170
93. Engele J & Bohn MC (1992). Effects of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF) on glial precursor cell proliferation: age dependency and brain region specificity. *Dev Biol* Aug; 152(2): 363 – 372
94. Engelmann GL & Grutkoski PS (1994) Coordinate TGF – beta receptor gene expression during rat heart development. *Cell Mol Biol Res* 40(2): 93 – 104
95. Faber SC, Dimanlig P, Makarnkova HP, Shirke S, Ko K, Lang RA (2001). FGF receptor signaling plays a role in lens induction. *Development* 128: 4425 – 4438
96. Feinberg RF & Kliman HJ (1993). Tropho – uteronectin (TUN): a unique oncofetal fibronectin deposited in the extracellular matrix of the tropho – uteronectin junction and regulated in vitro by cultured human trophoblast cells. *Troph Res* 7: 167 – 179
97. Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ (1991) Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue to human implantation? *Am J Pathol* 138: 537 – 543
98. Feinberg RF, Kliman HJ, Wng C-L (1994). Transforming growth factor- $\beta$  stimulates trophoblast oncofetal fibronectin synthesis in vitro: implications for trophoblast implantation in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 78(6): 1241 – 1248
99. Ferrara N & Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor *Endo Rev.* 18: 4 – 25
100. Ferrara N & Henzel WJ (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin – binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851 – 858
101. Ferrara N, Cerver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’ Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439 – 442
102. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti – VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev Drug Discov.* May; 3(5): 392 – 400
103. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18 – 32



104. Ferri C, Bellini C, Desideri G, De Mattia G, Santucci A (1996). Endogenous insulin modulates circulating endothelin-1 concentrations in humans. *Diabetes Care*. May;19(5):504-6.
105. Ferriani RA, Ahmed A, Sharkey A, Smith SK (1994). Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblastic cell line JEG-3. *Growth Factors* 10(4): 259 – 268
106. Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P, Rifkin DB (1992). Basic fibroblast growth factor – induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol* 118: 901 – 909
107. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL (1993). Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3760-3764
108. Florkiewicz RZ & Sommer A (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non – AUG codons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3978 – 3981
109. Folkman J & Klagsburn M (1987). Angiogenic factors. *Science* 235: 442 – 447
110. Folkman J (1991) What is the evidence that tumors are angiogenesis – dependent? *J Natl Cancer Inst* 82:4 – 6
111. Fong GH, Rossant J, Gershenstein M, Breitman ML (1995). Role of flt – 1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66 – 70
112. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA (2000). Transforming growth factor –  $\beta$ : pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* 96(6): 2022 – 2036
113. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Wemer S (1995). Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 270: 12607 – 12613
114. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone D (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Med* 2: 1096 – 1103
115. Galazios G, Papazoglou D, Giagloglou K, Vassaras G, Koutlaki N, Maltezos E (2004). Umbilical cord serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preterm delivery or pre – eclampsia. *Int J Gynecol Obstet*;85(1): 6 – 11
116. Geissler EN, Liao M, Brook JD, Martin FH, Zsebo KM, Housman DE, Galli SJ (1991). Stem cell factor (SCF), a novel hematopoietic growth factor and ligand for c-kit tyrosine kinase receptor, maps on human chromosome 12 between 12q14.3 and 12qter. *Somat Cell Mol Genet*. Mar;17(2):297-214.

117. Gerber HP, Codeorelli F, Park J, Ferrara N (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt – 1 but not Flk-1/KDR, si up – regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 272: 23659 - 23667
118. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Maaki T, Duguid WP, Stewart DJ (1993). Expression of Endothelin-1 in the Lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328:1732-1739
119. Gilbert SF (1988). *Developmental Biology*. Sinauer, Sunderland, MA.
120. Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA, Meidan R, (1996). Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F 2 alpha. *Endocrinology.* Dec;137(12):5191-6.
121. Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazzieri R, Noguera I, Rifkin DB (1997). TGF –  $\beta$  Latency: Biological significance and mechanisms of activation. *Sem Cells* 15: 190 – 197
122. Gnarr JR, Zhou S, Merrill MJ, Wagner JR, Krumm A, Papavassiliou E, Oldfield EH, Klausner RD, Linehan WM (1996). Post – transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10589 – 10594
123. Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY (1993). Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 4: 121 – 133
124. Golfman LS, Hata T, Beamish RE, Dhalla NS (1993). Role of endothelin in heart and disease. *Can J Cardiol* 9: 635 – 653
125. Gonzalez AM, Buscaglia M, Ong M, Braid A (1990). Distribution o basic growth factor in the 18 – day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol* 110: 753 – 765
126. Gospodarowicz D, Braid A, Cheng J, Lui GM, Esch F, Bohlen P (1986). Isolation of fibroblast growth factor from bovine adrenal gland: physicochemical an biological characterization, *Endocrinology* 118: 82 – 90
127. Grande M, Carlstrom K, Stege R, Pousette A, Faxen M (2002). Estrogens affect endothelin-1 mRNA expression in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Eur Urol.* May;41(5):568-572; discussion 573-574
128. Grella PV, Massobrio M, Pecorelli S, Zichella L (1996). “Compendio de ginecologia e ostetricia” Monduzzi Editore p445.
129. Griffith TM, Edwards DH, Davis RL, Harrison TJ, Evans KT (1988). Endothelium – dependent responses in the peripheral microcirculation. In: Vanhoutte PM ed. *Relaxing and Contracting Factors*. Clifton NJ: Human pp 389 – 416

130. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D (1995). Both v – Ha – Ras and v- Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 270: 25915 – 25919
131. Halaban R, Fan B, Ahn J, Fumasaka Y, Gitay – Goren H, Neafeld G (1992). Growth factors, receptor kinase and protein tyrosine phosphate in normal and malignant melanocytes. *J Immunopathol* 12: 154 – 161
132. Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW (1962). *Human Embryology*. William & Wilkins, Baltimore.
133. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Hoffmeister H, Herrmann W, Rosenbaum P, Schmidt W (2004). Relationship between cytokine concentrations (FGF, sICAM-1 and SCF) in serum, follicular fluid and ICSI outcome. *Am J Reprod Immunol*. Jan;51(1):85-81
134. Han SW, Kim GW, Seo JS, Kim SJ, Sa KH, Park JY, Lee J, Kim SY, Goronzy JJ, Weyand CM, Kang YM (2004). VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford) Sept*; 43(9): 1173 – 1177
135. Hanneken AM, Ying W, Ling N, Braid A (1994). Identification of soluble forms of the fibroblast growth factor receptor in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9170 – 9174
136. Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman EL, Prasad PV, Keighley CS, Mannung WJ, Sellke FW, Simons M (1994). Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Inves* 94: 623 – 630
137. Hartnett ME, Lappas A, Darland D, McColm JR, Lovejoy S, D' Amore PA (2003). Retinal pigment epithelium and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble VEGF - dependent mechanism. *Exp Eye Res*. Nov; 77(5): 539 – 549
138. Heigl A, Lachat M, Lattmann T, Lusher T, Barton M (2002). Acute effects of beta-oestradiol on functional activity of endothelin-converting enzymes in human arteries and veins. *Clin Sci (Lond) Aug*;103 Suppl 48:438S-441S
139. Heimarth J, Krawczenko A, Dus D (2002). Endotehlin – 1 (ET – 1) as a mediator of pregnancy induced hypertension (PIH). *Ginecol Pol Jun*; 73(6): 512 – 516
140. Heinrich MC, Dooley DC, Keeble WW (1995). Transforming Growth Factor beta 1 inhibits expression of the gene products for steel factor and its receptor (c-kit).*Blood* 85(7):1769-1780
141. Heluy V, Germain G, Fournier T, Ferre F, Breuiller-Fouche M (1995). Endothelin ETA receptors mediate human uterine smooth muscle contraction. *Eur J Pharmacol*. Oct 4;285(1):89-94.
142. Hennessy A, Orange S, Willis N, Painter DM, Child A, Horvath JS (2002). Transforming growth factor –  $\beta$ 1 does not relate to hypertension in pre – eclampsia. *Clinical Experimental Pharmacol Physiol* 29: 968 – 971

143. Hill DJ, Flyvbjerg A, Arany E, Lauszus FF, Klebe JG (1997). Increased levels of serum fibroblast growth factor – 2 in diabetic pregnant women in retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 82(5): 1452 – 1457
144. Hill DJ, Tavaarwerk GJM, Arany E, Kilkenny D, Gregory M, Langford KS, Miell J (1995a) Fibroblast growth factor – 2 (FGF – 2) is present in maternal and cord serum and in the mother is associated with a binding protein immunologically related to the FGF receptor – 1. *J Clin Endocrinol Metab* 80(6): 1822 – 1831
145. Hill DJ, Tavaarwerk JM, Caddell C, Arany E, Kilkenny D, Gregory M (1995b). Fibroblast growth factor 2 is elevated in term maternal and cord serum and amniotic fluid in pregnancies complicated by diabetes: relationship to fetal and placental size. *J Clin Endocrinol* 80(9): 2626 – 2632
146. Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F (1989). Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 78: 225 – 228
147. Hohlagschwandther M, Knofler M, Ploner M, Zeisler H, Joura EA, Hussein P (2002). Basic fibroblast growth factor and hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 21(3): 235 – 241
148. Hollenbeck ST, Sakakibara K, Fries LF, Workhu B, Liu B, Kent KC (2004). Stem cell factor and c-kit are expressed by and may affect vascular SMCs through an autocrine pathway. *Journal of Surgical Research* 120(2):288-294
149. Hong HJ, Liu JC, Chan P, Juan SH, Loh SH, Lin JG, Cheng TH (2004). 17 $\beta$ -Estradiol downregulates angiotensin-II-induced endothelin-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *J Biomed Sci.* Jan-Feb;11(1):27-36
150. Honore` JC, Robert B, Vacher – Levenu MC, Chapron C, Breuiller –Fouche` M, Ferre` (2000). Expression of endothelin receptors in human myometrium during pregnancy and uterine leiomyomas. *J Cardiovasc Pharmacol* 35
151. Horie K, Yamashita H, Mogi A, Takenoshita S, Miyazono K (1996). Lack of transforming growth factor –  $\beta$  type II receptor expression in human retinoblastoma cells. *J Cell Physiol* 175: 305 – 313
152. Hoshikawa M, Ohbayashi N, Yonamine A, Konishi M, Ozaki K, Fukui S, Itoh N (1998). Structure and expression of a novel fibroblast growth factor, FGF – 17, preferentially expressed in the embryonic brain. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 187 – 191
153. Hosoda K, Nakao K, Arai H, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M (1991). Cloning and expression of human endothelin – 1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 287: 23 –26
154. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806 – 1814
155. Hu PPC, Datto MB, Wang XF (1998). Molecular mechanisms of transforming growth factor –  $\beta$  signaling. *Endocrine Reviews* 19(3): 349 – 363

156. Hu X & Zuckerman KS (2001). Transforming growth factor: signal transduction pathways, cell cycle mediation, and effects on hematopoiesis. *J Hematol Stem Cell Res* Feb; 10(1): 67 - 74
157. Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P (1993). The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol*. May;157(1):100-109
158. Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of kit-ligand:KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell* 3(3):349-362
159. Hughes SE, Crossman D, Hall PA (1993) Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc Res* 27: 1214 – 1219
160. Huneko O, Karmacharya J, Ong G, Kirschenr RE (2001). Toward an understanding of nonsyndromic craniosynostosis: altered patterns of TGF – beta receptor and FGF receptor expression induced by intrauterine head constraint. *Ann Plast Surg* May; 46(5): 546 – 553; discussion 553 – 554
161. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N (2000). Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension* 36: 965 – 969
162. Hurch A, Hurch R, Rooteh G eds (1994). Guidelines for blood sampling and measurement of pH and blood gas values in obstetrics. *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol*. 54: 165 – 175
163. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W (1995). Hypoxia – induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270: 19761 – 19766
164. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA (1996) Negative regulation of hypoxia – inducible genes by the von Hippel – Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10595 – 10599
165. Imai T, Hirata Y, Emori T, Marumo F (1993). Heparin has an inhibitory effect on endothelin – 1 syntehsis and release by endothelial cells. *Hypertension* 21: 353 – 358
166. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989). The human endothelin family : three structurally and pharmacologically distinct isopeptids predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2863 – 2867
167. Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K, Onimaru M, Sugiura T, Sueishi K, Shirasuna K (2001). Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol*. Jan;37(1):77-83

