

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
της Κούκουρα Ουρανίας
Επιμελήτριας Β' Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής
Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας

**Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟΜΑΤΩΝ
ΕΚΤΡΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

ΕΥΓΕΝΙΟΣ ΚΟΥΜΑΝΤΑΚΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΚΑΝΑΒΑΚΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

**ΜΑΪΟΣ 2011
ΗΡΑΚΛΕΙΟ**

στο Γιάννη, τον Κώστα και την Κατερίνα

στους γονείς μου και την αδελφή μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελίδα
Ευχαριστίες	3
Βιογραφικό	4
Δημοσιεύσεις και Ανακοινώσεις των αποτελεσμάτων	8
Περίληψη	10
Αγγλική περίληψη	19
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΠΡΩΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	
1.1 Εισαγωγή	28
1.2 Ταξινόμηση	30
1.3 Επιδημιολογία	31
1.4 Δημιουργία και λειτουργία της εμβρυοπλάκουντιακής μονάδας	32
1.5 Αιτιολογία	38
1.6 Διάγνωση	48
1.7 Παρακολούθηση	51
1.8 Χρόνος Τοκετού	60
1.9 Τρόπος τοκετού	61
1.10 Πρόγνωση μετά τη γέννηση	62
1.11 Συμπεράσματα	63
ΔΕΥΤΕΡΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	
2.1 Εισαγωγή	65
2.2 Χρωμοσωμικές διαταραχές	65
2.3 Μωσαϊκισμός του πλακούντα	66
2.4 Γονιδιακή αποτύπωση	66
2.5 Μονογονεϊκή δισωμία (UPD)	68
2.6 Γονίδια αποτύπωσης και εμβρυϊκή ανάπτυξη	70
ΤΡΙΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ	
3.1 Εισαγωγή	73
3.2 Μηχανισμός	74
3.3 Ρόλος	76
3.4 Διαταραχές στο μηχανισμό μεθυλίωσης	77
3.5 Μεθυλίωση και εμβρυϊκή ανάπτυξη	79
ΤΕΤΑΡΤΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ INSULIN GROWTH FACTOR II (IGF2) ΚΑΙ H19 ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	
4.1 Το γονίδιο Insulin Growth Factor 2 (IGF2)	83
4.2 Το γονίδιο H19	84
4.3 Μεταγραφή, αποτύπωση και μεθυλίωση των IGF2/H19	85
4.4 Επίδραση του περιβάλλοντος στην έκφραση των IGF2/H19	87
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Εισαγωγή	90
Σχεδιασμός	91
Αποτελέσματα	98
Συζήτηση	110
Συμπεράσματα	119
Βιβλιογραφία	123
Δημοσιεύσεις αποτελεσμάτων σε διεθνή περιοδικά	139

Ευχαριστίες

Το κομμάτι αυτό της διδακτορικής διατριβής αποτελεί μία ευκαιρία για να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση της ειδικότερα, αλλά και γενικότερα στην επιστημονική και επαγγελματική μου πορεία έως τώρα.

Ευχαριστώ πολύ τον *Γιώργο Δελημπαλατσάκη*, Διευθυντή της Χειρουργικής Κλινικής του Νοσοκομείου Σητείας ο οποίος υπήρξε ο πρώτος μου δάσκαλος στη Χειρουργική. Η θεώρηση του για την ιατρική και τη ζωή αποτελεί για μένα ένα πρότυπο που δύσκολα μπορεί κάποιος να μιμηθεί.

Ευχαριστώ πολύ το *Σταύρο Σηφάκη*, επιμελητή της Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ. Ήταν όλα αυτά τα χρόνια δίπλα μου επιστημονικά αλλά και σαν κλινικός δάσκαλος, πάντα ακούραστος οραματιστής και πολύτιμος σύμβουλος. Η διατριβή αυτή δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την ουσιαστική στήριξη και καθοδήγηση του.

Ευχαριστώ πολύ τον *Απόστολο Ζαραβίνο*, βιολόγο, που βοήθησε ουσιαστικά στο πειραματικό μέρος της διατριβής, και που είχε την αντοχή, την ικανότητα και την εμπειρία να ξεπεράσει πολλά εμπόδια που προέκυπταν στην πορεία και να δίνει άμεσες λύσεις.

Ευχαριστώ πολύ τη *Σοφία Αποστολίδου*, βιολόγο, που βοήθησε στο τελικό πειραματικό μέρος της μελέτης, καθώς και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Ιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Εργαστηρίου Επιγενετικής του UCL του Λονδίνου.

Ευχαριστώ πολύ τον καθηγητή *Δημήτριο Σπαντίδο*, ο οποίος ήταν δίπλα μου σε όλη αυτή την προσπάθεια, με καθοδηγούσε επιστημονικά και με ενθάρρυνε να συνεχίσω.

Ευχαριστώ τους συνεπιβλέποντες καθηγητές *Ευγένιο Κουμαντάκη* και *Εμμανουήλ Καναβάκη* για την υποστήριξη όλης αυτής της προσπάθειας.

Ευχαριστώ πολύ τους συνοδοιπόρους μου στην ειδικότητα και αγαπημένους φίλους, *Μανώλη Αυγουστινάκη*, *Νικήτα Μαντά*, *Γιώργο Πέτσα* και *Δημήτρη Κουτρουλάκη*.

Ευχαριστώ πολύ τη *Μαρία Πατρινέλη* για το χαμόγελο και την αισιοδοξία της, που φροντίζει για το καλώς έχειν της ψυχής μου από τότε που μπορώ να θυμηθώ, και τις *Μαρία Χατζηγιάννου* και *Ρένα Κώστα* που φρόντιζαν για το καλώς έχειν των παιδιών μου όλο αυτό το διάστημα και ελπίζω για πολύ ακόμα.

Όλη αυτή η προσπάθεια αυτών των χρόνων δεν θα είχε νόημα αν δεν είχα να τη μοιραστώ με κάποιον σημαντικό για μένα, το σύζυγο μου *Γιάννη Χατζηγιάννου*. Εδώ και δέκα χρόνια προχωράμε μπροστά με κοινούς στόχους, στηρίζοντας και παρακινώντας ο ένας τον άλλο.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ : ΚΟΥΚΟΥΡΑ
ΟΝΟΜΑ : ΟΥΡΑΝΙΑ
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ : ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ : ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ : 15.12.1971
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ : Έγγαμη με δύο παιδιά με τον ΩΡΛ
Γιάννη Χατζηγιάννου

ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ : **1990-1997** Τμήμα Ιατρικής Σχολής
Επιστημών Υγείας Εθνικού
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
με το σύστημα των Πανελληνίων
Εξετάσεων

ΠΤΥΧΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ : **28/7/1997**
Βαθμός: *Λίαν Καλώς.*
Αρ. Πτυχίου: 324/31/7/1996

ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ : **15/9/97**
Νομ. Αυτοδιοίκηση Αθηνών-Πειραιώς
Α.Π. Υ19443/3/9/1997

ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ : **22/9/1997 – 16/12/1998**
Περιφερειακό Ιατρείο Ζάκρου - Κέντρο
Υγείας Σητείας (Νομός Λασιθίου Κρήτη)

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ : **17/12/1998 – 16/12/1999**
Ειδικευόμενη Χειρουργικής Κλινικής
Νομαρχιακού Γενικού Νοσοκομείου
Σητείας
9/3/2000 – 31/8/2003
Ειδικευόμενη Μ/Γ Κλινικής Νομαρχιακού
Γενικού Νοσοκομείου Αγίου Νικολάου &
Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου
Ηρακλείου (14 μήνες κανονική
ειδικευόμενη και στη συνέχεια
υπεράριθμη ειδικευόμενη με εξάμηνες
παρατάσεις των συμβάσεων)
04/3/2004 – 5/5/2007
Ειδικευόμενη Μ/Γ Κλινικής
Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου
Ηρακλείου

ΤΙΤΛΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ : **18/7/2007** Αρ Απόφασης: 6099
Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Ηρακλείου
Διεύθυνση Δημόσιας Υγείας

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ ΩΣ ΕΙΔΙΚΟΣ : **25/11/2007 – 5/2/2008** Έμμισθη
μαιευτήρας γυναικολόγος στο Εθνικό

Σύστημα Υγείας της Μεγάλης Βρετανίας, εξειδικευόμενη στη χειρουργική πυελικού εδάφους και ενδοσκοπική χειρουργική BENENDEN HOSPITAL KENT UK
18/2/2008 – 25/7/2008 Έμμισθη clinical fellow UNIVERSITY HOSPITAL OF WALES CARDIFF UK
28/7/2008 – 3/2/2009 Έμμισθη μαιευτήρας γυναικολόγος στο Εθνικό Σύστημα Υγείας της Μεγάλης Βρετανίας, εξειδικευόμενη στη χειρουργική πυελικού εδάφους και ενδοσκοπική χειρουργική BENENDEN HOSPITAL KENT UK
16/4/2009 – 15/4/2010 Επικουρική επιμελήτρια μαιευτικού γυναικολογικού τμήματος Γενικού Νοσοκομείου Αιγίου
1/5/2010 – 1/3/2011 άσκηση ελεύθερου επαγγέλματος, «Γεννημα» κέντρο γυναικολογίας και αναπαραγωγής.
8/3/2011 Επιμελήτρια Β' Μαιευτικής Γυναικολογίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΒΡΑΒΕΙΑ - ΧΟΡΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ	6
ΠΛΗΡΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	19
ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΒΛΗΘΕΙ ΠΡΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	3
ΠΛΗΡΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	15
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	9
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ	11
ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ ΣΕ ΒΙΒΛΙΑ	6
ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ	5
ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ	10
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	
ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	30
ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	68
ΠΡΟΕΔΡΕΙΟ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	2
ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ	10

ΠΛΗΡΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Matalliotakis I, Mahutte NG, Koukoura O, Arici A. Endometriosis associated with Stage IA clear cell ovarian carcinoma in a woman with IVF-ET treatments in the Yale Series. *Arch Gynecol Obstet.* 2006;274(3):184-6.
2. Matalliotakis I, Kourtis A, Koukoura O, Panidis D. Polycystic ovary syndrome: etiology and pathogenesis. *Arch Gynecol Obstet.* 2006;274(4):187-97
3. Koukoura O, Sifakis S, Stratoudakis G, Mantas N, Kaminopetros P, Koumantakis E. A case report of recurrent anencephaly and literature review. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2006;33(3):185-9.
4. Sifakis S, Angelakis E, Avgoustinakis E, Fragouli Y, Mantas N, Koukoura O, Vardaki E, Koumantakis E. A randomized comparison between intravaginal misoprostol and prostaglandin E(2) for labor induction. *Arch Gynecol Obstet.* 2007;275(4):263-7.
5. Koukoura O, Mantas N, Linardakis H, Hajioannou J, Sifakis S. Successful term pregnancy in a patient with Wegener's granulomatosis: case report and literature review. *Fertil Steril.* 2007 May 19
6. Sifakis S, Mantas N, Koumantakis G, Koukoura O. Prenatal diagnosis of gallbladder duplication. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Sep;30(3):362-3
7. Mantas N, Sifakis S, Koukoura O, Avgoustinakis E, Koumantakis E. Intraabdominal Umbilical Vein Dilatation and Term Delivery. A Case Report and Review of the Literature. *Fetal Diagn Ther.* 2007 Jul 24;22(6):431-434
8. Sifakis S, Mantas N, Konstantinidou A, Koukoura O, Avgoustinakis E, Koumantakis E. A stillborn fetus with amniotic band syndrome and elevated levels of α -fetoprotein plus β -human chorionic gonadotropin: A case report. *Fetal Diagn Ther* 2008;24:111-4
9. Konstantinidou A, Sifakis S, Koukoura O, Mantas N, Agrogiannis G, Patsouris E. Pancreatic aplasia in a fetus with asplenia - cardiovascular defect - heterotaxy (Ivemark) syndrome. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 2008;82: 601-4
10. Sifakis S, Koukoura O, Mantas N, Velissariou V, Koumantakis E. Hydrops fetalis, thickened placenta and other sonographic findings in a low level trisomy 21 mosaicism: a case report. *Fetal Diagn Ther* 2008; 24(3): 310-2
11. Sifakis S, Koukoura O, Konstantinidou A, Kikidi K, Prezerakou M, Kaminopetros P. Sonographic findings in severe fetomaternal transfusion. *Arch Gynecol Obstet.* 2009 May 22
12. Ammar K, Koukoura O. Successful management of two cases of menorrhagia with hydrothermal ablation. *J Minim Invasive Gynecol.* 2009 Nov-Dec;16(6):795-7
13. Sifakis S, Koukoura O, Mantas N, Papadopoulou E, Hajioannou J, Vlahakis G, Matalliotakis I. Antenatal diagnosis of duodenal atresia in dizygotic twins associated

with congenital hearing impairment. *Journal of Maternal Fetal & Neonatal Medicine* 2011 Jan 13

14. Sifakis S, Soufla G, Koukoura O, Koutroulakis D, Maiz N, Konstantinidou A, Spandidos DA. Annexin A5 mRNA placental expression in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Thromb Res* 2010;125(4):326-31
15. Jadhav J, Koukoura O, Jourder R, Edmonds S. Urethral diverticulum mimicking an anterior vaginal wall prolapse. *Journal of Minimally Invasive Gynecology* 2010;17(3):390-2
16. Gourvas V, Sifakis S, Dalpa E, Soultziz N, Koukoura O, Spandidos D. Reduced placental prolyl hydroxylase 3 mRNA expression in pregnancies affected by fetal growth restriction. *BJOG* 2010; 117(13):1635-42
17. Koutsaki M, Sifakis S, Zaravinos A, Koutroulakis D, Koukoura O, Spandidos D. Decreased placental expression of hPGH, IGF-I and IGFBP-1 in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Growth Horm IGF Res* 2011; 21(1):31-6
18. Koukoura O, Sifakis S, Zaravinos A, Apostolidou S, Jones A, Hajioannou J, Widschwendter M, Spandidos D. Hypomethylation along with increased *H19* expression in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Placenta* 2011;32(1):51-7

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ	
Διεθνή	8
Ελληνικά	11
ΣΥΝΕΔΡΙΑ	
Διεθνή	16
Ελληνικά	57
ΟΜΙΛΙΕΣ	
ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ	8
ΦΟΙΤΗΤΕΣ	3
ΚΟΙΝΟ	2
ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ	10
ΣΥΝΕΔΡΙΑ	10

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΤΩΝ
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

1. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

- Koukoura O, Sifakis S, Zaravinos A, Apostolidou S, Jones A, Hajjioannou J, Widschwendter M, Spandidos D. Hypomethylation along with increased *H19* expression in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Placenta* 2011;32(1):51-7
- Koukoura O, Sifakis S, Soufla G, Zaravinos A, Apostolidou S, Jones A, Widschwendter M, Spandidos D. Loss of imprinting and aberrant methylation of IGF2 in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. Έχει υποβληθεί στο American Journal of Obstetrics and Gynecology

2. Δημοσιεύσεις σε ελληνικά περιοδικά

Κούκουρα Ουρ, Σηφάκης Σ, Κουμαντάκης Ευγ. Διαταραχές του μηχανισμού μεθυλίωσης και ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου. Ιατρικά Χρονικά της Κρήτης (25) 2006:σελ1,3

3. Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- Koukoura O, Sifakis S, Zaravinos A, Konstantinidou A, Mantas N, Matalliotakis I, Spandidos DA. Reduced IgF2 placental expression in pregnancies with intrauterine growth restriction. 8th World Congress in Fetal Medicine, Portorose Slovenia, 28 June-2 July 2009
- Koukoura O, Sifakis S, Apostolidou S, Zaravinos A, Koutroulakis D, Widschwendter M, Spandidos DA. Methylation pattern of H19 imprinted gene

in the placenta of normal and IUGR-affected pregnancies. 8th World Congress in Fetal Medicine, Portorose Slovenia, 28 June-2 July 2009

4. Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

- Κούκουρα Ο, Σηφάκης Σ, Ζαραβίνος Α, Κουτρουλάκης Δ, Σούφλα Γ, Ματαλλιωτάκης Ι, Σπαντίδος Δ. Διαταραχές στην έκφραση του γονιδίου αποτύπωσης IGF2 σε πλακούντες κυήσεων με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη. 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Αθήνα 28-31 Μαΐου 2009
- Κούκουρα Ο, Σηφάκης Σ, Ζαραβίνος Α, Apostolidou S, Μαντάς Ν, Ματαλλιωτάκης Ι, Widschwendter M, Σπαντίδος ΔΑ. «Μειωμένη έκφραση και διαταραχές στην αποτύπωση και το μηχανισμό μεθυλίωσης των γονιδίων IGF2 και H19 που σχετίζονται με την εμβρυϊκή ανάπτυξη, σε πλακούντες κυήσεων με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη». 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Θεσσαλονίκη, 18-20 Σεπτεμβρίου 2009. Δημοσίευση της περίληψης στην Περιγεννητική Ιατρική & Νεογνολογία, 2009; 4(3):26

5.Χορηγία

- Χορηγία «Γ. Παπανικολάου» 2006 ύψους 22000 ευρώ της Ελληνικής Μαιευτικής και Γυναικολογικής Εταιρείας 2006. Κούκουρα Ουρ, Σηφάκης Σ, Σουφλα Γ, Σουρβίνος Γ, Σπαντίδος Δ. «Διαταραχές στη μεθυλίωση γονιδίων αποτύπωσης και ανώμαλη πλακουντιακή τους έκφραση ως αιτιολογικός παράγοντας ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (ΕΥΑ) (intrauterine growth restriction IUGR) περιγράφει μία κατάσταση κατά την οποία το έμβρυο δεν μπορεί να αναπτυχθεί όσο του υπαγορεύει η γενετική του προδιάθεση. Τα νεογνά που γεννιούνται με ΕΥΑ είναι μικρότερα για τη δεδομένη ηλικία κύησης (μικρά για την ηλικία κύησης, small for gestational age SGA), και το βάρος τους είναι κάτω από την 10^η ή 5^η ή 3^η εκατοστιαία θέση για την ηλικία κύησης, σύμφωνα με διαφορετικούς ορισμούς. Είναι πολύ σημαντικό να είμαστε σε θέση να διαγνώσουμε τα νεογνά που είναι μικρά για την ηλικία κύησης επειδή είχαν υπολειπόμενη ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής τους, σε σχέση με αυτά που είναι «προγραμματισμένα» για να γεννηθούν μικρά. Τα νεογνά της πρώτης κατηγορίας, εμφανίζουν βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην ανάπτυξη και υγεία τους γιατί ουσιαστικά κάποιος βλαπτικός παράγοντας επέδρασε στην ομαλή αύξηση τους κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής τους με αποτέλεσμα να μην αναπτυχθούν όσο θα μπορούσαν με βάση τη γενετική τους προδιάθεση.