168. Ishigooka H, Kitaoka T, Boutilier SB, Bost LM, Aotaki – Keen AE, Tablin F, Hjelmeland LM (1993). Developmental expression of bFGF in in the bovine retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci Aug*; 34(9): 2813 – 2823
169. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M (1993). Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest. Jul*;92(1):398-403
170. Jackman HL, Morris PW, Rabito SF, Johansson GB, Skidgel RA, Erdos EG (1993). Inactivation of endothelin – 1 by an enzyme of the vascular endothelial cells. *Hypertension* 21: 925 – 928
171. Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N (1993). Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 133: 848 – 859
172. Jo T, Takauchi Y, Nakajima Y, Fukami K, Kosaka H, Terada N (1998). Maternal or umbilical venous levels of nitrite/ nitrate during pregnancy and at delivery. *In Vivo*, 12: 523 – 526
173. Johnson AG, Nguyen TV, Owe-Young R, Williamson DJ, Day RO (1996). Potential mechanisms by which nonsteroidal anti-inflammatory drugs elevate blood pressure: the role of endothelin-1. *J Hum Hypertens. Apr*;10(4):257-61
174. Jones SL (1998). HELLP! A cry for laboratory assistance: a comprehensive review of HELLP syndrome highlighting in the role of the laboratory. *Hematopathol Mol Hematol* 11(3 – 4):147 – 171
175. Juan SH, Chenn JJ, Chen CH, Cheng CF, Liu JC, Hsieh MH, Chen YL, Chao HH, Chen TH, Chan P, Cheng TH (2004). 17 $\beta$ -Estradiol inhibits cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression within vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol Sep*;287(3):H1254-1261
176. Kamijo T, Rajabi MR, Mizunuma H, Ibuki Y (1998). Biochemical evidence for autocrine/ paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse implantation in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 990 – 998
177. Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga S, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Bennett W, Schreiner GF, Johnson RJ (2001). Post – cyclosporine – mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280: F727 – F736
178. Kaski JC, Elliott PM, Salomone O, Dickinson K, Gordon D, Hann C, Holt DW (1995). Concentration of circulating plasma endothelin in patients with angina and normal coronary angiograms. *British Heart Journal.* 74:620-624
179. Katsutoshi G (2001). Basic and therapeutic relevance of Endothelin-mediated regulation. *Biol. Pharm. Bull.* 24(11)1219-1230

180. Kauma S, Huff T, Krystal G, Ryan J, Takacs P, Turner T (1996). The expression of stem cell factor and its receptor, c-kit in human endometrium and placental tissues during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* Mar;81(3):1261-1266
181. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT 1989 Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to platelet derived growth factor. *Science* 246: 1309 – 1312
182. Keller JR, Ortiz M, Ruscelli FW (1995). Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem progenitor cells in the absence of cell division. *Blood* 86:1757-1764
183. Khaliq A, Dunk C, Jiang J, Shams M, Li XF, Acevedo C, Weich H, Whittle M, Ahmed A (1999). Hypoxia down – regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up – regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for “placental hyperoxia” in intrauterine growth restriction. *Lab Invest.* Feb; 79(2): 151 – 170
184. Kim YG, Suga SI, Kang DH, Jefferson JA, Mazzali M, Gordon KL, Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Shankland SJ, Hughes J, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ (2000). Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Kidney Int* 58: 2390 – 2399
185. Kingdom JC & Kaufmann P (1999). Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol* 474: 259 – 275
186. Kiowski W, Sutsch G, Hunziker P, Muller P, Kim J, Oechslin E, Schmitt R, Jones R, Bertel O (1995). Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet* Sep 16;346(8977):732-736
187. Klagsbrun M, Simth S, Sullivan R, Shing Y Davidson S, Smith JA, Sasse J (1987). Multiple forms of basic fibroblast growth factor: amino – terminal cleavages by tumor cell – and brain cell – derived acidic proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1839 – 1843
188. Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ (2004). Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol.* Aug 1; 87(2): 95 – 104
189. Klein S, Giancotti FG, Presta M, Albelda SA, Buck CA, Rifkin DB (1993). Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 4: 973 – 982
190. Klimpel GR, Chopra AK, Langley KE, Wypych J, Annable CA, Kaiserlian D, Ernst PB, Peterson JW (1995). A role for stem cell factor and c-kit in the murine intestinal tract secretory response to cholera toxin. *J Exp Med* 182:1931-1942
191. Klimpel GR, Langley KE, Wypych J, Abrams JS, Chopra AK, Niesel DW (1996). A role for stem cell factor (SCF):c-kit interaction(s) in the intestinal tract response to *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med* 184:271-276