Οι αιτιολογικοί παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία της ΕΥΑ έχουν παραδοσιακά χωριστεί σε 3 κατηγορίες: μητρικοί, εμβρυϊκοί και μητροπλακουντιακοί παράγοντες. Η πλακουντιακή ανεπάρκεια όμως αφορά την πλειοψηφία των περιπτώσεων ΕΥΑ. Η συνεχιζόμενη έρευνα για την ανεύρεση των παθογενετικών μηχανισμών της ΕΥΑ έχει συσχετίσει διαφορετικά γενετικά αίτια με την εμφάνιση της παθολογικής αυτής οντότητας. Παρόλα αυτά δεν έχει βρεθεί κάποιος παράγοντας ο οποίος μπορεί να προβλέψει την εμφάνιση ΕΥΑ από τα αρχικά στάδια της κύησης, ή να μπορεί να εξηγήσει την

παθοφυσιολογία της νόσου. Οι έρευνες σε μοριακό επίπεδο θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διαλεύκανση των διεργασιών που αφορούν την ΕΥΑ, η οποία είναι ξεκάθαρο πλέον ότι δεν αποτελεί μία μεμονωμένη νόσο, αλλά ένα σύμπτωμα πολλών διαφορετικών επιπλοκών της κύησης.

Τα γονίδια αποτύπωσης αποτελούν μία κατηγορία γονιδίων που σχετίζονται με την αύξηση και τη λειτουργία του πλακούντα, και κατά συνέπεια αποτελούν ιδανικούς υποψηφίους για τη μελέτη γενετικών μηχανισμών που σχετίζονται με διαταραχές στην πλακουντιακή λειτουργία που συνεπάγονται καθυστέρηση της ανάπτυξης του εμβρύου. Η αποτύπωση αποτελεί ένα μοριακό μηχανισμό κατά τον οποίο μόνο το ένα αλληλόμορφο από ένα ζεύγος γονιδίων εκφράζεται, και εξαρτάται από την προέλευση του χρωμοσώματος του (μητρική ή πατρική) το κατά πόσο θα εκφραστεί ή όχι. Αυτή η ελεγχόμενη έκφραση, ρυθμίζεται από επιγενετικούς μηχανισμούς όπως η μεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση της κυτοσίνης μπλοκάρει τον μηχανισμό μεταγραφής ενός γονιδίου. Η μεθυλίωση στους εκκινητές των γονιδίων έχει σαν αποτέλεσμα την μη αναγνώριση τους από τους παράγοντες μεταγραφής και την RNA πολυμεράση, αφού οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες προτιμούν να συνδέονται με μία πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται μεθυλ-κυτοσίνη συνδετική πρωτεΐνη ή MeCP. Όταν η περιοχή ενός εκκινητή αναγνωριστεί από έναν παράγοντα μεταγραφής ως μεθυλιωμένη, τότε η μεταγραφή θα ανασταλεί.

Πολλά γονίδια αποτύπωσης εκφράζονται σε σημαντικό βαθμό στον πλακούντα και επηρεάζουν τη λειτουργία και τη μορφολογία του. Τα πατρικής προέλευσης εκφραζόμενα γονίδια ευνοούν την ανάπτυξη του εμβρύου, ενώ αντίθετα τα μητρικής προέλευσης εκφραζόμενα γονίδια «φρενάρουν» την ανεξέλεγκτη παροχή συστατικών προς το έμβρυο με στόχο την εξοικονόμηση πόρων προς όφελος της μητέρας και των επόμενων κυήσεων.

Τα γονίδια IGF2 και H19 αποτελούν δύο γονίδια αποτύπωσης που μοιράζονται κοινούς μεταγραφικούς μηχανισμούς αλλά με αντίθετο τρόπο και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου. Το γονίδιο IGF2 εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο και ευνοεί την ανάπτυξη του εμβρύου ενώ το μητρικό αλληλόμορφο δεν μεταγράφεται. Αντίθετα το μητρικό αλληλόμορφο του γονιδίου H19 είναι εκείνο που εκφράζεται και αν και δεν κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, θεωρείται πως έχει ιδιότητες που καταστέλλουν την ανάπτυξη. Ερευνητικές μελέτες έχουν καταδείξει συγκεκριμένες περιοχές των δύο γονιδίων που έχουν διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης σε κάθε αλληλόμορφο με αποτέλεσμα να ελέγχουν την έκφραση τους. Πιο συγκεκριμένα, μία περιοχή με διαφορετικό προφίλ μεθυλίωσης (Differentially Methylated Region DMR) που εδράζεται μεταξύ των δύο γονιδίων, είναι υπεύθυνη για την αντίθετη αποτύπωση των δύο γονιδίων. Αν η περιοχή αυτή είναι υπομεθυλιωμένη, τότε επιτρέπεται η σύνδεση της με τον παράγοντα CTC Factor (CTCF) ο οποίος εμποδίζει την δράση διεγερτών στους εκκινητές του IGF2 με αποτέλεσμα το IGF2 να μη μεταγράφεται και να μεταγράφεται το H19. Αντίθετα αν η συγκεκριμένη περιοχή είναι μεθυλιωμένη η πρόσδεση του παράγοντα CTCF δεν επιτρέπεται με αποτέλεσμα οι διεγέρτες να επιδρούν στους εκκινητές του IGF2 και να μεταγράφεται το IGF2 και να μην εκφράζεται το H19. Συνεπώς υπό φυσιολογικές συνθήκες το μητρικό αλληλόμορφο είναι υπομεθυλιωμένο και το IGF2 δεν μεταγράφεται σε αυτό ενώ μεταγράφεται το H19. Το αντίθετο ισχύει για το πατρικό αλληλόμορφο.

Διαταραχές στην έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων έχουν συσχετιστεί με σύνδρομα διαταραχών της ανάπτυξης πριν και μετά τη γέννηση αλλά υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα που να αφορούν το ρόλο τους στην ΕΥΑ. Οι διαταραχές στον ευαίσθητο επιγενετικό έλεγχο της λειτουργίας των γονιδίων αποτύπωσης, θα μπορούσε να αποτελέσει έναν σημαντικό συνδετικό κρίκο μεταξύ περιβαλλοντικών

παραγόντων και εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στην παρούσα ερευνητική μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος των γονιδίων αποτύπωσης IGF2 και H19 στην παθογένεση της EYA. Πιο συγκεκριμένα η υπόθεση η οποία ελέγχθηκε είναι κατά πόσο τα συγκεκριμένα γονίδια τα οποία έχουν θεμελιώδη ρόλο στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, εμφανίζουν ανώμαλη έκφραση σε πλακουντιακούς ιστούς κυήσεων με EYA σε σύγκριση με την έκφραση σε πλακούντες από φυσιολογικές κυήσεις. Διερευνήσαμε ταυτόχρονα αν παρατηρούνται διαταραχές στον μηχανισμό αποτύπωσης που μπορεί να συσχετιστούν με ανώμαλη έκφραση. Τέλος μελετήσαμε το επιγενετικό προφίλ αυτών των γονιδίων στους ίδιους ιστούς και πιο συγκεκριμένα συγκρίναμε τα επίπεδα μεθυλίωσης συγκεκριμένων περιοχών των γονιδίων που αποτελούν ρυθμιστικές περιοχές της αποτύπωσης, στις δύο υπό μελέτη ομάδες. Η βασική υπόθεση που προσπαθήσαμε να επαληθεύσουμε, είναι κατά πόσο διαταραχές στο μηχανισμό μεθυλίωσης μπορεί να έχουν άμεση επίδραση στο μοντέλο αποτύπωσης των IGF2/H19 και κατά συνέπεια στην έκφραση τους, και κατά πόσο αυτή η αλυσιδωτή μοριακή βλάβη, εφόσον υπάρχει, μπορεί να επηρεάσει την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Συλλογή Υλικού

Συλλέχθηκαν συνολικά 30 ιστοί που αποτελούσαν προϊόντα αποβολής πρώτου τριμήνου και 31 τεμάχια πλακουντιακού ιστού από κυήσεις με EYA και 17 τεμάχια πλακουντιακού ιστού από τελειόμηνες κυήσεις με ομαλή έκβαση που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Η διάγνωση της ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης είχε γίνει με διαδοχικές υπερηχογραφικές εκτιμήσεις κατά τη διάρκεια της κύησης. Το

πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στα δείγματα πλακουντιακού ιστού από τις δύο ομάδες κυήσεων.

Πειραματικό μέρος

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA από τους πλακουντιακούς ιστούς με το πρωτόκολλο φαινόλης/χλωροφορμίου, και εκχύλιση RNA με το πρωτόκολλο του Trizol. Η ποσότητα του RNA υπολογίστηκε με φωτομέτρηση. Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με το kit της Promega. Οι αντιδράσεις της real-time PCR πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Mx3000P real-time PCR system. Η έκφραση του δομικού γονιδίου Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) χρησιμοποιήθηκε για την ομαλοποίηση των επιπέδων έκφρασης των *IGF2* και *H19*. Χρησιμοποιήθηκαν, τρία σετ primers για το *IGF2* και ένα σετ primers για το *H19*. Ελέγχθηκαν τρεις πολυμορφισμοί για το *IGF2* και ένας για το *H19*. Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης 3%. Η εξέταση δύο πολυμορφισμών έγινε μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα.

Η ανάλυση της μεθυλίωσης έγινε με τη μέθοδο MethyLight μετά από μετατροπή του DNA με όξινο θειώδες νάτριο. Το ποσοστό των πλήρως μεθυλιωμένων μορίων σε μία συγκεκριμένη περιοχή του γονιδίου υπολογίστηκε μετά από διαίρεση του λόγου ΓΟΝΙΔΙΟ:COL2A1 ενός δείγματος με το λόγο ΓΟΝΙΔΙΟ:COL2A1 του DNA Sssl-επεξεργασμένων λευκών αιμοσφαιρίων και πολλαπλασιασμένο επί 100. Η συντόμευση PMR (Percentage of Methylated Reference) υποδηλώνει την παραπάνω μέτρηση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το βάρος γέννησης ήταν μικρότερο από την 5^η εκατοστιαία θέση για όλες τις κυήσεις με ΕΥΑ και μεταξύ της 10^{ης} και 90^{ης} για της κυήσεις της ομάδας ελέγχου. Δεκατέσσερα IUGR δείγματα και 8 control ήταν ετερόζυγα για το H19. Δεκαέξι πλακούντες από την ομάδα των IUGR και 9 από την ομάδα ελέγχου ήταν ετερόζυγοι για τον *IGF2*. Από τα συνολικά 22 ετερόζυγα δείγματα για το *H19*, απώλεια της αποτύπωσης (Loss Of Imprinting, LOI) διαπιστώθηκε σε 5 δείγματα, 4 από τα οποία ήταν φυσιολογικά και ένα παθολογικό. Από τα συνολικά 25 ετερόζυγα δείγματα για τον *IGF2*, διαπιστώθηκε απώλεια της αποτύπωσης σε 9 δείγματα, όλα προερχόμενα από την ομάδα με την ΕΥΑ.

Τα επίπεδα πλακουντιακής έκφρασης ήταν ελαττωμένα στην ομάδα των IUGR ($P=0.01$) για τον *IGF2* και αυξημένα για το *H19* ($P=0.04$). Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση της έκφρασης των δύο γονιδίων με άλλες παραμέτρους όπως εμβρυϊκή ανάπτυξη, χαρακτηριστικά της μητέρας, βαρύτητα της υπολειπόμενης ανάπτυξης ή ηλικία κύησης. Η έκφραση και των δύο γονιδίων δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των πλακουντιακών ιστών που είχαν φυσιολογική και ανώμαλη αποτύπωση.

Μελετήθηκαν 3 περιοχές που υπό κανονικές συνθήκες εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό μεθυλίωσης μεταξύ μητρικού και πατρικού χρωμοσώματος (DMR). Η μία DMR που μελετήθηκε ήταν στους εκκινητές του γονιδίου *IGF2* στα εξόνια 2/3, η άλλη περιοχή αφορούσε την DMR του εκκινητή του *H19* και τέλος την περιοχή που ελέγχει την αποτύπωση και των δύο γονιδίων (Imprinting Control Region ICR) η οποία βρίσκεται μεταξύ των δύο γονιδίων, πριν από τους εκκινητές του *H19*. Οι πλακούντες με ΕΥΑ είχαν μικρότερη μέση τιμή PMR στους εκκινητές του *IGF2* σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (23.3% και 29.6% αντίστοιχα $P=0,05$). Οι τιμές της μεθυλίωσης δεν διέφεραν μεταξύ των δειγμάτων που είχαν απώλεια της

αποτύπωσης (LOI) και σε όσα είχαν φυσιολογική αποτύπωση (MOI). Επιπλέον, οι παθολογικοί πλακούντες είχαν χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στους εκκινητές του *H19* σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (22.3% και 32.4% αντίστοιχα $P=0.02$). Παρόλα αυτά δεν υπήρξε συσχέτιση της μεθυλίωσης και των διαταραχών της αποτύπωσης. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης και των επιπέδων mRNA των αντίστοιχων γονιδίων και δια τις δύο περιοχές που μελετήθηκαν.

Τα ποσοστά μεθυλίωσης στην περιοχή που ελέγχει την αποτύπωση και των δύο γονιδίων (ICR) ήταν παρόμοια και στις δυο ομάδες δειγμάτων που μελετήθηκαν. Αν και οι πλακούντες που είχαν απώλεια της αποτύπωσης για τον *IGF2*, εμφάνιζαν υψηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης σε σχέση με όσα διατηρούσαν τη μεθυλίωση, η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη προκύπτουν συμπεράσματα αλλά ανακύπτουν και κάποια ερωτήματα. Η μειωμένη έκφραση του *IGF2* αποτελεί ένα εύρημα το οποίο έχει αναφερθεί και παλιότερα σε κυήσεις με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη. Έχει βρεθεί πως η μειωμένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου έχει συσχετιστεί με μειωμένη ικανότητα διάχυσης θρεπτικών ουσιών από τον πλακούντα προς το έμβρυο. Η μειωμένη έκφραση του *IGF2* που βρήκαμε στην παρούσα μελέτη, μπορεί να συνδέεται με τον αιτιολογικό μηχανισμό της EYA ή να αποτελεί αποτέλεσμα της πλακουντιακής δυσλειτουργίας. Όσον αφορά τη αυξημένη έκφραση του *H19* στους πλακούντες κυήσεων με EYA, αποτελεί ένα καινούριο εύρημα, που όμως έχει ήδη συσχετιστεί με καθυστερημένη ανάπτυξη μετά τον τοκετό σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια.

Η διαταραχή της αποτύπωσης που είχε ως αποτέλεσμα την διαλληλική έκφραση του *IGF2* παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε παθολογικούς πλακούντες. Η ανωμαλία αυτή έχει αναφερθεί και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις που αφορούν τον πλακούντα όπως η μύλη κύηση και η προεκλαμψία. Δεν υπήρξε όμως η αναμενόμενη αυξημένη έκφραση του *IGF2* στα δείγματα που είχαν απώλεια της αποτύπωσης.

Η ανάλυση του ποσοστού της μεθυλίωσης στην περιοχή των εκκινητών του *IGF2* έδειξε μειωμένο ποσοστό μεθυλίωσης στους πλακούντες με EYA σε σχέση με αυτούς της ομάδας ελέγχου. Η υπομεθυλίωση στη συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να συσχετιστεί με την απώλεια της αποτύπωσης των παθολογικών δειγμάτων, δεν μπορεί όμως να εξηγήσει τη μειωμένη έκφραση του *IGF2* στην ίδια ομάδα. Επιπρόσθετα, δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση της υπομεθυλίωσης με την διαταραχή της αποτύπωσης στα δείγματα με EYA.

Χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης διαπιστώθηκαν και στην περιοχή των εκκινητών του *H19* στην ομάδα των παθολογικών πλακούντων. Αν και το συγκεκριμένο γεγονός θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη έκφραση του *H19*, εντούτοις δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ επιπέδων του mRNA και των PMR.