192. Kohno M, Horio T, Yokokawa K, Kurihara N, Takeda T (1992a). C – type natriuretic peptide inhibits thrombin – and angiotensin II – stimulated endothelin release via cyclic guanosine 3', 5' – mono – phosphate. *Hypertension* 19: 320 – 325
193. Kohno M, Yokokawa K, Horio T, Yasunari K, Murakawa K, Takeda T (1992b). Atrial and brain natriuretic peptides inhibit the endothelin – 1 secretory response to angiotensin II in porcine aorta. *Circ Res* 70: 241 – 247
194. Kojima S, Kiyomitsu N, Rifkin DB (1993). Requirement for transglutaminase in activation of latent transforming growth factor –  $\beta$  in bovine endothelial cells. *J Cell Biol* 121: 439 – 448
195. Kourembanas S, Mcquillan LP, Leung GK, Faller DV (1993). Nitric oxide regulates the expression of growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest* 92:99-104
196. Kraayenbrink AA, Dekker GA, van Kamp GJ, van Geijn HP (1993). Endothelial vasoactive mediators in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 169: 160 – 165
197. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V (1998). The effect of an endothelin receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 338:784-790
198. Kuchan MJ & Fragos JA (1993). Shear stress regulates endothelin – 1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 264: H150 – 156
199. Kurz C, Hefler L, Zeisler H, Schatten C, Hussein P, Tempfer C (2001). Maternal basic fibroblast growth factor serum levels are associated with pregnancy – induced hypertension. *J Soc Gynecol Investig* Jan – Feb; 8(1): 24 – 26
200. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, Koga S, Clauss M, Pinsky DJ, Lyn P, Leavy J, Witte L, Joseph-Silverstein J, et al (1995). Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 9;92(10):4606-10
201. Lawrence DA (1991). Identification and activation of latent transforming growth factor beta. *Methods Enzymol* 198: 327 – 336
202. Lawrence DA (1996). Transforming growth factor beta: a general review. *Eur Cytokine Netw Sep*; 7(3): 363 – 374.
203. Lazzereschi D, Ranier A, Mincione G, Taccogna S, Nardi F, Colletta G (1997). Human malignant thyroid tumors displayed reduced levels of transforming growth factor  $\beta$  receptor type II messenger RNA and protein 57: 2071 – 2075
204. Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M (1992). Growth Factor requirements for survival in  $G_0$  and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4013-4017



205. Legrand EK, Burke JF, Costa DE, Kiorpes TC (1993). Dose response effects of PDGF – BB, PDGF – AA, EGF and bFGF on granulation tissue in a guinea pig partial thickness skin excision model. *Growth Factors* 8: 307 – 314
206. Lennartsson J, Shivakrupa R, Linnekin D (2004). Synergic growth of Stem Cell Factor and Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor involves kinase-dependent and –independent contributions from c-kit. *Journal of Biochemical Chemistry* 279(43):44544-44553
207. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC (1991). Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Eng J Med* Oct 325(14):997-1001
208. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen *Science* 246: 1306 – 1309
209. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA (1996). Post – transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271: 2746 – 2753
210. Li CL & Johnson GR (1994). Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* 84:408-414
211. Li CL & Johnson GR (1995). Murine hematopoietic stem and progenitor cells: Enrichment and biologic characterization. *Blood*. Mar 15;85(6):1472-9.
212. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP 1999 Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284: 1534 – 1537
213. Li J, Brown LF, Hibberd MG, et al. 1996 VEGF, flk – 1,flt – 1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 270: 1803 – 1811
214. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endego WO, Zhou F, LeeM 1995 Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin – 1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270 –312
215. Liu A, Dardik A, Ballermann BJ (1999). Neutralizing TGF – beta 1 antibody infusion in neonatal rat delays in vivo glomerular capillary formation 1. *Kidney Int* Oct; 56(4): 1334 – 1348
216. Livingston JC, Chin R, Haddad B, McKinney ET, Ahokas R, Sibai BM (2000). Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 183: 1554 – 1557
217. Longley BJ, Morganroth GS, Tyrrell L, Ding GT, Anderson DM, Williams DE, Halaban R (1993). Altered Metabolism of Mast-Cell Growth Factor (c-kit Ligand) in cutaneous Mastocytosis. *Blood* 328:1302-1307.

218. Lu HS, Clogston CL, Wypych j, Fausset PR, Lauren S, Mendiaz EA, Zsebo KM, Langley KE (1991). Amino acid sequence and post-translational modification of stem cell factor isolated from buffalo rat liver cell-conditioned medium. *Biol Chem*, 226(13):8102-8107
219. Luscher TF & Barton M (2000). Endothelins and Endothelin Receptor Antagonists. *Circulation* 102(19):2434
220. Luscher TF, Boulanger CM, Yang Z, Dohi Y (1992). Interaction between endothelin and endothelium-derived relaxing factor(s). in: In: Rubayani GM (Ed), *Endothelin*, Oxford University Press, New York
221. Lyall F, Greer IA, Boswell F, Fleming R (1997). Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in pre – eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 104: 223 – 228
222. Lyman SD & Jacobsen SEW (1998). C-kit ligand and flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91: 1101-1134
223. Lyons KM, Jones CM, Hogan BLM (1991). The DVR gene family in embryonic development. *Trends Genet.* 7, 408 – 412
224. Lysiak JJ, Hunt J, Pringle GA, Lala PK (1995). Localization of transforming growth factor beta and its natural inhibitor decorin in the human placenta and deciduas throughout gestation. *Placenta* Apr; 16(3): 221 – 231
225. Maeda S, Miyauchi T, Waku T, Koda Y, Kono I, Goto K, Matsuda M (1996). Plasma endothelin-1 level in athletes after exercise in a hot environment: exercise-induced dehydration contributes to increases in plasma endothelin-1. *Life Sci*;58(15):1259-68.
226. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli – Bovi P, Persico MG (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 9267 – 9271
227. Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS (1996). Transforming growth factor beta – 1 downregulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk – 1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 271: 11500 – 11505
228. Markowitz S, Wang J, Myeroff L et al. 1995 Inactivation of the type II TGF –  $\beta$  receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336 – 1338
229. Marziali G, Lazzaro D, Sorrentino V (1993). Binding of germ cells to mutant Sld Sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of c-kit ligand. *Dev Biol.* May;157(1):182-190
230. Massague J (1990) The transforming growth factor – beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597 – 641
231. Mateo AO & De Artinano AA (1997). Highlits on endothelins: a review. *Pharmacol Res* 36(5): 339 – 351

232. Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, Sekido Y, Nishida K, Seto M, Seito T, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T (1993). Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol* 142:339-346
233. Matsui J, Wakabayashi T, Asada M, Yoshimatsu K, Okada M (2004). Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 279(18):18600-18607
234. McLennan IS & Koishi K (2004). Fetal and maternal transforming growth factor – beta 1 may combine to maintain pregnancy in mice. *Biol. Reprod. Jun*; 70(6): 1614 – 1618
235. McLennan IS, Poussart Y, Koishi K (2000). Development of skeletal muscles in transforming growth factor – beta 1 (TGF – beta 1) null – mutant mice. *Dev Dyn Mar*: 217(3): 250 – 256
236. McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM (1991). Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp Hematol Mar*;19(3):226-231
237. McWhirter JR, Goulding M, Weiner JA, Chun J, Murre C (1997). A novel fibroblast growth factor gene expressed in the developing nervous system is a downstream target of the chimeric homeodomain oncoprotein E2A – Pbx1. *Development* 124: 3221 – 3232
238. Medler RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK (1996). During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nature Med* 2: 992 – 997
239. Merduri G, Bausero P, Perrot-Appiant M (2000). Expression of vascular endothelial growth factor in the human endothelium: modulation during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 62: 439 – 447
240. Mignatti P & Rifkin DB (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 73: 161 – 195
241. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB (1989). In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor – induced proteinases. *J Cell Biol* 108: 671 – 682
242. Millauer B, Wizigmann Voos S, Schurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A (1993). High affinity VEGF – binding and developmental expression suggest Flk – 1 as major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72: 835 – 846
243. Miller DW, Jousen AM, Holz FG (2003). The molecular mechanisms of age – related macular degeneration. *Ophthalmology. Feb*; 100(2): 92 – 96

244. Miller V & Burnett JC (1992). Modulation of NO and endothelin by chronic increases in blood flow in canine femoral arteries. *Am J Physiol* 263: H103 – 108
245. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71: 374 – 381
246. Mirkin S, Navarro F, Arcer DF (2003). Hormone therapy and endometrial angiogenesis. *Climacteric*. Dec;6(4):273-277
247. Miyake A, Konishi M, Martin FH, Hernday NA, Ozaki K, Yamamoto S, Mikami T, Arakawa T, Itoh N (1998). Structure and expression of a novel member, FGF – 16, of the fibroblast growth factor family. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 148 – 152
248. Miyazawa K, Williams DA, Gotoh A, Nishimaki J, Broxmeyer HE, Toyama K (1995). Membrane bound steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* 85:641-649
249. Montesano R (1992). Regulation of angiogenesis in vitro. *Eur J Clin Invest* 22: 504 – 515
250. Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Manejias R, Rifkin DB (1987). Mr 25,000 d heparin – binding protein from guinea pig brain is a high molecular weight form of basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5778 – 5782
251. Moses HL, Petenpol JA, Mungen K, Murphy CS, and Yang EY (1991). TGF beta regulation of epithelial cell proliferation: role of tumor suppressor genes. *Princess Takamatsu Symp*, January 1, 1991; 22: 183 – 195
252. Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP (1995). Wild type p53 and v – Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 55: 6161 – 6165
253. Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE, D' Amore PA (2001). Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn* 220: 112 – 121
254. Nicosia R, Nicosia SV, Smith M (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet – derived growth factor and indulin – like growth factor stimulate angiogenesis in vitro. *Am J Path* 145: 1023 – 1029
255. Nishikawa S, Miyamoto A, Yamamoto H, Ohshika H, Kudo R (2000). The relationship between serum nitrate and endothelin – 1 concentrations in preeclampsia. *Life Sci* Aug 11; 67(12): 1447 – 1454
256. Norman JE, Thomson AJ, Telfer JF, Young A, Greer IA, Cameron IT (1999). Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. *Molecular Human Reproduction* vol.5 no.2 pp 175 – 181.
257. Nova A, Sibai BM, Barton JR, Mercer BM, Mitchell MD (1991). Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 165: 724 – 727

258. Nunes I, Shapiro RL, Rifkin DB 1995 Characterization of latent TGF – beta activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 155: 1450 – 1459
259. Ohbayashi N, Hoshikawa M, Kimura S, Yamasaki M, Fukui S, Itoh N (1998). Structure and expression of the mRNA encoding a novel fibroblast growth factor, FGF – 18. *J Biol Chem* 273: 18161 – 18164
260. Ohkubo S, Ogi K, Hosoya M, Matsumoto H, Suzuki N, Kimura C, Ondo H, Fujino M (1990). Specific expression of human endothelin – 2 (ET – 2) gene in a renal adenocarcinoma cell line. *FEBS Lett* 274: 136 – 140
261. Opgenorth TJ, Wessale JL, Dixon DB, Adler AL, Calzadilla SV, Padley RJ, Wu – Wong JR, (2000). Effects of endothelin receptor antagonists on the plasma immunoreactive Endotehlin – 1 level. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36 (Suppl 1): S292 – S296
262. Orr-Urtreger A, Givol D, Yayon A, Yarden Y, Lonai P (1991). Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* 113: 1419 – 1434
263. Osada K, Tsunoda H, Miyaushi T, Sugishita Y, Kybo T, Goto K (1997). Pregnancy increases ET –1 induced contraction and changes receptor subtypes in uterine smooth muscle in humans. *Am J Physiol* 272: R541 – R548
264. Oshima M, Oshima H, Taketo MM (1996). TGF –  $\beta$  receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179: 297 – 302
265. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, Henninger DD, Janjic N, Floege J. (1999). VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 104: 913 – 923
266. Pandiella A, Bosenberg MW, Huang EJ, Besmer P, Massague J (1992). Cleavage of membrane-anchored growth factors involves distinct protease activities regulated through common mechanisms. *J Biol Chem* 267(33):24028-24033
267. Party V, Amaud E, Amalric F, Prats H (1995). Involvement of basic fibroblast growth factor NH<sub>2</sub> terminus in nuclear retenzion. *Growth Factors* 11: 163 – 174
268. Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E (1996). Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor – alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98: 490 – 496
269. Pepper MS (1997). Transforming growth factor beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* Mar; 8(1): 21 – 43.
270. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plaminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 902 – 908

271. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 824 – 831
272. Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1994). In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res* 210: 298 – 305
273. Perantoni AO, Dove LF, Karavanova I (1995). Basic fibroblast growth factor can mediate the early inductive events in renal development. *Dev Biol* 92: 4696 – 4700
274. Perez-Vizcaino F, Cooper AC, Corder R, Fournier A, Warner ED (1995). Rapid degradation of endothelin – 1 by an enzyme released by the rat isolated perfused mesentery. *Br J Pharmacol* 114: 867 – 871
275. Perrella MA, Jain MK, Lee ME (1998). Role of TGF – beta in vascular development and vascular reactivity. *Miner Electrolyte Metab*, January 1; 24(2 – 3): 136 – 143
276. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K (1994). Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor –  $\beta$  in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 269: 6271 – 6274
277. Peters KG, De Vries C, Williams LT (1993). Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8915 – 8919
278. Phillips LG, Abdulah KM, Geldner PD, Dobbins S, Ko G, Linares HA, Broemeling LD, Robson WC (1993). Application of basic fibroblast growth factor may reverse diabetic wound healing impairment. *Ann Plast Surg* 31: 331 – 334
279. Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A (1992). Platelet – derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor –  $\beta$ 1 and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am Pathol* 140: 1375 – 1388
280. Pinto FM, Armesto CP, Magraner J, Trujillo M, Martin JD, Canderas ML (1999). Tachykinin receptor and neutral endopeptidase gene expression in the rat uterus: characterization and regulation in response to ovarian steroid treatment. *Endocrinology* 140: 2526 – 2532
281. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 Cells. *EMBO J* 8: 3801 – 3806
282. Power LL, Popplewell EJ, Holloway JA, Diaper ND, Warner JO, Jones CA (2002). Immunoregulatory molecules during pregnancy at birth. *Jul – Aug*; 56(1 – 2): 19 – 28.
283. Prats H, Kaghad H, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA, Cput D (1989). High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1836 – 1840

284. Presta M, Rusanti M, Maier JA, Ragnotti G (1988). Purification of basic fibroblast growth factor in the rat brain: identification of a Mr 22,000 immunoreactive form. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 1161 – 1172
285. Presta M, Statuto M, Rusanti M, Dell' Era P, Ragnotti G (1989). Characterization of a Mr 25,000 basic fibroblast growth factor form in the adult, regenerating and fetal rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 1182 – 1189
286. Prins BA, Hu RM, Nazario B, Pedram A, Frank HJL, Weber MA, Levin ER (1994). Prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 269: 11938 – 11944
287. Prud' homme GJ & Piccirillo CA (2000). The inhibitory effects of transforming growth factor – beta – 1 (TGF – beta 1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun*, February 1; 14(1): 23 – 42.
288. Qiu FH, Ray P, Brown K, Baker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P (1988). Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family- oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus
289. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT (1993). Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7533 – 7537
290. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS (1995). Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: Implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 55: 4575 – 4580
291. Rakugi H, Tabuchi Y, Nakamura M, Nagano M, Higashimori K, Mikemi H (1990). Evidence of endothelin – 1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 973 – 977
292. Rama S, Suresh Y, Rao AJ (2001). Regulation of telomerase during human placental differentiation: a role for TGFbeta1. *Mol Cell Endocrinol. Sep*; 182(2): 233 – 248
293. Redmer DA, Kraft KC, Kirsch JD, Reynolds LP (1998). Expression and localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovine placenta during late pregnancy. *Biol Reprod* 58 (suppl 1): 202.
294. Reisenbichler H, Chari RS, Boyer IJ, Jirtle RL (1994). Transforming Growth Factor –  $\beta$  receptors type I, II and III in Phenobarbital – promoted rat liver tumors. *Cancerogenesis* 15: 2763 – 2767
295. Reuvekamp A, Velsing-Aarts FV, Poulina IE, Capello JJ, Duits AJ (1999). Selective deficit of angiogenic growth factors characterizes pregnancies complicated by pre – eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 106: 1019 – 1022
296. Reynolds LP & Redmer DA (2001). Angiogenesis in the Placenta. *Biology of Reproduction* 64, 1033 – 1040

297. Reynolds LP, Kirsch JD, Kraft KC, Redmer DA (1998a). Time – course of the uterine response to estradiol – 17 $\beta$  in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. *Biol Reprod* 59: 606 – 612
298. Reynolds LP, Kirsch JD, Kraft KC, Redmer DA (1998b). Time – course of the uterine response to estradiol – 17 $\beta$  in ovariectomized ewes: expression of angiogenic factors. *Biol Reprod* 59: 613 – 620
299. Reynolds LP, Maddock KR, Kraft KC, Kirsch JD, Redmer DA (1998c). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovine uterine and placental tissues of early pregnancy. *Mol Biol Cell* 9(suppl): 314a
300. Rifkin DB & Moscatelli D (1989). Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 109: 1 – 6
301. Riley SC, Wong E, Findlau JK, Salamonsen LA (1995). Localization of neutral endopeptidase in the ovine uterus and conceptus during the oestrous cycle and early pregnancy. *Reprod Fertil Dev* 7: 27 – 33
302. Roberts AB (1998). Molecular and cell biology of TGF – beta. *Miner Electrolyte Metab* 24(2 – 3): 111 – 119
303. Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ (1980). Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3494 – 3496
304. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK (1989). Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol.* 161: 1200 – 1204
305. Roberts WG & Palade G (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 108: 2369 – 2379
306. Roberts WG & Palade GE (1997). Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 57: 765 – 772
307. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 80: 283 – 285
308. Russo LG, Maharajan P, Maharajan V (1998). Basic fibroblast growth factor (FGF – 2) in mouse tooth morphogenesis. *Growth Factors* 15(2): 125 – 133
309. Saijo Y, Maeda K, Nakaya Y, Kamada M, Mitani R, Endo S, Irahara M, Yamano S, Aono T (2001). Altered sensitivity to a novel vasoconstrictor endothelin – 1 (1 – 31) in myometrium and umbilical artery of women with severe preeclampsia. *Biochem Biophys Res Commun* Sept 7; 286(5): 964 – 967
310. Sakamoto A, Yanagisawa M, Sakurai M, Takawa Y, Masaki T (1991). Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 656 – 663



311. Saksela O & Rifkin DB (1990). Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol* 110: 767 – 775
312. Sakurai T, Yanagisawa M, Inoue A, Ryan US, Kimura S, Mitsui I, Goto K, Masaki T (1991). cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat pre – proendothelin – 1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 175: 44 – 47
313. Sarkar S, Petiot A, Copp A, Ferretti P, Thorogood P (2001). FGF2 promotes skeletogenic differentiation of cranial neural crest cells. *Development* 128: 2143 – 2152
314. Savas A, Ince S, Coskum M, Durmaz S, Yegin O (1998). Stem cell factor (SCF) levels in newborns. *Am J Perinatol*. Jul;15(7):427-429
315. Schilling B & Yeh J (2000). Transforming growth factor – beta (1), - beta(2), - beta (3) and their type I and II receptors in human term placenta. *Gynecol Obstet Invest*. 50(1): 19 – 23
316. Schwartz SM & Liaw L (1993). Growth control and morphogenesis in the in the development and pathology of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 21[Suppl]: S31 – S49
317. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983 – 985
318. Shaamash AH, Elsnosy ED, Makhlof AM, Zakhari MM, Ibrahim OA, EL-dien HM (2000). Maternal and fetal serum nitric oxide (NO) concentrations in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet*. Mar;68(3):207-14
319. Shalabi F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gersenstein M, Wu X-F, Breitman M, Schuh AC (1995). Failure of blood island formation and vasculogenesis in flk – 1 deficient mice. *Nature* 376: 62
320. Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK (1993). Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil*. 99: 609 – 615
321. Sharkey AM, Cooper JC, Balmforth JR, McLaren J, Clark DE, Charnock-Jones DS, Morris NH, Smith SK (1996). Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre – eclampsia. *Eur J Clin Invest* 26: 1182 – 1185
322. Shiba R, Sakurai T, Yamada G, Morimoto H, Saito A, Masaki T, Goto K (1992). Bloning and expression of rat preproendothelin – 3 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 588 – 594
323. Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe RB (1994). In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 316 – 322

324. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo K-T, Yeo T-K, Allende M, Folkman J, D'Amore PA (1995b). Hypoxic induction of vascular endothelial cell growth factors in the retina: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the sole mitogen. *Mol Med* 2: 64 – 71
325. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA (1995a) Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* 1: 182 – 193
326. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1994). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia – induced angiogenesis. *Nature* 359: 843 – 845
327. Siemester G, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny – Baron G, Marme D (1996). Reversion of degranulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel – Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 56: 2299 – 2303
328. Simson MS, Wann S, Mene P (1989). Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c – fos expression and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 83: 708 – 712
329. Singgaard-Andersen O & Huch R (1995). The oxygen status of fetal blood. *Acta Anaesthesiol Scand* 39, Supplement 107: 129 – 135
330. Singh HJ, Rahman A, Larmie ET, Nila A (2001). Endothelin – 1 in feto – placental tissues form normotensive pregnant women and women with pre – eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* Feb; 80(2): 99 – 103
331. Slater M & Murphy CR (2000). Transforming growth factors alpha and beta – 1 are co – expressed in the uterine epithelium during early pregnancy. *Cell Tissue Res*. May; 300(2): 315 – 320
332. Smikle CB, Dandekar PV, Schriock ED, Givens CR (1998). Elevated ovarian follicular fluid stem cell factor concentrations are associated with improved pregnancy rates in in-vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility* 69(1):70-71
333. Smith P, Rhodes NP, Ke Y, Foster CS (2002). Upregulation of estrogen and androgen receptors modulate expression of FGF-2 and FGF-7 in human, cultured, prostatic stromal cells exposed to high concentrations of estradiol. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 5(2):105-110
334. Smith P, Rhodes NP, Ke Y, Foster CS (2004). Relationship between upregulated oestrogen receptors and expression of growth factors in cultured, human, prostatic stromal cells exposed to estradiol or dihydrotestosterone. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 7(1):57-62
335. Sommer A, Brewer D, Thompson RC, Moscatelli D, Presta M, Fikkin DB (1987). A form of human fibroblast growth factor with an extended aminoterminal. *Biochem Biophys Res Commun* 144: 543 – 550

336. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia – induced genes. *Mol Cell Biol* 15: 5363 – 5368
337. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P (1991). Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infraction. *J Am Coll Cardiol* Jul 18(1):38-43
338. Stoner M, Wormke M, Saville B, Samudio I, Qin C, Abdelrahim M, Safe S (2004). Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins
339. Story MT, Esch F, Shimasaki S, Sasse J, Jacobs SC, Lawson RK (1987). Amino – terminal sequence of large form of basic fibroblast growth factor isolated from human benign prostatic hyperplastic tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 702 – 709
340. Sudo N, Kamoi K, Ishibashi M, Yamaji T (1993). Plasma endothelin – 1 and big endothelin – 1 levels in women with preeclampsia. *Acta Endocrinol* 129: 114 – 120
341. Sugo S, Minamino N, Shoji H, Isumi Y , Nakao K, Kangawa K, Matsuo H (2001). **Regulation of endothelin-1 production in cultured rat vascular smooth muscle cells.** *J Cardiovasc Pharmacol*, January 1; 37(1): 25-40.
342. Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rckenbacher P, Bertel O (1998). Short-Term Oral Endothelin-Receptor Antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98:2262-2268
343. Szabo S, Folkman J, Vattay A, Morales RE, Pinkys GS, Kato K (1994). Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutant of basic fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterology* 106: 1106 – 1111
344. Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J (1994). Latent transforming growth factor beta – 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF – beta binding protein. *J Cell Biol* 124: 171 – 181
345. Takeji T, Nakaya Y, Kamada M, Maeda K, Saijo Y, Mitani R, Isahara M, Aono T (2000). Effect of a novel vasoconstrictor endothelin – 1 (1 – 31) on human umbilical artery. *Biochem Biophys Res Commun* Apr 13; 270(2): 622 – 624
346. Tanosaki R, Ashihara E, Alessandrini L, Migliaccio G, Migliaccio AR (1999). Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and leukemia inhibitory factor (LIF) protect the repopulating ability of purified murine hematopoietic stem cells in serum-deprived cultures stimulated with SCF and IL-3. *Ann Ist Super Sanita*. 1999;35(4):553-62.
347. Tassis E, Al – Attar A, Aigner A, Swift MR, McDonnell K, Karavanov A, Wellstein A (2001). Enhancement of Fibroblast Growth Factor (FGF) Activity by an FGF – Binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* Vol 276, Issue Oct 26: 40247 – 40253