Τέλος, ένα πολύ σημαντικό κομμάτι της μελέτης ήταν η ανάλυση της μεθυλίωσης της περιοχής που ελέγχει την αποτύπωση του *IGF2* και του *H19*. Τα παθολογικά δείγματα πλακούντων είχαν μικρότερα ποσοστά μεθυλίωσης σε σχέση με τα φυσιολογικά, αλλά σε μη στατιστικά σημαντικό βαθμό. Οι μετρήσεις των PMR δεν σχετίζονταν με τα επίπεδα mRNA κανενός από τα δύο γονίδια που μελετήθηκαν. Με σκοπό να διερευνήσουμε κατά πόσο η υπομεθυλίωση στην συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να συσχετίζεται με διαταραχές της αποτύπωσης, αναλύσαμε τα ποσοστά μεθυλίωσης των δειγμάτων που εμφάνισαν απώλεια της αποτύπωσης προκειμένου για το *IGF2* σε σχέση με όσα είχαν φυσιολογική

αποτύπωση. Αν και τα δείγματα με LOI είχαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με όσα δεν εμφάνιζαν κάποια διαταραχή, η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική.

Είναι γεγονός πως οι μέχρι σήμερα γνώσεις μας όσον αφορά τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την αποτύπωση, είναι ανεπαρκείς. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν μία πιθανή συσχέτιση μεταξύ ανώμαλης μεθυλίωσης του DNA και των διαταραχών την αποτύπωσης σε πλακούντες κυήσεων με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη. Η μεταγραφή, η αποτύπωση και η μεθυλίωση είναι τρεις μοριακοί μηχανισμοί που προφανώς σχετίζονται, αλλά πιθανότατα μεσολαβούν και άλλες διεργασίες σε αυτή την αλυσίδα φαινομένων. Εφόσον οι επιγενετικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων αποτύπωσης στον πλακούντα δεν είναι προφανείς, είναι αναγκαίες περισσότερες μελέτες για να διερευνηθεί ο ρόλος των γονιδίων αποτύπωσης στην παθοφυσιολογία των διαταραχών της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Introduction

Intrauterine Growth Restriction (IUGR) is a pathological reduction in an expected pattern of fetal growth that leads to attenuation of fetal growth potential due to an insult that has occurred in utero. The causes of IUGR are not well understood. Several clinical and pathologic etiological classification systems have been proposed. All of them highlight the 3 compartments of pregnancy, i.e. fetal, maternal and placental. But none of these classification systems has led to the elucidation of the basic mechanisms of SGA/IUGR. A variety of studies demonstrated that IUGR is often attributed to a broad and vaguely-defined condition called “placental insufficiency”.

No molecular diagnostic markers have been indentified to date, to detect fetuses that are at increased risk of developing IUGR later in pregnancy. Imprinted genes are recognized to be involved in regulating definite placental growth, development and function and therefore considered suitable candidates for a role in IUGR. Genomic imprinting is the preferential silencing of one copy of an autosomal gene while the other copy is expressed. This parent-of-origin-specific expression is regulated by epigenetic modifications, such as DNA methylation. A large proportion of imprinted genes is expressed in the placenta and affects the growth, morphology and nutrient transfer capacity of the placental exchange barrier. Imprinted genes that are paternally expressed (maternally imprinted) promote growth of the fetus, whilst maternally expressed (paternally imprinted)

genes act as growth suppressor to assure appropriate allocation of limited maternal resources to each offspring.

IGF2 and H19, represent two oppositely expressed genes located adjacent to each other at 11p15.5, that share the same transcription regulatory epigenetic mechanisms and have an important role in feto-placental development. Research on IGF2/H19 imprinting has revealed complicated regulatory mechanisms including multiple enhancers, silencers, and boundary elements. Many studies have implicated specific regions of differential DNA methylation as critical for correct allelic expression of these imprinted genes. In most human tissues the imprinting of IGF2/H19 depends upon a differentially methylated region DMR which is located upstream of H19 promoters. This region functions as a methylation-sensitive insulator that binds to a CCCTC factor (CTCF) on the unmethylated maternal allele which prevents the interaction of IGF2 with enhancers located downstream of *H19*, partitioning the two alleles into transcriptionally 'silent' and 'active'. Maternal IGF2 is silenced because CTCF preferentially binds to the unmethylated maternal allele, while methylation on the paternal allele prevents binding, thus allowing enhancers access IGF2 promoter and expression of the paternal IGF2. Two other differentially methylated regions exist. H19 promoter and IGF2 DMR, are also located in this area and are paternally methylated.

The implication of IGF2 and H19 with congenital growth syndromes motivated us to examine the possible relation of IGF2/H19 expression, imprinting and methylation patterns in placentas deriving from pregnancies complicated with fetal growth restriction. Aberrant DNA methylation which can modify imprinted genes expression may provide an attractive mechanism linking environmental causes to placental insufficiency and subsequently development of fetal growth

restriction. With the aim to clarify the role of the imprinted IGF2 and H19 in the pathogenesis of IUGR, we sought to determine whether altered IGF2 or H19 expression might correlate with relaxed imprinting in IUGR placentas. We also examined the epigenetic profiles of the IGF2/H19 domain in these tissues to determine if deregulated methylation status correlated with IGF2/H19 expression and potential imprinting deregulation. We postulated that altered epigenetic mechanisms may affect IGF2/H19 imprinting and deregulate their expression leading to IUGR.

Materials and Methods

Placentas were obtained after vaginal deliveries or caesarean sections from 31 women with singleton pregnancies that were complicated with IUGR and 17 normal pregnancies. Estimated Fetal Weight (EFW) was below the 5th percentile and all pregnancies also demonstrated sonographic features of IUGR. Control placentas were obtained from pregnancies with appropriate-for-gestational-age (AGA) term fetuses with, birth weight (BW)>10th percentile and no other pregnancy complications.

Genomic DNA was extracted from IUGR and normal placentas using the phenol/chloroform protocol, as previously described. Tissue specimens were homogenized in TRIzol[®] reagent and total RNA was extracted. RNA concentration was calculated with an UV spectrophotometer. Reverse transcription reactions for the preparation were performed. The mRNA expression of IGF2 and H19 was measured using a real-time RT-PCR assay with SYBR[®] Green I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control to normalize IGF2 and H19 mRNA expression levels. Three sets of primers for IGF2 and one set for H19 were used.

Genotypes of IUGR tissues for three potential IGF2 polymorphisms and two potential H19 polymorphisms were determined by PCR of genomic DNA. The PCR products were examined by electrophoresis in a 3% agarose gel or on 5% polyacrylamide-urea gel and photographed on an ultraviolet light transilluminator. Determination of two genotype polymorphisms required restriction enzyme digestion (Apa I, Alu I).

Sodium bisulfite conversion and MethyLight analysis were performed as previously described. Briefly two sets of primers and probes, designed specifically for bisulfite-converted DNA, have been used: a methylated set for the gene of interest and a reference set (COL2A1) to normalize for input DNA. The percentage of fully methylated molecules at a specific locus were calculated by dividing the GENE:COL2A1 ratio of a sample by the GENE:COL2A1 ratio of the Sssl-treated human white blood cell DNA and multiplied by 100. The abbreviation PMR (Percentage of Methylated Reference) indicates this measurement.

Results

We analysed 31 placental samples from IUGR-complicated and 17 samples from normal pregnancies. BW was below the 5th percentile in all IUGR pregnancies and between the 10th and 90th percentile in the control group. The distributions of maternal age, weight, BMI, fetal gender, parity and smoking were well balanced between the two groups. As expected, there were significant differences between gestational age, birth weight and birth weight percentiles in IUGR subjects versus controls.

Three IGF2 exon 9 polymorphisms and one H19 exon 5 polymorphisms were evaluated in this study. Two polymorphisms involved the creation of a restriction enzyme site, the other two involved a 19 bp deletion and a 4 bp

insertion in IGF2 exon 9. In total 16 out of 31 placental IUGR samples were informative (heterozygous) for IGF2 and 14 were informative for H19. Out of 17 control placentas IGF2 and H19 informative samples were 9 and 8 respectively. Of the total 25 informative cases of IGF2, loss of imprinting was shown in 9 specimens, all of which were IUGR samples.

IGF2 transcripts derived from FGR placentas were down-regulated compared to controls ($P=0.01$) (Figure 2a). Placental expression levels of H19 were significantly increased in the FGR group ($P=0.04$). A linear regression analysis did not reveal a relationship between *IGF2* and H19 expression and any of the covariates including BW percentile, gestational age at birth, and maternal characteristics. Nine FGR samples that demonstrated LOI for *IGF2* showed decreased mRNA expression compared to FGR samples that maintained the imprinting pattern; however, this decrease was not significant.

Methylation status of a region from 6156 to 6245 bp upstream of the H19 transcription start site was examined. The particular site contains the sixth of seven of CTCF-binding sites and coordinates *IGF2* and H19 reciprocal expression [11]. Compared with methylation values of normal those from growth-restricted pregnancies had lower PMR, (mean value 27.4% vs. 36.2%, $P=0.15$). PMR measurements of the specific region were not associated with BW percentiles, BW or gestational age in linear regression analysis. No correlation was also noted between the *H19* DMR methylation levels and *IGF2* neither H19 expression.

A MethyLight qPCR assay was developed to determine the methylation status of regions that control imprinted genes transcription. We subsequently measured the Percentage of Methylated Reference (PMR) of three different potential DMR's. *IGF2* exon 2/3 region demonstrated mean PMR values of 23.3% and 29.6%, for the IUGR and normal placentas respectively, a difference that was

marginally significant ($P=0.05$). The region from 7705 to 7809 bp close to the H19 promoter was also assessed with respect to the methylation status. Samples from growth restricted pregnancies displayed significantly lower methylation levels compared to normal placentas with mean values of 22.3% and 32.4% respectively ($P=0.02$)

Conclusions

The results from our study enhance the established association of the reduced IGF2 expression and fetal growth restriction. Reduced IGF2 mRNA levels in the growth restricted placentas is a finding that has been already reported in both humans and animals. We could not reproduce an observation made in the study by Guo et al, which advocated a significant correlation between the relative expression level of IGF2 in placenta and birthweight percentile. Since IGF2 and H19 are two oppositely imprinted genes, we were anticipating that reduced IGF2 mRNA levels will be accompanied by elevated H19 transcription in IUGR placentas. Indeed, placentas obtained from FGR-affected pregnancies demonstrated increased H19 expression in our study. To the best of our knowledge this is a novel finding, with yet undetermined importance. Even if evidence exists that associates H19 transcription with other placental abnormalities such as gestational trophoblastic disease, no definite conclusions can be drawn for the exact role of H19 expression on placental function and fetal growth. Since IGF2 expression is coordinately regulated with the maternally expressed H19, we focused our analysis on the ratio of mRNA from these two genes, comparing IUGR to non-IUGR placentas. IGF2/H19 mRNA ratio did not vary between the two groups.

Biallelic expression of IGF2 was established in 9 out of 16 informative IUGR. Similar results have been reported in a study that evaluated biallelic expression of H19 in normal and preeclamptic placentas. LOI was only observed in preeclamptic placentas and was also correlated with the severity of the disease. Likewise relaxation of IGF2 imprinting was noted only in tissues with gestational trophoblastic disease whereas none of the normal placentas demonstrated such phenomenon. . IUGR samples that displayed LOI had similar IGF2 and H19 mRNA levels to control samples that revealed normal imprinting.

In our study we have evaluated the methylation patterns of the ICR domain and at the H19 and IGF2 promoter region. ICR hypomethylation is thought to be responsible for the low birth weight and poor post-natal growth observed in SRS patients. Although PMR values were lower in the FGR group, in all DMRs studied statistical difference was shown only in the H19 promoter region. Methylation levels in the FGR placentas were lower in the CTCF binding site associated with SRS; however, the difference was not significant. Mean PMR values in the FGR group are similar to those reported by Bourque et al in the same region, 27.4% and 30.8%, respectively.

Hypomethylation of the H19 promoter region has been shown in the FGR group. Reduced methylation levels at the same region were also reported in small for gestational age placentas. Hypomethylation in the promoter region of a gene is generally associated with increased gene expression. Hence the reduced PMR values in the FGR group that we have found is in consistency with the increased H19 mRNA levels. There was no correlation, however, between PMR and mRNA levels.

Several conclusions can be drawn and also several questions can be raised from this study. An abnormal biallelic expression of imprinted genes in

placentas is a finding that has been reported in cases of abnormal placentation such as preeclampsia and gestational trophoblastic disease. We hypothesize that in FGR cases the placenta responds to chronic hypoperfusion by activating a program of gene expression via genomic imprinting. *IGF2* LOI may represent an effort made by the placenta to compensate its reduced functional capacity by leading to a biallelic production of a potent growth factor. The increased H19 transcription in the FGR placentas is a finding that is compatible with its known implication in post-natal growth restricted syndromes. The hypomethylation of the H19 promoters is in accordance with the increased expression in the FGR placentas. However, whether these two events represent the component of a molecular mechanism which leads to FGR or merely the consequence of placental dysfunction is unknown. Since DNA methylation and imprinting are particularly susceptible to environmental changes, imprinted genes may respond to placental hypoperfusion, by activating altered imprinting and methylation programs. Evidence provided from the present study may serve as a stimulus for larger studies that will elucidate the role of *IGF2* and H19 in intrauterine growth restriction.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

1.1 Εισαγωγή

Κάθε έμβρυο έχει μία προκαθορισμένη γενετική προδιάθεση που αφορά την ανάπτυξη του η οποία σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά των γονέων του.[1] Οι προϋποθέσεις όμως που πρέπει να υπάρχουν για να μπορέσει να εκδηλωθεί η γενετική αυτή προδιάθεση είναι η καλή υγεία του εμβρύου, η καλή υγεία της μητέρας και η φυσιολογική πλακουντιακή λειτουργία.[2] Αν όλες αυτές οι παράμετροι είναι φυσιολογικές, τότε το έμβρυο θα ανταποκριθεί στη γενετική του προδιάθεση και θα έχει φυσιολογικό -για το γενετικό του «προγραμματισμό»- μέγεθος. Προβλήματα υγείας που αφορούν το έμβρυο ή τη μητέρα καθώς επίσης και ανώμαλη πλακουντιακή λειτουργία έχουν σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση στην ενδομήτρια αύξηση. [3]

Τα νεογνά που γεννιούνται με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη είναι μικρότερα για τη δεδομένη ηλικία κύησης (μικρά για την ηλικία κύησης, *small for gestational age* SGA), και το βάρος τους, σύμφωνα με διαφορετικούς ορισμούς, μπορεί να είναι κάτω από τη 10^η ή την 3^η εκατοστιαία θέση για την ηλικία κύησης. [4-6] Είναι πολύ σημαντικό να είμαστε σε θέση να διαγνώσουμε τα νεογνά που είναι μικρά για την ηλικία κύησης επειδή είχαν υπολειπόμενη ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής τους, σε σχέση με αυτά που είναι «προγραμματισμένα» για να γεννηθούν μικρά. Τα νεογνά της πρώτης κατηγορίας, εμφανίζουν βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην ανάπτυξη και υγεία τους γιατί ουσιαστικά

κάποιος βλαπτικός παράγοντας επέδρασε στην ομαλή αύξηση τους κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής τους με αποτέλεσμα να μην αναπτυχθούν όσο θα μπορούσαν με βάση τη γενετική τους προδιάθεση.[7-9] Νεογνά 38 έως 42 εβδομάδων με βάρος γέννησης 1500 – 2500 γρ, εμφανίζουν περιγεννητική νοσηρότητα 5-30 φορές μεγαλύτερη από νεογνά με φυσιολογικό βάρος και η νοσηρότητα αυτή είναι μεγαλύτερη όταν το βάρος γέννησης είναι μικρότερο από 1500 γρ.[10] Πιο συγκεκριμένα, ένα νεογνό 1250γρ 38-40 εβδομάδων, εμφανίζει την ίδια νοσηρότητα με ένα νεογνό παρόμοιου βάρους που γεννιέται στις 32 εβδομάδες.

Σημαντικό ρόλο στην κατανόηση και ταξινόμηση της EYA έπαιξαν οι καμπύλες βάρους γέννησης που εισήγαγε ο Lubchenco το 1963 που αντιστοιχούσαν βάρος γέννησης με ηλικία κύησης.[11] Βασιζόμενοι σε αυτές τις καμπύλες, τα νεογνά με χαμηλό βάρος γέννησης ήταν όσα είχαν βάρος γέννησης μικρότερο από δύο σταθερές αποκλίσεις από το μέσο όρο για τη συγκεκριμένη ηλικία κύησης (<3%). Εφόσον δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία στη βιβλιογραφία που να υποδεικνύουν κάτω από ποιο βάρος γέννησης για κάθε ηλικία κύησης αυξάνεται σημαντικά η νοσηρότητα, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλά διαφορετικά όρια για να ορίσουν την EYA. Η 10^η η 5^η και η 15^η εκατοστιαία θέση είναι κάποιοι από τους προτεινόμενους ορισμούς ή το βάρος γέννησης κάτω από δύο σταθερές απόκλισης από το μέσο όρο (2SD) για τη δεδομένη ηλικία κύησης. [5, 12, 13]

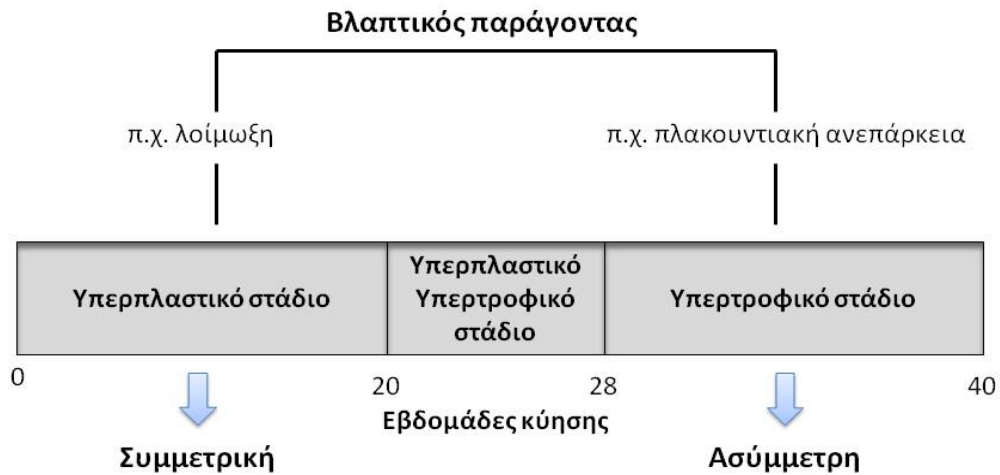
Η πρόκληση για το μαιευτήρα σε περιστατικά EYA είναι η έγκαιρη αναγνώριση της ανεπαρκούς ανάπτυξης του εμβρύου και της βαρύτητας της, η διάγνωση του πιθανού αιτιολογικού παράγοντα, η ενημέρωση των γονέων και η συνεργασία με συναδέλφους άλλων ειδικοτήτων και τέλος η απόφαση για τη σωστή χρονική στιγμή και τρόπο τοκετού. Η συνεχιζόμενη έρευνα για την ανεύρεση των παθογενετικών μηχανισμών της EYA έχει συσχετίσει διαφορετικούς γενετικούς

παράγοντες με την εμφάνιση της παθολογικής αυτής οντότητας.[14-16] Παρόλα αυτά δεν έχει βρεθεί κάποιος παράγοντας ο οποίος μπορεί να προβλέψει την εμφάνιση EYA από τα αρχικά στάδια της κύησης, ή μπορεί να εξηγήσει την παθοφυσιολογία της νόσου.[17] Οι έρευνες σε μοριακό επίπεδο θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διαλεύκανση των διεργασιών που βρίσκονται πίσω από την EYA, η οποία είναι ξεκάθαρο πλέον ότι δεν αποτελεί μία μεμονωμένη νόσο, αλλά ένα σύμπτωμα πολλών διαφορετικών επιπλοκών της κύησης

1.2 Ταξινόμηση

Μια ταξινόμηση της EYA είναι σε συμμετρική και ασύμμετρη.[18] Αν ο βλαπτικός παράγοντας δράσει νωρίς στην πορεία της κύησης, δηλαδή στο πρώτο ή το δεύτερο τρίμηνο, το έμβρυο θα παρουσιάσει συμμετρική υπολειπόμενη ανάπτυξη.[19] Η μειωμένη αύξηση στην συμμετρική EYA οφείλεται κυρίως σε μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και συνεπώς μειωμένο αριθμό κυττάρων και αφορά όλα τα όργανα του εμβρύου ισότιμα και εμφανίζεται στο 20-30% των εμβρύων με EYA.[20] Μπορεί να είναι αποτέλεσμα αναστολής των μιτώσεων όπως σε περιπτώσεις ενδομήτριων λοιμώξεων από κυτταρομεγαλοϊό, χρωμοσωμικών και συγγενών ανωμαλιών.[21] Σε γενικές γραμμές τα έμβρυα με συμμετρική EYA έχουν χειρότερη πρόγνωση, η οποία σχετίζεται με την παθολογική αιτία που την προκάλεσε.

Αντίθετα, στην ασύμμετρη EYA κατά την οποία το έμβρυο εμφανίζει ελαττωμένο ρυθμό αύξησης στα όργανα της κοιλιάς σε σχέση με την αύξηση του εγκεφάλου, ο βλαπτικός παράγοντας επιδρά μετά το δεύτερο τρίμηνο.[22] Επιδρά δηλαδή περισσότερο στην κυτταρική υπερπλασία και λιγότερο στον αριθμό των κυττάρων.[23] (Σχήμα 1)



Σχήμα 1: Η παραδοσιακή ταξινόμηση σε ασύμμετρη και συμμετρική EYA. Η ηλικία κύησης κατά την οποία δρα ο βλαπτικός παράγοντας, επηρεάζει τη μορφή της EYA.

Το φαινόμενο της «διάσωσης του εγκεφάλου», αφορά το 70-80% των κυήσεων με EYA και αποδίδεται στη δυνατότητα που έχει το έμβρυο να προσαρμόζεται στις συνθήκες μειωμένης παροχής οξυγόνου, ανακατανέμοντας την καρδιακή παροχή προς τα επινεφρίδια τα στεφανιαία και τα εγκεφαλικά αγγεία.
[18]

1.3 Επιδημιολογία

Οι γεννήσεις νεογνών με χαμηλό βάρος γέννησης συνεχίζουν να αυξάνονται παρά τη μεγάλη βελτίωση στην προγεννητική φροντίδα.[24] Ένας από τους παράγοντες που έχει συντελέσει στην αύξηση των γεννήσεων αυτών είναι η αύξηση της συχνότητας των πολύδυμων κυήσεων καθώς επίσης και η αδυναμία πρόβλεψης και ουσιαστικής θεραπείας των κυήσεων με EYA. Σε σύνολο 250.000 γεννήσεων στις ΗΠΑ, περίπου 40.000 από τα τελειόμηνα νεογνά ζυγίζουν λιγότερο από 2500 γραμ. [25] Σε μία μελέτη που έγινε στις ΗΠΑ για το διάστημα 1935-1985, βρέθηκε πως

το ποσοστό των νεογνών που γεννιούνται μικρότερα από 2500 γρ, δεν έχει αλλάξει σημαντικά όλο αυτό το διάστημα. Συγκεκριμένα το ποσοστό των τελειόμηνων νεογνών που ζύγιζαν από 2000 έως 2400γρ παρέμεινε σταθερό στο 4%.[26]

1.4 Δημιουργία και λειτουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας

Κατά τη διάρκεια της κύησης συντελούνται συντονισμένα γεγονότα (προγραμματισμός του εμβρύου – fetal programming) που εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία του πλακούντα και την απρόσκοπτη ανταλλαγή συστατικών προς και από το έμβρυο. Εφόσον ο προγραμματισμός αυτός εκτελεστεί ομαλά, έχει σαν αποτέλεσμα την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου καθώς επίσης και την ομαλή μετάβαση του στην ζωή εκτός μήτρας. [3]

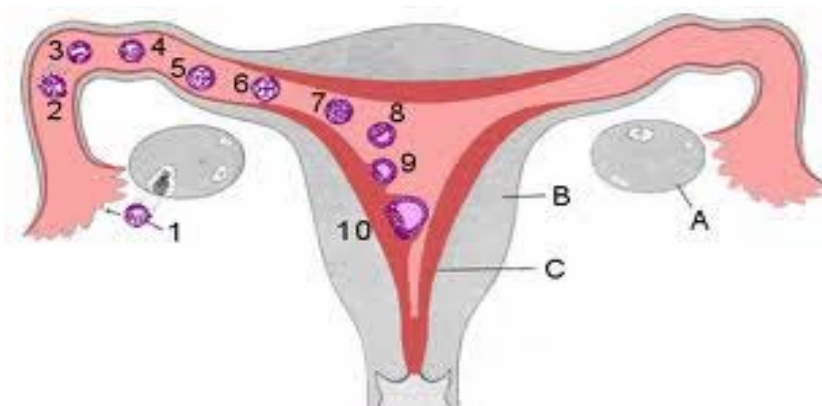
Αδρά, η εμβρυϊκή ανάπτυξη χωρίζεται σε τρία στάδια, στο πρώτο στάδιο η αύξηση του εμβρύου είναι αποτέλεσμα κυτταρικής υπερπλασίας και συντελείται μέχρι τη 16^η εβδομάδα της κύησης, στο δεύτερο στάδιο υπάρχει συνδυασμός υπερπλασίας και υπερτροφίας (μέχρι το 3^ο τρίμηνο) και στο τρίτο στάδιο η αύξηση είναι αποτέλεσμα κυτταρικής υπερπλασίας. [19]

Η δημιουργία του εμβρύου ξεκινά με τη διαδικασία της γονιμοποίησης, δηλαδή τη συνένωση του αρσενικού και του θηλυκού γαμέτη. Τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, χαρακτηρίζονται από ταχύτατη κυτταρική διαίρεση. Αυτή η αρχική αύξηση του αριθμού των κυττάρων είναι θεμελιώδης για την ύπαρξη ικανού αριθμού κυττάρων που θα πυροδοτήσουν την διαφοροποίηση. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται βλαστομερίδια.

Μετά την πρώτη κυτταρική διαίρεση η οποία πραγματοποιείται 24-48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, τα βλαστομερίδια μικραίνουν σε μέγεθος και ακολουθούν διαδοχικές τους διαιρέσεις. Μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων, τα κύτταρα είναι σε

μία χαλαρή διάταξη μεταξύ τους και στη συνέχεια τα βλαστομερίδια σχηματίζουν μία συμπαγή μάζα κυττάρων. Αυτή η διαδικασία της σύμπτυξης διαχωρίζει την έσω από την έξω κυτταρική μάζα και σηματοδοτεί την έναρξη της διαφοροποίησης. Περίπου τρεις ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, αυτή η μάζα κυττάρων που ονομάζεται μορίδιο, εισέρχεται στη μήτρα.

Το επόμενο στάδιο στην εξέλιξη του εμβρύου είναι η δημιουργία της βλαστοκύστης, όπου οι κυτταρικές μάζες διατάσσονται στο εσωτερικό οπότε και δημιουργείται η εμβρυοβλάστη και στο εξωτερικό οπότε δημιουργείται το τροφοεκτόδερμα. Αφού εισέλθει στη μήτρα, η βλαστοκύστη αιωρείται μέσα στην ενδομητρική κοιλότητα για 2-3 ημέρες. Τελικά το έμβρυο εμφυτεύεται στη μήτρα 6 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση και η πλήρης εμπέδωση του μέσα στο ενδομήτριο γίνεται 9-10 ημέρες μετά την ωορρηξία. (Εικόνα 1)



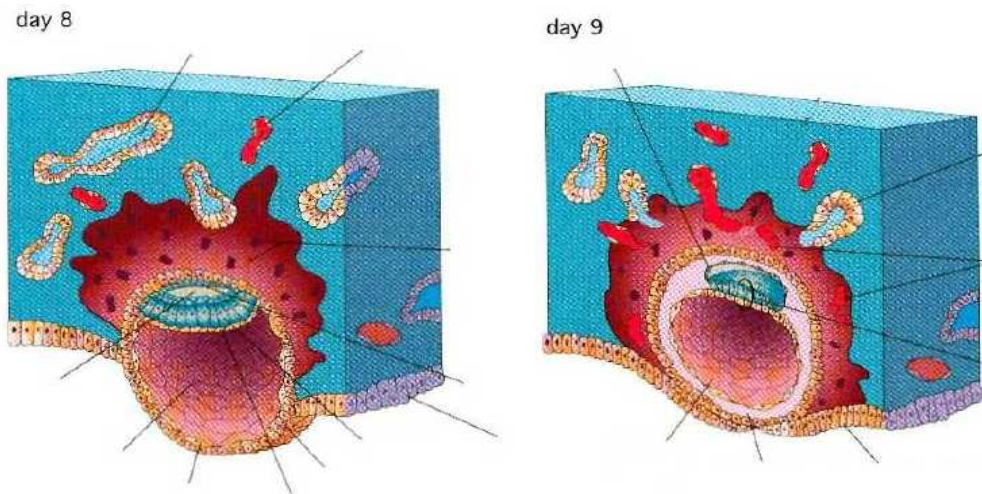
Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των αρχικών σταδίων της δημιουργίας του εμβρύου. Εικόνα από το διαδίκτυο

Ένα κρίσιμο στάδιο της εμφύτευσης είναι ο συγχρονισμός μεταξύ εμβρύου και μίας σειράς μοριακών και κυτταρικών διεργασιών που προέρχονται από τη μήτρα υπό την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Αφού η βλαστοκύστη αγκιστρωθεί στο ενδομητρικό επιθήλιο, αρχίζει να διεισδύει μέσω της

βασικής μεμβράνης στο στρώμα της μήτρας. Για να μπορέσουν τα τροφοβλαστικά κύτταρα να διεισδύσουν θα πρέπει αρχικά να αποδομήσουν το επιθήλιο και το στρώμα. Επομένως το αναπτυσσόμενο έμβρυο πρέπει να παράγει τα κατάλληλα ένζυμα έτσι ώστε να προσκολληθεί επαρκώς στο ενδομήτριο χωρίς όμως να διεισδύσει ανώμαλα μέσα στο τοίχωμα της μήτρας.[27] Αν και πολλές ουσίες εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης, ο ακριβής τους ρόλος στα αρχικά αυτά στάδια της κύησης, παραμένει αδιευκρίνιστος.[28]

Αφού η βλαστοκύστη προσκολληθεί στο επιθήλιο του ενδομητρίου, ξεκινά ένας ταχύτατος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η τροφοβλάστη διαφοροποιείται σε δύο στιβάδες, την εσωτερική κυτταροτροφοβλάστη και την εξωτερική συγκυτιοτροφοβλάστη που αποτελεί μία πολυπυρηνική μαζα χωρίς σαφή κυτταρικά όρια. Η συγκυτιώδης τροφοβλάστη διεισδύει στο ενδομητρικό στρώμα όπου τα στρωματικά κύτταρα περιβάλλουν την περιοχή εμφύτευσης, γίνονται πολυεδρικά και γεμίζουν με λιπίδια και γλυκογόνο και μετατρέπονται έτσι σε κύτταρα του φθαρτού. Τα κύτταρα του φθαρτού παρέχουν θρεπτικά συστατικά στο αναπτυσσόμενο έμβρυο.(Εικόνα 2)

Η τροφοβλάστη αναπτύσσεται ταχύτατα και περιφερικά διεισδύοντας στο ενδομήτριο και στο τοίχωμα των σπειροειδών αρτηριών του ενδομητρίου. Τον πρώτο μήνα μετά τη γονιμοποίηση τα αγγεία της αλλαντοΐδος δημιουργούν τη σύνδεση με τα αγγεία των αναπτυσσόμενων λαχνών με αποτέλεσμα τη δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής κυκλοφορίας από την 5η εβδομάδα της κύησης.



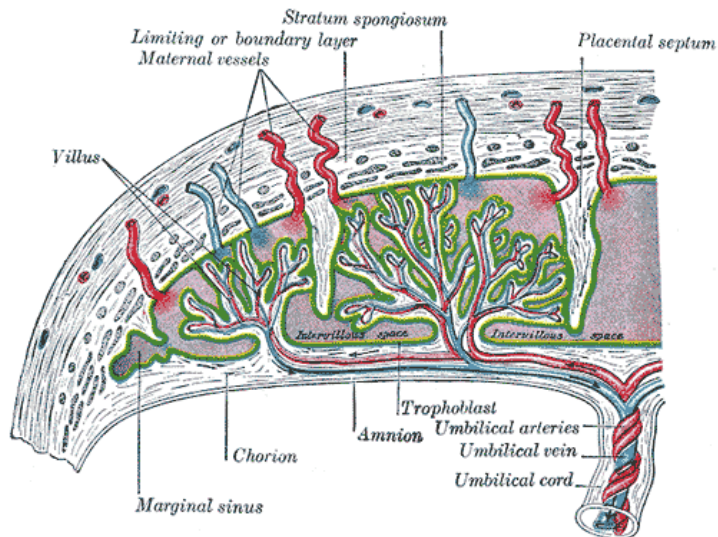
Εικόνα 2: Εμφύτευση και διείδυση της βλαστοκύστης στη μήτρα. Εικόνα προερχόμενη από το διαδίκτυο

Οι λάχνες που περιβάλλουν την περιοχή της εμφύτευσης συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, ενώ οι λάχνες που βρίσκονται προς την ενδομητρική κοιλότητα, ατροφούν, φτιάχνοντας τελικά τις εμβρυϊκές μεμβράνες. Μεταξύ 14^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας της κύησης, η ενδιάμεση τροφοβλάστη διεισδύει στο μυομητρικό τμήμα των σπειροειδών αρτηριών. Η συνεχής ανάπτυξη και μεγέθυνση του χορίου έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη κατάληψη ολόκληρης της ενδομητρικής κοιλότητας περί την 20^η εβδομάδα της κύησης.[29] Με τη σταδιακή ωρίμανση των λαχνών, ο φραγμός μεταξύ μητρικής και εμβρυϊκής κυκλοφορίας γίνεται πιο ελαστικός.

Η αύξηση της συνθετικής ικανότητας του πλακούντα έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση ουσιών προς την μητρική κυκλοφορία (όπως χοριακή γοναδοτροπίνη και πλακουντιακό γαλακτογόνο).[30] Οι μηχανισμοί ενεργητικής κυτταρικής μεταφοράς του πλακούντα είναι διαφορετικοί για κάθε ουσία (γλυκόζη, αμινοξέα, λιπαρά οξέα).[31] Με την έναρξη της καρδιακής λειτουργίας του εμβρύου αρχίζει η ενεργητική κατανομή των θρεπτικών ουσιών μεταξύ εμβρύου και πλακούντα και έτσι ολοκληρώνεται η λειτουργικότητα της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας. Η

επίτευξη όλων αυτών των σημαντικών γεγονότων μπορεί να αντικατοπτριστεί με διάφορους τρόπους. Οι μεταβολές στην παθοφυσιολογία της μητέρας όπως η μεταγευματική υπεργλυκαιμία, τα αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, η χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια νηστείας, η ανακατανομή του λίπους, η αύξηση του ενδοαγγειακού όγκου και η σχετική αντίσταση σε αγγειοσυσταλτικούς παράγοντες, συνολικά προάγουν τη μεταφορά συστατικών από τη μητέρα προς το έμβρυο. Η αυτορρύθμιση του αγγειακού συστήματος του πλακούντα κάνει την ανταλλαγή συστατικών πιο αποτελεσματική με το σωστό συντονισμό της διάχυσης μεταξύ των δύο διαμερισμάτων. Τα συστατικά προσλαμβάνονται από τη κυκλοφορία των χοριακών λάχνων και διανέμονται στο έμβρυο μέσω της ομφαλικής φλέβας.