348. Taylor RN, Varma M, Teng NNH, Roberts JM (1990). Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1675 – 1677
349. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1579 – 1586
350. Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 266: 11947 – 11954
351. Toksoz D, Zsebo KM, Smith KA, Hu S, Brankow D, Suggs SV, Martin FG, Williams DA (1992). Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. Aug 15;89(16):7350-7354
352. Tomoda T, Shirasawa T, Yahagi YI, Ishii K, Takagi H, Furiya Y, Arai KI, Mori H, Maramatsu MA (1996). Transforming growth factor – beta is a survival factor for neonate cortical neurons: coincident expression of type I receptor in developing cerebral cortices. *Dev Biol* Oct; 10; 179(1): 79 – 90
353. Tong X, Li S, Zhao Y (1999). Expression of endothelin – 1 and endothelin – 1 mRNA in placental villus of pregnancy induced hypertension and the changes of plasma endothelin – 1. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi Jan*; 34(1): 11 – 3
354. Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* Apr 1; 208(1): 166 – 188
355. Tsuboi R, Shi CM, Rifkin DB, Ogawa H (1992). A wound healing model using healing – impaired diabetic mice. *J Dermatol* 19: 673 – 675
356. Tudor RM, Fook BE, Coelkel NF (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 95: 1798 – 1807
357. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 9709 – 9716
358. Vagner S, Gensac MC, Maret A, Bayard F, Amalric F, Prats H, Prats AC (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* 15: 35 – 44
359. Vagner S, Touriol C, Galy B, Audigier S, Gensac MC, Amalric F, Bayard F, Prats H, Prats AC (1996). Translation of CUG – but not AUG – initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J Cell Biol*: Dec; 135 (5): 1391 – 1402

360. Wang H, Keiser JA, Olszewski B, Rosebury W, Robertson A, Kovcsdi I, Gordon D (2004) Delayed angiogenesis in aging rats and therapeutic effect of adenoviral gene transfer of VEGF.
361. Wang L, Xiong M, Che D, Liu S, Hao C, Zheng X (2000). The effect of hypoxia on expression of basic fibroblast growth factor in pulmonary vascular pericytes. *J Tongji Med Univ*;20(4):265-7
362. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB (1996). Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* Nov 15;271: 29483 – 29488
363. Webb CM, Ghatgei MA, McNeill JG, Collins P (2000). 17 $\beta$ -Estradiol decreases endothelin-1 levels in the coronary circulation of postmenopausal women with coronary artery disease. *Circulation*. Oct 3;102(14):1617-1622
364. Wershil BK, Tsai M, Geissler EN, Zsebo KM, Galli SJ (1992). The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces c-kit receptor-dependent mouse mast cell activation in vivo. Evidence that signaling through the c-kit receptor can induce expression of cellular function. *J Exp Med* 175:245-255
365. Wheeler T, Elcocl CL, Anthony FW (1995). Angiogenesis and the placental environment. *Placenta* 16: 289 – 296
366. Wheeler T, Evans PW, Anthony FW, Godfrey KM, Howe DT, Osmond C (1999) Relationship between maternal serum vascular endothelial growth factor concentration in early pregnancy and fetal and placental growth. *Hum. Reprod.* Jun; 1619 – 1623
367. Whitworth JA (2003). World Health Organization (WHO)/ International Society of Hypertension (ISH) statement on the management of Hypertension. *J Hypertens* 21:1983-1992
368. Wolff K, Nisell H, Carlstrom K, Kublickiene K, Hemsén A, Lunell NO, Lindblom B (1996). Endothelin – 1 and big Endothelin – 1 levels in normal term pregnancy and in preeclampsia. *Regul Pept* Dec 17; 67(3): 211 – 216
369. Wulff C, Wilson H, Lague P, Duncan WC, Armstrong DG, Fraser HM (2000). Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, Tie – 2 and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J Endocrinol Metab* 84(11): 4302 – 4309
370. Yallampalli C, Garfield RE (1997). Uterine contractile responses to endothelin – 1 and endothelin receptors are elevated during labor. *Biol Reprod* 51: 640 – 645
371. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J (1993). flk – 1, an flt – related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118: 489 – 498
372. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsuri Y, Yasaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature (Lond)* 332: 411 – 415

373. Yang Z & Liu P (2001) Role of vascular endothelial growth factor in the genesis of pregnancy induced hypertension and its relationship with nitric oxide (Abstract). *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi Mar*; 36(6): 143 – 145
374. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6:3341-3351
375. Yeh J & Osathanondh R (1993). Expression of Messenger Ribonucleic acids encoding for basic fibroblast growth factor (FGF) and alternatively spliced FGF receptor in human fetal ovary and uterus. *J Clin Endocrinol Metab* 77(5): 1367 – 1371
376. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Mandal AK, Yanagisawa M, Takeda T (1993). Heparin regulates endothelin production through endothelium – derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest* 92: 2080 – 2085
377. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, Nakagawa K, Hamada T, Otani S, Yanagisawa M, Takeda T (1991). Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma *Ann Intern Med*. Feb 1;114(3):213-215
378. Zelzer E, McLean W, Ng Y – S, Fukai N, Reginato AM, Lovejoy S, D' Amore PA, Olsen BR (2002). Skeletal defects in VEGF<sup>120/120</sup> mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 129: 1893 – 1904
379. Zhao Y & Young SL (1995). Expression of transforming growth factor –  $\beta$  type II receptor in rat lung is regulated during development. *Am J Physiol* 269: L419 – L426
380. Zhou L, Dey CR, Wert SE, Whitsett JA (1996) Arrested lung morphogenesis in transgenic mice bearing an SP – C – TGF –  $\beta_1$  chimeric gene. *Dev Biol* 175: 227 – 238
381. Zsebo KM, Wypych J, McNiece IK, Lu HS, Smith KA, Karkare SB, Sachdev RK, Yuchenkoff VN, Birkett NC, Williams LR, Satyagal VN, Tung W, Bosselman RA, Mendiaz EA, Langley KE (1990). Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell Oct* 5;63(1):195-201
382. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Sep 22; 100 Suppl 1: S10 – S18