Κατά το δεύτερο τρίμηνο, η διεύδυση της τροφοβλάστης στις σπειροειδείς αρτηρίες της μητέρας έχει σαν αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση της μυοελαστικής ικανότητας τους, αρχικά στο τμήμα του φθαρτού και στη συνέχεια στο μυομητρικό τμήμα αυτών των αγγείων.[32, 33] Ταυτόχρονα πραγματοποιείται προοδευτική λέπτυνση της χοριακής τροφοβλάστης και ταχύτατη αύξηση της χοριακής επιφάνειας μέχρι της 26^η εβδομάδα. Παράλληλα, αναπτύσσονται οι ενδιάμεσες και τελικές λάχνες που αποτελούν τις κυριότερες περιοχές ανταλλαγής συστατικών. Η ραγδαία αύξηση της εμβρυϊκής καρδιακής παροχής αυξάνει σημαντικά τη ροή του αίματος στις χοριακές λάχνες και αυξάνει την ικανότητα της πρόσληψης των θρεπτικών ουσιών. Όλες αυτές οι αλλαγές έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο αγγειακών διαμερισμάτων υψηλής χωρητικότητας και χαμηλής αντίστασης και από τις δύο πλευρές του πλακούντα. (Εικόνα 3)



Εικόνα: Σχηματική αναπαράσταση της αιμοχωριακής κυκλοφορίας του πλακούντα.

Εικόνα από το διαδίκτυο

Κατά τη διάρκεια της κύησης ο πλακούντας αυξάνει σημαντικά σε μέγεθος ακολουθώντας μία σιγμοειδή καμπύλη αύξησης.[34] Η αύξηση της κυτταρικής μάζας και η αύξηση του κυτταρικού DNA είναι αποτέλεσμα της αυξημένης συνθετικής δραστηριότητας, της αυξημένης διάχυσης και της αύξησης της αγγειακής μάζας. Κατά το δεύτερο τρίμηνο, 40% της ποσότητας του οξυγόνου και 70% της γλυκόζης που εισέρχονται στην κυκλοφορία της μήτρας, καταναλώνονται από τα συστήματα ενεργής μεταφοράς του πλακούντα και μόνο η εναπομένουσα ποσότητα τροφοδοτεί το έμβρυο.[35] Όσο η κύηση εξελίσσεται, αυξάνει το ποσοστό των συστατικών αυτών που προσλαμβάνεται από το έμβρυο.

Το τρίτο τρίμηνο χαρακτηρίζεται από διαρκή διαφοροποίηση των οργάνων. Η αύξηση του μεγέθους του εμβρύου είναι αποτέλεσμα της κατά μήκος αύξησης του καθώς επίσης και στη συσσώρευση ενεργειακών αποθεμάτων.[36] Τα ενεργειακά αυτά αποθέματα χρησιμεύουν σαν αποθήκες θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, όταν η προσφορά θρεπτικών συστατικών

μπορεί να μην είναι σταθερή. Για παράδειγμα, το ποσοστό του λίπους του εμβρύου αυξάνει στο 20% του βάρους του σώματος του εμβρύου, κατά το τρίτο τρίμηνο. Το λίπος αποτελεί μία αποθήκη για τα λιπαρά οξέα που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της μυελίνωσης και την οπτική λειτουργία. Επομένως το τρίτο τρίμηνο αποτελεί μία σημαντική περίοδο προετοιμασίας για το πέρασμα στη ζωή εκτός μήτρας.

1.5 Αιτιολογία

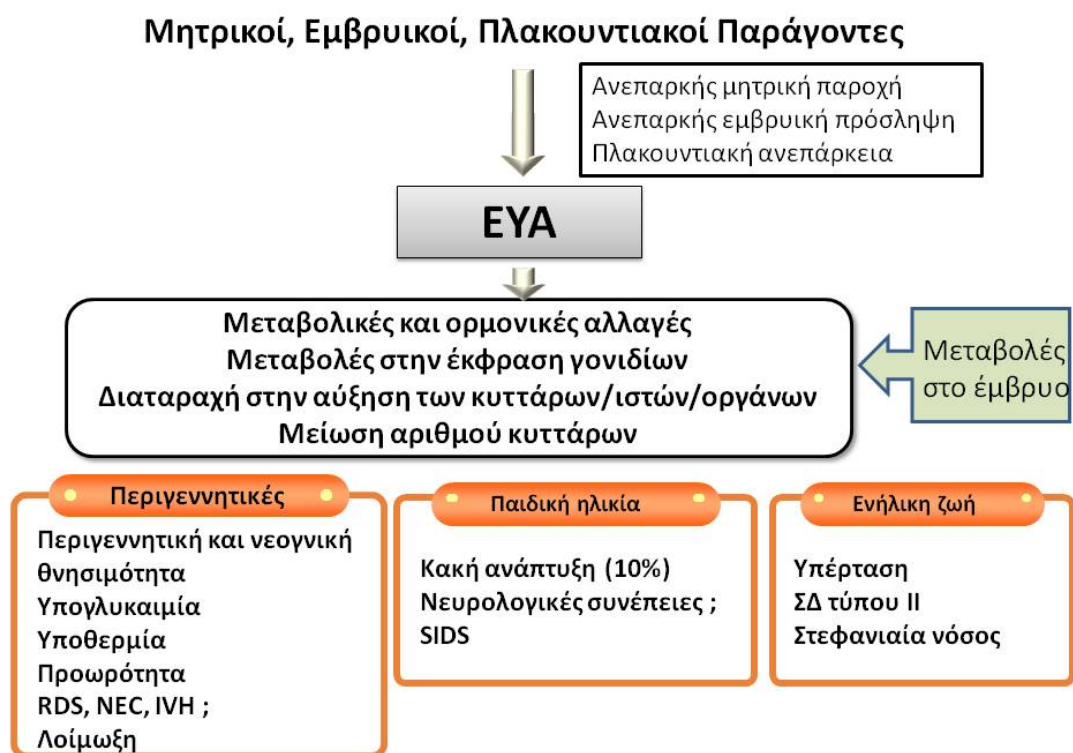
Όλη αυτή η σειρά των διεργασιών κατά τη δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας είναι θεμελιώδης για τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου. Νοσήματα του εμβρύου, της μητέρας, πρωτοπαθείς διαταραχές του πλακούντα, ή εξωγενείς παράγοντες, μπορεί να παρέμβουν στην ομαλή ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ενδομήτριας αύξησης. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος καταστάσεων που συσχετίζονται με την ΕΥΑ.(Πίνακας 1)

Σε κάποιες περιπτώσεις νοσημάτων του εμβρύου η ΕΥΑ μπορεί να αποτελεί το μοναδικό σημείο της υποκείμενης νόσου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να συνυπάρχουν και ανωμαλίες και σε άλλα οργανικά συστήματα του εμβρύου. Νόσοι της μητέρας όπως η χρόνια νεφρική νόσος, η υπέρταση, οι κολλαγονώσεις, η θρομβοφιλία και άλλοι παράγοντες όπως το κάπνισμα, η κακή θρέψη και η χρήση τοξικών ουσιών, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΕΥΑ. Πολλές από τις παραπάνω αιτίες της ΕΥΑ μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν και επιδρούν κυρίως στην ανάπτυξη και λειτουργία του πλακούντα. Γενικά οι ανωμαλίες του εμβρύου (χρωμοσωμικές και/ή ανατομικές) και οι διαταραχές στην πλακουντιακή κυκλοφορία αποτελούν τη μεγάλη πλειοψηφία της ΕΥΑ στις μονήρεις κυήσεις.

Μητρικοί παράγοντες
Υποθρεψία
Χαμηλό βάρος γέννησης της μητέρας
Μειωμένη πρόσληψη βάρους κατά την εγκυμοσύνη
Ηλικία μητέρας <16
Χαμηλό κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο
Πολυτοκία
Νοσήματα μητέρας
Χρόνια υπέρταση
Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος
Προεκλαμψία
Διαβήτης
Νεφρική νόσος
Περιβαλλοντικοί παράγοντες
Κάπνισμα, χρήση φαρμάκων, αλκοόλ, ναρκωτικών ουσιών
Μεγάλο υψόμετρο
Ακτινοβολία
Πλακουντιακοί παράγοντες
Ανώμαλη πλακουντοποίηση
Αποκόλληση, έμφρακτα πλακούντα, αιμαγγείωμα πλακούντα
Χρόνια φλεγμονή χοριακών λαχνών
Μονήρης ομφαλική αρτηρία, υμενική πρόσφυση ομφαλίου
Μωσαϊκισμός πλακούντα
Εμβρυικοί παράγοντες
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες
Γενετικά νοσήματα
Συγγενείς ανωμαλίες
Συγγενείς λοιμώξεις
Πολύδυμη κύηση

Πίνακας 1: Αίτια της ΕΥΑ

Η πιο συχνή αιτία ΕΥΑ (80-90% των περιστατικών) είναι η ανεπαρκής παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου από τον πλακούντα προς το έμβρυο.[22] Υπάρχουν αρκετές επίσης αιτίες που οδηγούν σε κυτταρική υποπλασία και επιδρούν στα αρχικά στάδια της κύησης όπως τα χρωμοσωμικά, γενετικά και λοιμώδη αίτια (Σχήμα 2).[37]



Σχήμα 2 : Σχηματικά η παθοφυσιολογία της ΕΥΑ

1.5.1 Μητρικοί παράγοντες

○ Δημογραφικοί παράγοντες

Παλιότερες μελέτες υποστήριζαν πως η μεγάλη ηλικία της μητέρας μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ανάπτυξη του εμβρύου, αλλά αυτό δεν φάνηκε να επιβεβαιώνεται από μεγαλύτερες μελέτες.[38] Οι Αφροαμερικάνες γυναίκες εμφανίζουν πιο συχνά ΕΥΑ σε σχέση με τις λευκές γυναίκες.[39] Επίσης οι γυναίκες Ινδικής και Ασιατικής γενικότερα καταγωγής, εμφανίζουν συχνότερα μωρά με ΕΥΑ

ακόμα και αν διαμένουν σε χώρες του δυτικού κόσμου.[40] Οι πρωτοτόκες εμφανίζουν σε μεγαλύτερη συχνότητα ΕΥΑ σε σχέση με τις πολυτόκες.[41] Επίσης το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ΕΥΑ, αν και πολλοί άλλοι δυσμενείς παράγοντες όπως κάπνισμα, κακή θρέψη, ή συνυπάρχουσες νόσοι, μπορεί να συνυπάρχουν σε αυτές τις κοινωνικές ομάδες.[42]

Γυναίκες με χαμηλό ανάστημα όπως επίσης και γυναίκες με χαμηλό βάρος (BMI<20) εμφανίζουν πιο συχνά ΕΥΑ.[43] Παρόλα αυτά αν τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας ληφθούν υπόψη κατά τον υπολογισμό του βάρους του εμβρύου τότε η συχνότητα εμφάνισης ΕΥΑ σε αυτή την ομάδα γυναικών, είναι πολύ μικρότερη. Ο παράγοντας που φαίνεται πως έχει άμεση συσχέτιση με το προβλεπόμενο βάρος του εμβρύου, είναι το βάρος γέννησης της μητέρας. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως γυναίκες που είχαν χαμηλό βάρος γέννησης, έχουν 4,7 περισσότερες πιθανότητες να γεννήσουν παιδί με επίσης χαμηλό βάρος.[44]

○ *Θρέψη της μητέρας*

Δεν είναι ξεκάθαρο ποια είναι η επίδραση της υποθρεψίας της μητέρας στην ανάπτυξη του εμβρύου κατά τα διάφορα στάδια της κύησης. Μελέτες που έχουν γίνει σε έγκυες γυναίκες σε περιόδους λοιμού, έδειξαν πως η επίδραση της υποθρεψίας στο μέγεθος του εμβρύου είναι πιο έκδηλη στα τελευταία στάδια της κύησης.[45] Η επίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων στο βάρος γέννησης, εξετάστηκε σε μελέτες δωρεάς ωαρίων. Οι μόνοι παράγοντες που βρέθηκε ότι επηρέαζαν το βάρος γέννησης, ήταν η ηλικία κύησης και το βάρος της λήπτριας. Δεν αποδείχθηκε συσχέτιση με το βάρος, το βάρος γέννησης, ή το βάρος γέννησης των άλλων παιδιών της δότριας.[46] Η παραπάνω παρατήρηση υποδηλώνει πως η περιβαλλοντική συμμετοχή της μητέρας που κυοφορεί το έμβρυο

είναι πιο σημαντική στην αύξηση του εμβρύου από το γενετικό του υπόστρωμα.[46] Παρόλα αυτά το παραπάνω αποτέλεσμα στηρίζεται σε μικρές μελέτες και δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα.

Η επίδραση της διατροφής της μητέρας στο βάρος γέννησης του εμβρύου μελετήθηκε σε μία αναδρομική μελέτη όπου φάνηκε πως τα νεογνά με φυσιολογικό βάρος προέρχονταν κυρίως από μητέρες που ακολουθούσαν δίαιτα υψηλή σε υδατάνθρακες και φρούτα και λάμβαναν φυλλικό οξύ ή βιταμινούχα σκευάσματα.[47] Επιπλέον η χορήγηση συμπληρωμάτων σιδήρου, ειδικά στο τρίτο τρίμηνο, συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης νεογνού με χαμηλό βάρος γέννησης.[47] Φυσιολογικό βάρος της μητέρας πριν την εγκυμοσύνη και ικανοποιητική λήψη βάρους κατά τη διάρκεια της έχει επίσης συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης νεογνού με μειωμένο βάρος γέννησης.[48]

○ Κάπνισμα

Έχει δειχθεί πως μητέρες που είναι ενεργές καπνίστριες κατά τη διάρκεια της κύησης, γεννούν μικρότερα μωρά. Αυτή η μείωση είναι οριακή στην περίπτωση γυναικών που σταματούν το κάπνισμα με την έναρξη της κύησης.[49] Το παθητικό κάπνισμα δρα επίσης αρνητικά στο τελικό βάρος γέννησης του νεογνού. Επιπλέον η επίδραση του καπνίσματος στο έμβρυο αφορά και την περίμετρο κεφαλής, με αποτέλεσμα τα νεογνά μητέρων που καπνίζουν να εμφανίζουν περίμετρο κεφαλής κατά μέσο όρο μικρότερη από 32 εκατοστά.[50]

○ Θρομβοφιλία

Η θρομβοφιλία περιλαμβάνει μία σειρά από αιματολογικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από θρομβωτική προδιάθεση και μπορεί να σχετίζονται με νοσήματα όπως το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο ή να είναι αποτέλεσμα

μεταλλάξεων στα γονίδια που ελέγχουν παράγοντες πήξης. Πολλές επιπλοκές της κύησης όπως η σοβαρή προεκλαμψία, η αποκόλληση του πλακούντα η EYA και ο ενδομήτριος θάνατος έχουν συσχετιστεί με θρομβώσεις του πλακούντα, θρομβώσεις των σπειροειδών αρτηριών και ανεπαρκή πλακουντιακή παροχή.[51] Δεν είναι όμως τελείως ξεκάθαρο αν αυτές επιπλοκές εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε γυναίκες με θρομβοφιλία.[52]

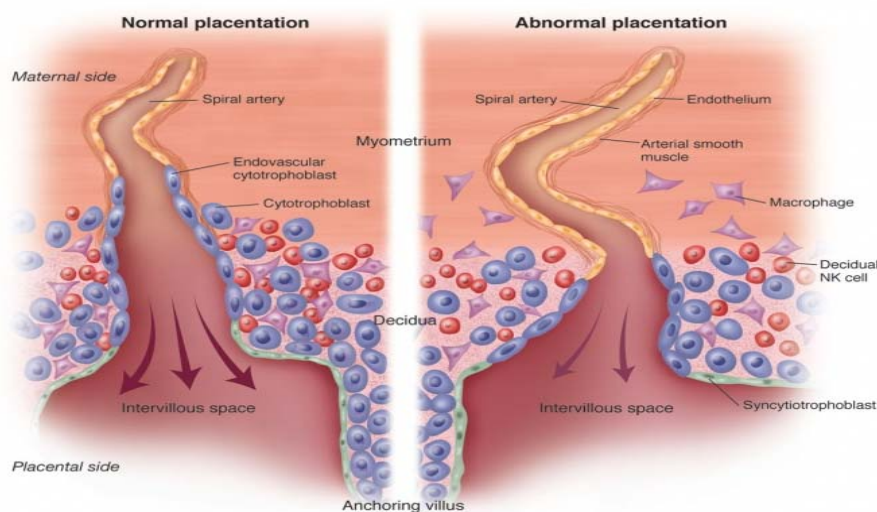
Εφόσον η κύηση από μόνη της αποτελεί ένα σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα για θρομβώσεις, κυρίως λόγω των φυσιολογικών αλλαγών στους μηχανισμούς πήξης και ινωδόλυσης, υπάρχει το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης με κάποια συγγενή ή επίκτητη θρομβοφιλία, με αποτέλεσμα την εμφάνιση επιπλοκών στην κύηση. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ή χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής με ηπαρίνη ή χαμηλή δόση ασπιρίνης, μπορεί να αποτρέψει αυτές τις επιπλοκές.[53]

○ Προεκλαμψία και Εκλαμψία

Η προεκλαμψία και η EYA είναι δύο νοσολογικές οντότητες που σχετίζονται με ανώμαλη τροφοβλαστική διείσδυση. Κατά τη διάρκεια της κύησης η κατάληψη των σπειροειδών αρτηριών από τα τροφοβλαστικά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την ομαλή αιματική ροή από τη μήτρα. Η αποτυχημένη διείσδυση της τροφοβλάστης στα σπειροειδή αρτηριόλια μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή των αγγειογενετικών μηχανισμών και άλλων προσαρμοστικών διεργασιών του καρδιαγγειακού συστήματος που θεωρητικά μπορεί να αποτελέσει τη παθοφυσιολογική βάση για την EYA αλλά και την προεκλαμψία.[54]

Μία από τις δημοφιλείς θεωρίες της παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας είναι πως ο πλακούντας εκκρίνει κυταρροτοξικούς παράγοντες που οδηγούν σε γενικευμένη διαταραχή της λειτουργίας του ενδοθηλίου των αγγείων της μητέρας. Η ανώμαλη διαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών κατά την προεκλαμψία, έχει σαν

αποτέλεσμα τη μειωμένη τους διάμετρο και την κατά τόπους πλακουντιακή ισχαιμία.[55] (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Η ανεπαρκής διείσδυση της τροφοβλάστης στις σπειροειδείς αρτηρίες οδηγεί στη μειωμένη τους διάμετρο και αυξημένη αντίσταση. Εικόνα από το διαδίκτυο

1.5.2 Εμβρυϊκοί παράγοντες

☐ Πολύδυμη κύηση

Τα έμβρυα των πολύδυμων κυήσεων είναι σε γενικές γραμμές μικρότερα από αυτά των μονήρων. Σε μία μεγάλη μελέτη που περιελάμβανε 12302 δίδυμες κυήσεις και 2155 τρίδυμες κυήσεις, διαπιστώθηκε πως ο μέσος όρος του βάρους ήταν παρόμοιος με το βάρος των εμβρύων των μονήρων κυήσεων, μέχρι την 29^η εβδομάδα για τα τρίδυμα και την 32^η για τα δίδυμα. Μετά από αυτή την ηλικία κύησης, η διαφορά οφειλόταν στη μείωση του βάρους του μικρότερου διδύμου, ενώ το βάρος του μεγαλύτερου διδύμου ήταν παρόμοιο με το μέσο όρο του βάρους του εμβρύου μία μονήρους κύησης.[56] Η εμφάνιση EYA κατά τη διάρκεια μίας πολύδυμης κύησης συσχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα ανεξάρτητα με την ηλικία κύησης. Το φύλο του εμβρύου παίζει σημαντικό ρόλο στο τελικό βάρος γέννησης

στις πολύδυμες κύησεις. Τα αγόρια δίδυμα ζυγίζουν περισσότερο από τα κορίτσια δίδυμα και οι διαφορές αυτές είναι σημαντικές από την 27^η εβδομάδα της κύησης και έπειτα. Οι καμπύλες αύξησης –ηλικίας κύησης των τριδύμων έχει φανεί πως ακολουθούν αυτές των διδύμων μέχρι τις 30 εβδομάδες, ενώ στη συνέχεια αποκλίνουν σημαντικά. Η συχνότητα εμφάνισης EYA είναι διπλάσια σε μία μονοχοριονική διδυμο κύηση σε σχέση με μία διχοριονική.[57]

□ Γενετικοί και χρωμοσωμικοί παράγοντες

Υπάρχει μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της EYA και της ύπαρξης χρωμοσωμικών και συγγενών ανωμαλιών. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανευρίσκονται στο 7% των νεογνών με EYA που είναι δεκαπλάσιο ποσοστό από ότι στα νεογνά φυσιολογικού βάρους. Έμβρυα με τρισωμία 13,18 και 21 υπολείπονται συνήθως στην ανάπτυξη όπως επίσης και τα νεογνά με αυτοσωμικές ανωμαλίες όπως ελλείψεις και διπλασιασμούς χρωμοσωμάτων. Αν και οι ανωμαλίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων οδηγούν συνήθως σε εμβρυϊκό θάνατο, τα έμβρυα που επιβιώνουν έχουν κατά κανόνα μικρότερο βάρος γέννησης. Η επίδραση των ανευπλοειδιών στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, φάνηκε σε μία σημαντική μελέτη, όπου έγινε εξέταση καριοτύπου σε 458 έμβρυα με EYA. Ποσοστό 19% είχαν κάποια καριοτυπική ανωμαλία, ενώ 2% των εμβρύων με παθολογικό καριότυπο ήταν έμβρυα χωρίς υπερηχογραφικές ανατομικές ανωμαλίες και 40% αυτών είχαν κάποιο υπερηχογραφικό εύρημα.[58]

Συνολικά, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και οι πολυπαραγοντικές συγγενείς ανωμαλίες ευθύνονται για το 20% των νεογνών με EYA, ποσοστό που είναι πολύ μεγαλύτερο αν η διαταραχή στην ανάπτυξη ανιχνευτεί πριν την 26^η εβδομάδα της κύησης.[58]

□ Συγγενείς λοιμώξεις

Οι λοιμώξεις που προσβάλλουν ενδομήτρια ένα έμβρυο, μπορεί να επηρεάσουν την ομαλή ανάπτυξη του, αλλά αυτό δεν αφορά όλες τις ενδομήτριες λοιμώξεις. Η λοίμωξη από τοξόπλασμα, σπάνια επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου, ενώ αντίθετα η ερυθρά, ο κυτταρομεγαλοϊός και ο έρπητας, αποτελούν συχνές αιτίες ΕΥΑ. [59, 60]

□ Πλακουντιακή ανεπάρκεια

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η πιο συχνή αιτία ΕΥΑ είναι η πλακουντιακή ανεπάρκεια. Αφορά συνήθως περιπτώσεις όπου η καθυστέρηση της ανάπτυξης είναι ασύμμετρη και εμφανίζεται κυρίως μετά το δεύτερο μισό της κύησης. Αν και έχει γίνει τεράστια πρόοδος στη διάγνωση και παρακολούθηση της ανεπαρκούς παροχής αίματος από τον πλακούντα προς το έμβρυο, εντούτοις οι ακριβείς μηχανισμοί και η επίδραση των διαφόρων νοσημάτων στην πλακουντιακή λειτουργία, παραμένουν αδιευκρίνιστοι.

Νωρίς από το πρώτο τρίμηνο, η διαταραχή της αγγειογένεσης μπορεί να εμποδίσει τη σωστή δημιουργία του πλακούντα με αποτέλεσμα την αποβολή του κυήματος. Αν παρόλα αυτά η δημιουργία του πλακούντα προχωρήσει, τότε η ανεπαρκής παροχή θρεπτικών συστατικών προς το έμβρυο θα δημιουργήσει προβλήματα όσο αυξάνονται οι ανάγκες του εμβρύου, δηλαδή με την πρόοδο της κύησης. Η κακή τροφοβλαστική διείσδυση στα αγγεία της μήτρας έχει σαν αποτέλεσμα αυτά να μη μπορούν να μετατραπούν σε αγγεία χαμηλής αντίστασης. Επιπλέον η αυξημένη απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων δημιουργεί μία ανώμαλη ανάπτυξη των χοριακών λαχνών και περαιτέρω επιβάρυνση της πλακουντιακής λειτουργίας.[61] Η κατάσταση αυτή μπορεί να πυροδοτήσει την έκφραση πολλών παραγόντων που δρουν σε αγγειακό επίπεδο με σκοπό να

αυξήσουν την προσαρμοστικότητα των αγγείων στις απαιτήσεις της εγκυμοσύνης. Επιπλέον η υποξία διεγείρει την αγγειογένεση, η οποία όμως σε πολλές περιπτώσεις είναι άναρχη και εμποδίζει την σωστή ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών.[62]

Όλα αυτά τα γεγονότα αντικατοπτρίζουν μία προσπάθεια αυτορρύθμισης του πλακούντα με σκοπό να εξυπηρετήσει τις αυξανόμενες ανάγκες της κύησης. Τα έμφρακτα του πλακούντα, και η ίνωση των αγγείων του, έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη αντίσταση στο αγγειακό δίκτυο με τελική συνέπεια τη μείωση της μάζας του πλακούντα που είναι μεταβολικά ενεργή. Αναφέρεται παρόλα αυτά πως η αύξηση του εμβρύου δεν επηρεάζεται ακόμα και σε περιπτώσεις που ο πλακούντας απολέσει έως 30% των λειτουργικών του λαχνών.[63] Αν οι αντιρροπιστικοί μηχανισμοί που ενεργοποιηθούν, επιτρέψουν τη συνέχιση της κύησης, τότε η ανεπαρκής τροφοδοσία του πλακούντα θα έχει άμεση επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Η σοβαρότητα της πλακουντιακής αγγειακής δυσλειτουργίας μπορεί να εκτιμηθεί κλινικά με την υπερηχογραφική μέθοδο Doppler. Ο υπολογισμός του Doppler των μητριαίων αρτηριών εκτιμά την παροχή αίματος από τη μητέρα προς τον πλακούντα, ενώ οι μετρήσεις που αφορούν το έμβρυο, δίνουν πληροφορίες για την πλακουντιακή λειτουργία και την ανταπόκριση του εμβρύου στη στέρηση των θρεπτικών συστατικών.[64]

Στις κυήσεις που επιπλέκονται με ΕΥΑ, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη μεταφορά συστατικών μεταξύ μητέρας και εμβρύου όπως επίσης και στο μεταβολισμό πλακούντα και εμβρύου που δείχνουν μία στροφή αυτών των διεργασιών προς μία πιο καταβολική φάση. Η στέρηση παροχής αίματος από τη μήτρα προς το έμβρυο, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού ανάπτυξης προς όφελος του εγκεφάλου. Το έμβρυο αντιδρά στην ανεπαρκή παροχή συστατικών με μία σειρά μηχανισμών, με τελικό στόχο τη μεγιστοποίηση των

πιθανοτήτων επιβίωσης στην εξωμήτριο ζωή. Ο πρώτος μηχανισμός που επιστρατεύεται είναι η αύξηση του καταβολισμού με σκοπό την παροχή ενέργειας. Αποτέλεσμα της παρατεταμένης υποθρεψίας είναι οι αλλαγές του μεταβολισμού του εμβρύου και της παραγωγής ορμονών και η ευαισθητοποίηση των ιστών σε αυτές.[65] Μελέτες σε ζωικά μοντέλα υποδεικνύουν πως η αρχική αντίδραση της μειωμένης πλακουντιακής παροχής έχει σαν αποτέλεσμα τον ασύμμετρο ρυθμό ανάπτυξης χωρίς αλλαγή στο βάρος του εμβρύου και την αύξηση του λόγου βάρους εγκεφάλου/ήπατος. Τα επινεφρίδια του εμβρύου υπερτρέφονται και κατά συνέπεια αυξάνεται η δράση των γλυκοκορτικοειδών, ενώ μειώνεται το βάρος του θύμου αδένος. Ο ρυθμός σύνθεσης του DNA μειώνεται στους σκελετικούς μύες, αλλά και στον καρδιακό μυ. Όταν η ανεπαρκής παροχή παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα ή έχει ξεκινήσει από νωρίς στην κύηση, επιπροσθέτως των παραπάνω αλλαγών, παρατηρείται και μείωση του βάρους του εμβρύου κατά 25-30%. Το αμνιακό υγρό μειώνεται πλέον του 60%. Αργότερα εγκαθίσταται και υπερτροφία του μυοκαρδίου. Αν όλοι αυτοί οι αντιρροπιστικοί μηχανισμοί φτάσουν σε οριακό στάδιο, τότε το έμβρυο αρχίζει να δυσπραγεί.[2]

1.6 Διάγνωση

Ο βασικός στόχος της μαιευτικής παρέμβασης είναι η έγκαιρη αναγνώριση των εμβρύων με EYA που κινδυνεύουν από ενδομητρική υποξία, η παρακολούθηση της κατάστασης του εμβρύου και η επίσπευση του τοκετού όταν το έμβρυο κινδυνεύει. Η διάγνωση ενός εμβρύου μικρού για την ηλικία κύησης (Small for Gestational Age, SGA), συνήθως γίνεται με τη σύγκριση του εκτιμώμενου βάρους του εμβρύου ή συγκεκριμένων μετρήσιμων διαστάσεων (π.χ. περίμετρος κοιλιάς) με προκαθορισμένες καμπύλες ενδομητρικής αύξησης. Προϋπόθεση για να υπάρχει

αξιόπιστη μέτρηση είναι ο ακριβής υπολογισμός της ηλικίας κύησης που βασίζεται στην υπερηχογραφική μέτρηση της ηλικίας κύησης κατά τα αρχικά της στάδια.[66]

Το όριο κάτω από το οποίο θεωρείται ένα μωρό ως (SGA) είναι με τον παραδοσιακό ορισμό η 10^η εκατοστιαία θέση του υπερηχογραφικά εκτιμούμενου βάρους του εμβρύου. Με την εφαρμογή του συγκεκριμένου ορισμού η σημαντική πλειοψηφία αυτών των εμβρύων θα είναι υγιή, με ομαλό ρυθμό ανάπτυξης και φυσιολογικό πλακούντα. Η χρήση της 3^{ης} και 5^{ης} ΕΘ μπορεί να περιλαμβάνει με μεγαλύτερη ακρίβεια τα SGA έμβρυα τα οποία εμφανίζουν EYA. Με έναν πιο πρόσφατο ορισμό, ένα έμβρυο ή νεογνό θεωρείται ως SGA εφόσον το εκτιμούμενο βάρος του ή το βάρος γέννησης είναι μικρότερο από το μέσο όρο μείον 2 Σταθερές Αποκλίσεις (Standard Deviation, SD).[62]

Η ανίχνευση των SGA εμβρύων υπαγορεύει την περαιτέρω διερεύνηση με σκοπό των αποκλεισμό των υγιών SGA εμβρύων και την πιο εντατική παρακολούθηση όσων πραγματικά εμφανίζουν EYA. Σε μια μελέτη φάνηκε πως τα SGA έμβρυα που δεν έχουν διαγνωστεί πριν τη γέννηση, έχουν 4πλάσιες πιθανότητες για δυσμενές περιγεννητικό αποτέλεσμα (υποξαιμική ισχαιμική εγκεφαλοπάθεια, Apgar σκορ 5 λεπτών <4, νεογνικοί σπασμοί, οξέωση, κεντρική παράλυση, περιγεννητικός και νεογνικός θάνατος) σε σχέση με SGA έμβρυα που έχουν αναγνωρισθεί εγκαίρως και έχουν συχνή παρακολούθηση. Ο κίνδυνος είναι ανάλογος με τη βαρύτητα της καθυστέρησης στην ανάπτυξη.[67]

Η μέχρι σήμερα προτεινόμενη μέθοδος εκτίμησης του εμβρυϊκού βάρους είναι με τον υπολογισμό των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών όπως η περίμετρος της κοιλιάς του εμβρύου, η περίμετρος κεφαλής η αμφιβρεγματική διάμετρο και το μήκος του μηριαίου οστού. Αυτές οι μετρήσεις μετατρέπονται σε

εκτιμώμενο εμβρυϊκό βάρος με βάση συγκεκριμένους μαθηματικούς τύπους οι οποίοι βασίζονται σε καμπύλες αύξησης βάρους σε σχέση με την ηλικία κύησης. Για την εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης του εμβρύου, δηλαδή της αλλαγής του μεγέθους του με την πάροδο του χρόνου, είναι απαραίτητη μια μακροπρόθεσμη εκτίμηση με τουλάχιστον δύο διαδοχικές υπερηχογραφικές μετρήσεις. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος μαθηματικός τύπος είναι εκείνος των Shepard και συν, που βασίζεται στην αμφιβρεγματική διάμετρο και την περιφέρεια της κοιλίας του εμβρύου και ο τύπος των Hadlock και συν που χρησιμοποιεί την περίμετρο κεφαλής την περίμετρο της κοιλίας και το μήκος του μηριαίου.[68, 69] Οι διαδοχικές μετρήσεις θα πρέπει να γίνονται συχνά για να μπορεί να αναδειχθεί η καθυστέρηση στο ρυθμό ανάπτυξης. Για να βελτιωθεί η αξιοπιστία της ανίχνευσης έχουν προταθεί ειδικοί πίνακες οι οποίοι λαμβάνουν υπόψη και τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας. Οι πίνακες εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι κυρίως χρήσιμοι για την αρχική ανίχνευση των εμβρύων με EYA. Η παρακολούθηση της υγείας αυτών των εμβρύων και η απόφαση της επίσπευσης του τοκετού γίνεται κυρίως με την Doppler υπερηχογραφία.

Εφόσον έχει τεθεί η διάγνωση της EYA, ο μαιευτήρας θα πρέπει αρχικά να διερευνήσει τα πιθανά αίτια που προκαλούν την καθυστέρηση της ανάπτυξης. Μπορεί να χρειαστεί να γίνει καρυότυπος του εμβρύου ή πιο εξειδικευμένα γενετικά τεστ και πιθανά παροχή γενετικής συμβουλής από γενετιστή. Αν υπάρχει υποψία λοίμωξης, τότε η μητέρα θα πρέπει να υποβληθεί σε ειδικές ορολογικές εξετάσεις. Εφόσον πολύ συχνά η EYA αποτελεί την πρώτη ένδειξη προεκλαμψίας, θα πρέπει διερευνηθεί κατά πόσο η έγκυος εμφανίζει κλινικά ή εργαστηριακά σημεία προεκλαμψίας. Παθήσεις της μητέρας όπως επίσης και κακή θρέψη ή λήψη φαρμάκων και τοξινών, θα πρέπει επίσης να διερευνηθούν. Μετά τη γέννηση η

ιστολογική εξέταση του πλακούντα από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο, μπορεί να αναδείξει ισχαιμικές και αγγειακές αλλοιώσεις.[62]

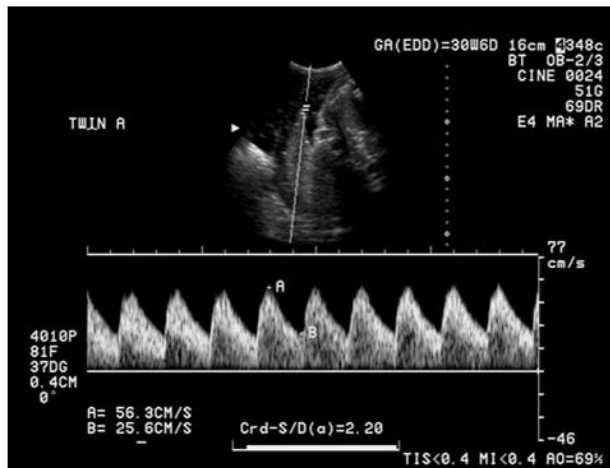
1.7 Παρακολούθηση

Από όλες της μεθόδους που υπάρχουν για την παρακολούθηση της υγείας του εμβρύου, η μελέτη Doppler έχει την καλύτερη προγνωστική αξία. Επιτρέπει στον μαιευτήρα να εκτιμήσει την κυκλοφορία και από τις δύο πλευρές του πλακούντα και να αξιολογήσει το βαθμό των προσαρμοστικών αγγειακών αλλαγών τις οποίες αναγκάζεται να κάνει το έμβρυο ανταποκρινόμενο στην υποξία. Η μελέτη των Doppler παρέχει περισσότερες πληροφορίες όταν γίνονται διαδοχικές μετρήσεις με τις οποίες μπορεί να φανεί η πιθανή επιδείνωση της υποξίας του εμβρύου. Οι μετρήσεις Doppler θα πρέπει να γίνονται και σε περιόδους που το έμβρυο δεν κινείται και δεν αναπνέει όπως επίσης και κατά τη διάρκεια εκούσια άπνοιας της μητέρας. [70]

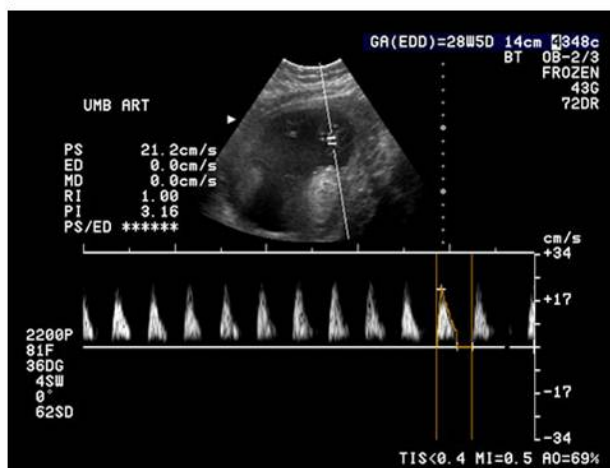
1.7.1 Doppler ομφαλικής αρτηρίας

Η κυματομορφή του Doppler σήματος που προέρχεται από τη ροή αίματος της ομφαλικής αρτηρίας, αντικατοπτρίζει τη ροή αίματος στον πλακούντα, και οι αλλαγές στην κυματομορφή αυτή σχετίζονται με την κατάσταση του εμβρύου και την έκβαση της κύησης. Επιπλέον η παθολογική εξέταση Doppler της ομφαλικής αρτηρίας σχετίζεται και με διαταραχή στην ανάπτυξη του μωρού μετά τη γέννηση. Για πρακτικούς λόγους θα μπορούσαμε να πούμε πως κάθε SGA έμβρυο στο οποίο ανευρίσκουμε παθολογικά Dopplers ομφαλικής, τότε πρόκειται σίγουρα για έμβρυο που εμφανίζει EYA πλακουντιακής αιτιολογίας. Σε περιπτώσεις που τα Dopplers είναι παθολογικά όπως σε περιπτώσεις που απουσιάζει το τελοδιαστολικό κύμα, ή είναι ανάστροφο, τότε η περιγεννητική θνησιμότητα είναι αυξημένη κατά 4 ή κατά

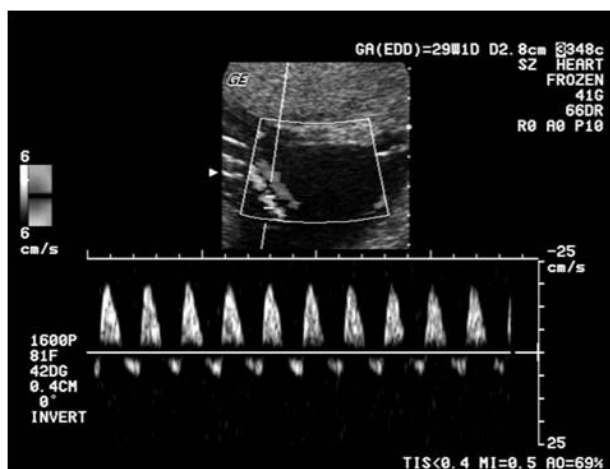
10 φορές αντίστοιχα. Η παρακολούθηση κυήσεων με την Doppler ταχυμετρία έχει σαν αποτέλεσμα μείωση της περιγεννητικής θνησιμότητας και των εισαγωγών στο νοσοκομείο μετά τη γέννηση (Εικόνα 5).[71]



Φυσιολογικά Doppler
ομφαλικής



Απουσία διαστολικού
κύματος



Αναστροφή διαστολικού
κύματος

Εικόνα 5: Dopplers ομφαλικής αρτηρίας. Εικόνες προερχόμενες από το διαδίκτυο

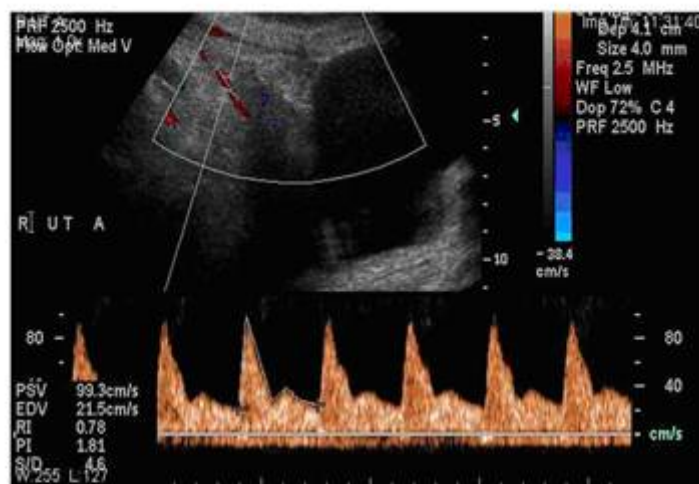
1.7.2 Μητριάια αρτηρία

Η μέτρηση του Doppler της μητριάιας αρτηρίας έχει προταθεί ως προγνωστικός δείκτης εμφάνισης προεκλαμψίας και ΕΥΑ ακόμα και σε κυήσεις χαμηλού κινδύνου. Παρόλα αυτά η μέτρηση του Doppler των μητριάιων αρτηριών μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σαν επιπρόσθετη εξέταση σε περιπτώσεις ΕΥΑ που εκδηλώνεται αργά στην κύηση. Τα παθολογικά ευρήματα των μητριάιων αρτηριών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το σκορ της μητριάιας αρτηρίας (Uterine Artery Score UAS) Πίνακας 2.

Σκορ Doppler Μητριάιας Αρτηρίας (UAS)	Ευρήματα Doppler
0	Φυσιολογικά ευρήματα σε αμφοτερόπλευρες τις μητριάιες αρτηρίες
1	Παθολογικά ευρήματα σε μία από τις μητριάιες αρτηρίες (αυξημένο PI, ή τελοδιαστολική κόμβωση)
2	Δύο παθολογικά ευρήματα
3	Τρία παθολογικά ευρήματα
4	Τέσσερα παθολογικά ευρήματα (αμφοτερόπλευρα αυξημένο PI, κομβώσεις αμφοτερόπλευρα)

Πίνακας 2: Σκορ της μητριάιας αρτηρίας με βάση τα παθολογικά ευρήματα της μελέτης Doppler.[72]

Οι αμφοτερόπλευρες κομβώσεις των μητριάιων αρτηριών συνήθως δεν υποκρύπτουν κάποια επικίνδυνη κατάσταση για το έμβρυο. Εντούτοις δείχνουν μία αυξημένη αντίσταση της ροής στην μητροπλακουντιακή κυκλοφορία, υποδεικνύοντας έτσι μία πιο συχνή παρακολούθηση του εμβρύου με σκοπό την έγκαιρη ανίχνευση ταχείας επιδείνωσης της πλακουντιακής κυκλοφορίας (Εικόνα 6).



Doppler μητριαίας αρτηρίας με κομβώσεις

Εικόνα 6: Παθολογικά Doppler μητριαίας αρτηρίας. Εικόνα από το διαδίκτυο

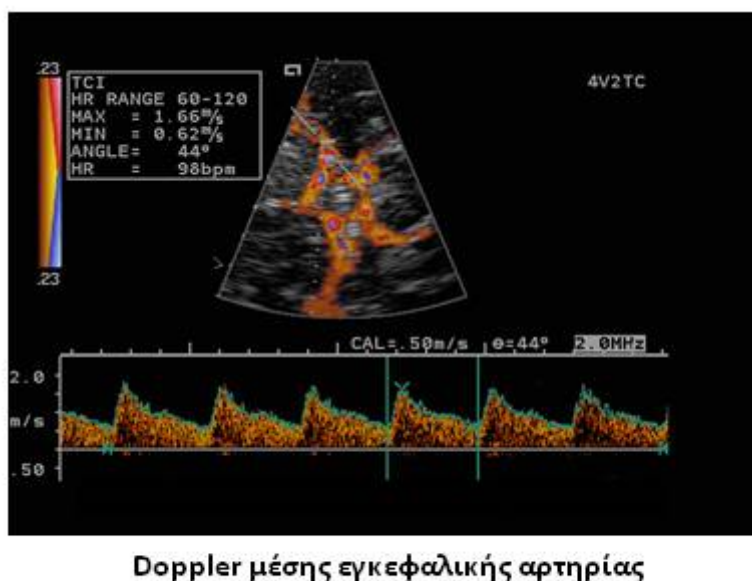
1.7.3 Παρακολούθηση εμβρυϊκής κυκλοφορίας

Σε έμβρυα με ΕΥΑ παρατηρείται μειωμένη αντίσταση στη ροή και ελαττωμένο PI στις εμβρυϊκές στεφανιαίες αρτηρίες, αρτηρίες των επινεφριδίων και την αριστερή πυλαία φλέβα. Αυτά τα ευρήματα φανερώνουν την ανακατανομή του αίματος του εμβρύου προς όφελος των ευγενών οργάνων.

✓ *Μέση εγκεφαλική αρτηρία*

Η μελέτη της ροής του αίματος στον εγκέφαλο και ειδικά στη μέση εγκεφαλική αρτηρία δίνει πληροφορίες για την ανακατανομή του αίματος στην υποξία κατά την ΕΥΑ (Εικόνα 7).[73] Τιμές του PI μικρότερες από 2SD από τη μέση τιμή αναφοράς για την ηλικία κύησης φανερώνουν τη μειωμένη αντίσταση στη ροή του αίματος στον εγκέφαλο.[74] Οι μειωμένες αυτές τιμές συνήθως παρατηρούνται στα αρχικά στάδια της υποξίας του εμβρύου. Παρόλα αυτά η παρακολούθηση του PI της μέσης εγκεφαλικής με σκοπό την λήψη της απόφασης για την επίσπευση του τοκετού, δεν

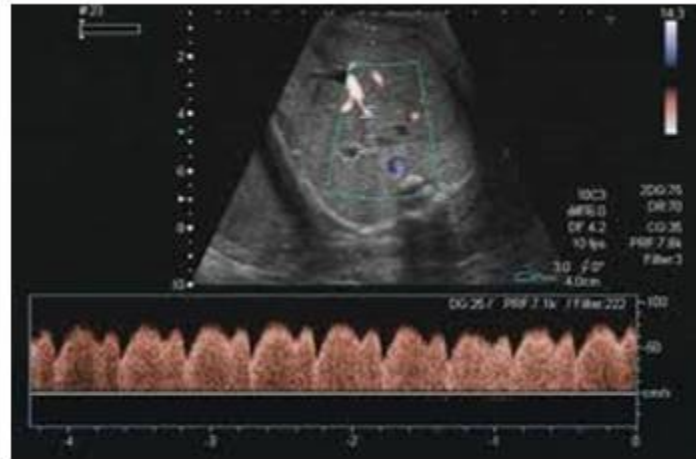
είναι αξιόπιστη γιατί ο PI συχνά γίνεται φυσιολογικός πριν την τελική επιδείνωση του εμβρύου.[75]



Εικόνα 7: Doppler Μέσης Εγκεφαλικής Αρτηρίας (MCA). Εικόνα από το διαδίκτυο

✓ Φλεβώδης πόρος

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το διαστολικό τμήμα της κυματομορφής είναι υψηλό και το α-κύμα, το οποίο αντιστοιχεί στο τέλος της διαστολής των κόλπων, είναι ρηχό (Εικόνα 8). Όταν το έμβρυο επιβαρύνεται, η κεντρική φλεβική πίεση αυξάνεται, το διαστολικό τμήμα της κυματομορφής μειώνεται και το α-κύμα αγγίζει τη βασική γραμμή ή αναστρέφεται. Αυτές οι αλλαγές δηλώνουν τα τελικά στάδια της εμβρυϊκής ασφυξίας και επικείμενη καρδιακή ανεπάρκεια. Η μελέτη του φλεβώδους πόρου δεν μπορεί να προσφέρει σημαντικά στην παρακολούθηση των εμβρύων με ΕΥΑ κατά το τρίτο τρίμηνο, γιατί ακολουθεί πολύ αργότερα τις αλλαγές στην ομφαλική αρτηρία. Στο δεύτερο τρίμηνο όμως οι διαδοχικές μετρήσεις του φλεβώδους πόρου, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατάσταση του εμβρύου που υπολείπεται σε μέγεθος.[76, 77]



Doppler φλεβώδους πόρου

Εικόνα 8: Doppler φλεβώδους πόρου. Εικόνα από το διαδίκτυο

✓ Ομφαλική φλέβα

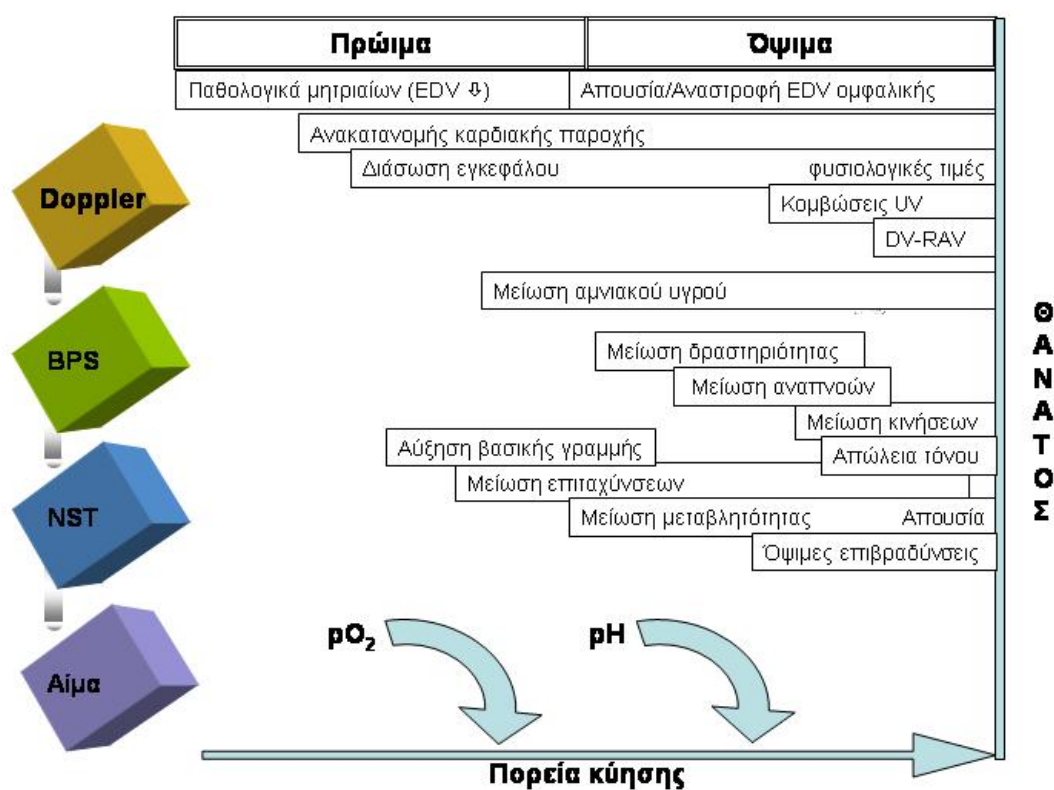
Οι μετρήσεις στην ομφαλική φλέβα μπορούν να εκτιμηθούν κατά την ενδοκοιλιακή της πορεία ή στον ομφάλιο λώρο. Σε ένα φυσιολογικό έμβρυο η κυματομορφή είναι χαμηλή και χωρίς παλμικότητα. Ένα σημείο προχωρημένης εμβρυϊκής ασφυξίας είναι η παρουσία παλμικότητας στην ομφαλική φλέβα και φανερώνει επικειμένη καρδιακή ανεπάρκεια. [78, 79]

1.7.4 Καρδιοτοκογραφία

Η καρδιακή συχνότητα του εμβρύου, μπορεί να μελετηθεί με το καρδιοτοκογράφημα. Η συχνότητα εκτέλεσης της καρδιοτοκογραφίας θα πρέπει να εκτιμάται με βάση τη βαρύτητα της ΕΥΑ, την κλινική κατάσταση της μητέρας και τα αποτελέσματα άλλων μεθόδων παρακολούθησης του εμβρύου. Η μεταβλητότητα του καρδιακού ρυθμού μπορεί να πολύ χρήσιμη κυρίως σε πολύ πρόωρα έμβρυα, όπου οι αλλαγές σε διαδοχικές εκτιμήσεις μπορεί να σημαίνουν μια προοδευτικά επιδεινούμενη εμβρυϊκή υποξία.[80]

1.7.5 Αμνιακό υγρό

Ο όγκος του αμνιακού υγρού μπορεί να υπολογιστεί αδρά με την υπερηχογραφία. Μειωμένη ποσότητα αμνιακού υγρού ή ολιγάμνιο, συνήθως συνδυάζεται με πιο σοβαρή ΕΥΑ. Δεν μπορεί όμως να προσφέρει πολλά όσον αφορά την πρόγνωση της έκβασης της κύησης με ΕΥΑ.[81, 82]



Σχήμα 3: Πρώιμα και όψιμα σημεία της κλινικής κατάστασης του εμβρύου με βάση τις μεθόδους παρακολούθησης του κατά τη διάρκεια της κύησης.

1.7.6 Εμβρυϊκές κινήσεις

Τα υποξαιμικά έμβρυα συνήθως έχουν μειωμένες κινήσεις του σώματος και των άκρων όπως επίσης και αναπνευστικές κινήσεις. Σε πολύ σοβαρή υποξία, υπάρχει επίσης και μείωση του μυϊκού τόνου.[83] Το εμβρυϊκό βιοφυσικό προφίλ βαθμολογεί

την κατάσταση του εμβρύου βασιζόμενο στις κινήσεις του εμβρύου, τις αναπνευστικές κινήσεις, την εκτίμηση του μυϊκού τόνου, το καρδιοτοκογράφημα και την ποσότητα του αμνιακού υγρού. Χαμηλή βαθμολογία συνδυάζεται με κακή πρόγνωση. Παρόλα αυτά τα έμβρυα με EYA παρουσιάζουν αλλαγές στο βιοφυσικό προφίλ, αφού εμφανίσουν αλλαγές στα Dopplers (Σχήμα 3). [67]

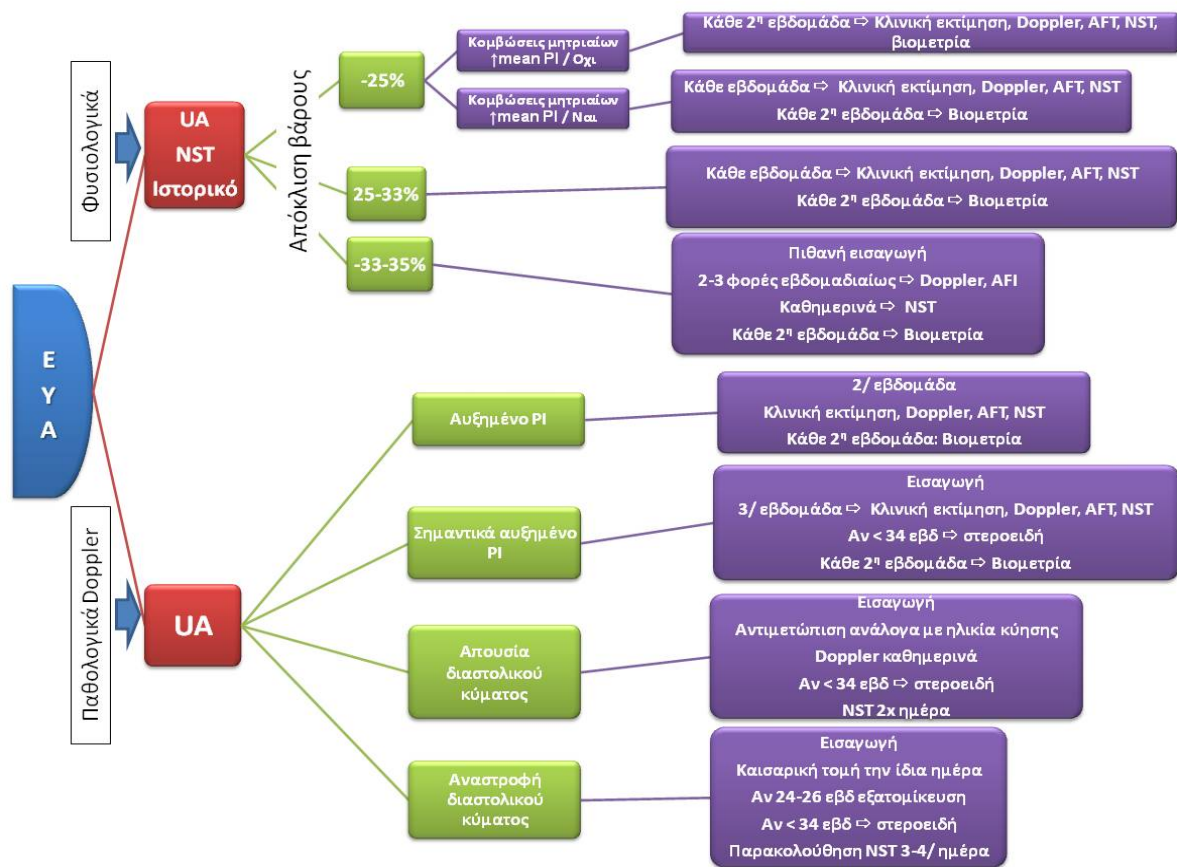
1.7.7 Ανάπτυξη του εμβρύου

Ο βαθμός της EYA, δηλαδή ο βαθμός απόκλισης του ρυθμού ανάπτυξης από το φυσιολογικό για τη δεδομένη ηλικία κύησης, είναι σημαντικό να έχει καταγραφεί για να οργανωθεί έτσι το πλάνο της μετέπειτα παρακολούθησης. Σε ένα έμβρυο με σοβαρή υπολειπόμενη ανάπτυξη όπως για παράδειγμα βάρους μικρότερου από 3SD από το μέσο όρο, θα πρέπει καταρχήν να υποβληθεί σε αναλυτικό υπερηχογραφικό έλεγχο ή και καριοτυπικό έλεγχο με σκοπό τον αποκλεισμό ανατομικών και χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Η αλλαγή στο μέγεθος του εμβρύου μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων σε διάστημα 2 εβδομάδων, υποδεικνύει τον ρυθμό ανάπτυξης του εμβρύου. Όταν η διαφορά μεταξύ των δύο αποκλίσεων του βάρους είναι μεγαλύτερη από 10%, τότε αυτό είναι σημείο EYA, ακόμα και αν το βάρος του εμβρύου παραμένει εντός φυσιολογικών ορίων. [62]

1.7.8 Πρωτόκολλο παρακολούθησης του εμβρύου με EYA

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, η αντιμετώπιση ή θεραπεία ενός εμβρύου κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής είναι μάλλον αδύνατη. Οι παρεμβάσεις του μαιευτήρα στοχεύουν στην έγκαιρη γέννηση του εμβρύου, πριν τη δημιουργία υποξαιμικών αλλοιώσεων ή ενδομήτριου θανάτου. Σε κάποιες περιπτώσεις οι μαιευτικές παρεμβάσεις υπαγορεύονται από την κλινική κατάσταση της μητέρας.

Όταν ένα έμβρυο διαγνωστεί με ΕΥΑ, η πρώτη μελέτη Doppler της ομφαλικής και των μητριάων αρτηριών, είναι μεγάλης σημασίας. Αν υπάρχουν παθολογικά Dopplers, τότε θα πρέπει να αποφασιστεί η περαιτέρω παρακολούθηση η οποία διαφέρει ανάλογα με την ηλικία κύησης. Το καρδιοτοκογράφημα μπορεί να γίνει αμέσως μετά τη μελέτη Doppler, εφόσον οι δύο αυτές εξετάσεις παρέχουν διαφορετικές πληροφορίες και η μία θα πρέπει να συμπληρώνει την άλλη.



Σχήμα 4: Προτεινόμενο πλάνο παρακολούθησης βασισμένο στα ευρήματα των υπερηχογραφικών μετρήσεων.

Τα έμβρυα τα οποία γεννιούνται αφού εμφανιστούν διαταραχές στη ροή του αίματος την ομφαλική αρτηρία (απουσία ή αναστροφή του διαστολικού κύματος), αλλά δεν έχουν εμφανίσει ακόμα ανωμαλίες στο καρδιοτοκογράφημα, έχουν σαφώς καλύτερη πρόγνωση από τα έμβρυα τα οποία έχουν παθολογικά Dopplers και

καρδιοτοκογράφημα. Επομένως ο μαιευτήρας, θα πρέπει να έχει σαν αρχή τη διεκπεραίωση του τοκετού πριν την εμφάνιση των καρδιοτοκογραφικών αλλοιώσεων. Τα περιστατικά μικρής βαρύτητας μπορεί να παρακολουθούνται σαν εξωτερικοί ασθενείς, αλλά τα βαρύτερα περιστατικά πρέπει να νοσηλεύονται και να έχουν πιο εντατική παρακολούθηση. Ένα προτεινόμενο πλάνο παρακολούθησης φαίνεται στο σχήμα 4.

1.8 Χρόνος Τοκετού

Μετά την 30^η-32^η εβδομάδα, και εφόσον το NST είναι φυσιολογικό και δεν υπάρχουν άλλα παθολογικά κλινικά σημεία, το κυριότερο κριτήριο επίσπευσης του τοκετού και επιδείνωσης της κατάστασης του εμβρύου, είναι το Doppler της ομφαλικής αρτηρίας.[84] Το ανάστροφο διαστολικό κύμα είναι δείκτης επίσπευσης του τοκετού. Η απουσία διαστολικού κύματος αποτελεί επίσης έναν κακό προγνωστικό δείκτη που φανερώνει πως το ρίσκο παράτασης της κύησης υπερβαίνει του οφέλους. Η απουσία διαστολικού κύματος αποτελεί ένδειξη για την διεκπεραίωση του τοκετού ανάλογα με την ηλικία κύησης σε διαφορετικά κέντρα. Το Βασιλικό Κολλέγιο Μαιευτήρων Γυναικολόγων συνιστά την επίσπευση του τοκετού όταν υπάρχει αυτό το εύρημα από τις 34 εβδομάδες και έπειτα, ενώ σε άλλα κέντρα το όριο είναι οι 30 ή 32 εβδομάδες της κύησης.

Πριν από τις 30 εβδομάδες της κύησης, δηλαδή στα πολύ πρόωρα και εξαιρετικά πρόωρα έμβρυα, η απόφαση για την επίσπευση του τοκετού είναι συχνά δύσκολη. Θα πρέπει να συνεκτιμούνται τα Dopplers από την ομφαλική αρτηρία, τη μέση εγκεφαλική αρτηρία, το φλεβώδη πόρο και την ομφαλική φλέβα, το NST και πληροφορίες σχετικά με το βάρος του εμβρύου, το ρυθμό ανάπτυξης και την ποσότητα του αμνιακού υγρού. Είναι δύσκολο να υπάρξουν λεπτομερή πρωτόκολλα που θα περιλαμβάνουν κάθε δυνατή περίπτωση, επομένως η μαιευτική παρέμβαση

θα πρέπει να εξατομικεύεται. Τα σοβαρά περιστατικά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται σε εξειδικευμένα κέντρα με τμήμα εμβρυομητρικής ιατρικής και νεογνολογικό τμήμα. Συχνές συγκριτικές εξετάσεις μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την επιδείνωση της κατάστασης του εμβρύου. Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, υποστηρίζουν πως οι πιο ισχυροί δείκτες επιδείνωσης της εμβρυϊκής κατάστασης σε αυτά τα έμβρυα, είναι το Doppler του φλεβώδους πόρου και (αυξημένο PI και όταν το κύμα φτάνει στο επίπεδο της βασικής γραμμής), η παλμικότητα της ομφαλικής φλέβας, η απουσία ή αναστροφή του διαστολικού κύματος της ομφαλικής αρτηρίας, και η μείωση της μεταβλητότητας στο καρδιοτοκογράφημα.

1.9 Τρόπος τοκετού

Τα περισσότερα έμβρυα με EYA και επηρεασμένη πλακουντιακή λειτουργία πιθανά να μη μπορούν να αντεπεξέλθουν στο στρες του τοκετού. Αν προϋπάρχει εμβρυϊκή υποξία προ του τοκετού, τότε η δραστηριότητα της μήτρας θα επιβαρύνει την κατάσταση του εμβρύου. Για αυτό το λόγο ο κοιλιακός τοκετός είναι λιγότερο συχνός σε έμβρυα με EYA.[85] Σε ένα πολύ πρόωρο έμβρυο με EYA και παθολογικά Dopplers θα πρέπει να προτιμάται η καισαρική τομή. Το ποσοστό καισαρικής τομής που περιγράφεται σε παρόμοιες περιπτώσεις σε εβδομάδες κύησης από 88-100%. Μετά από την 30^η-32^η εβδομάδα ένα έμβρυο με απουσία ή αναστροφή του διαστολικού κύματος συνήθως γεννιέται με καισαρική τομή. Σε περιπτώσεις όμως που υπάρχει διαστολικό κύμα αλλά το PI είναι αυξημένο, είναι πιο δύσκολο να αποφασιστεί ο τρόπος τοκετού. Συμπερασματικά λοιπόν, αν αποφασιστεί τοκετός σε ένα έμβρυο με EYA, τότε η καισαρική τομή είναι η μέθοδος εκλογής σε πολύ πρόωρα έμβρυα ή σε έμβρυα με σοβαρές διαταραχές στη ροή του αίματος της

ομφαλικής αρτηρίας. Θα πρέπει οπωσδήποτε να συνεκτιμούνται και άλλοι παράγοντες όπως η κατάσταση του τραχήλου, ο τόκος και το ιστορικό της εγκύου.

1.10 Πρόγνωση μετά τη γέννηση

Είναι πλέον αποδεκτό ότι τα έμβρυα με EYA εμφανίζουν μεγαλύτερη νοσηρότητα. Τα νεογνά με σοβαρή EYA κινδυνεύουν περισσότερο να εμφανίσουν προβλήματα στη νεογνική περίοδο και τα προβλήματα αυτά συχνά σχετίζονται με την υποκείμενη αιτία της EYA. Τα νεογνά με ιστορικό EYA μπορεί να εμφανίσουν περιγεννητική δυσπραγία και για αυτό είναι απαραίτητη η παρουσία του νεογνολόγου κατά τον τοκετό που θα παρακολουθήσει επίσης για την εμφάνιση υπογλυκαιμίας και υποθερμίας αποτέλεσμα των μειωμένων αποθεμάτων λίπους και γλυκογόνου. Η πολυκυτταραιμία που αναπτύσσεται ενδομητρίως λόγω της υποξίας μπορεί να αποτελεί προδιαθεσικό παράγοντα για αιμόλυση και υπερχολερυθριναιμία. Επιπλέον τα περισσότερα από αυτά τα νεογνά εμφανίζουν και τις επιπλοκές της προωρότητας, εφόσον τις περισσότερες φορές γεννιούνται νωρίτερα.

Οι επιπτώσεις της EYA εξακολουθούν και μετά την άμεση νεογνική περίοδο.[86] Τα περισσότερα νεογνά με EYA εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης μετά τη γέννηση και ισοσταθμίζουν τη μειωμένη αύξηση στα 2-3 τους χρόνια. Ένα μικρό ποσοστό παρόλα αυτά (10%) εμφανίζουν δυσκολία στη σίτιση και την πρόσληψη βάρους. Κάποιες μελέτες δείχνουν πως η θεραπεία με αυξητική ορμόνη σε αυτές τις περιπτώσεις βοηθά στην ομαλοποίηση της ανάπτυξης.[12] Δεν υπάρχουν όμως αρκετές μελέτες που να δείχνουν την επίδραση της EYA στη μακροπρόθεσμη νευρολογική ανάπτυξη αυτών των παιδιών ή στη συχνότητα εμφάνισης κεντρικής παράλυσης. Η χειρότερη πρόγνωση αφορά τα περιστατικά με σοβαρή EYA, πρώιμη EYA, πρόωρο τοκετό και παθολογική ροή αίματος στην

ομφαλική αρτηρία. Η μικρή περίμετρος κεφαλής κατά τη γέννηση σε συνδυασμό με μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης της κεφαλής κατά τη μετέπειτα περίοδο, αποτελεί δυσμενή παράγοντα για την νευρολογική ανάπτυξη του παιδιού. Οι περισσότερες μελέτες καταδεικνύουν ότι τα περισσότερα παιδιά με ΕΥΑ εμφανίζουν ήπιες διαταραχές συμπεριφοράς και μαθησιακές δυσκολίες κατά την παιδική ηλικία.[87] Επίσης έχει αναφερθεί ένας ελαφρά αυξημένος κίνδυνος για σύνδρομο αιφνιδίου νεογνικού θανάτου σε νεογνά με υπολειπόμενη ανάπτυξη. Ο χρόνος έναρξης της ΕΥΑ κατά τη διάρκεια της κύησης, η διάρκεια και βαρύτητα της ΕΥΑ, καθορίζουν και τις τυχόν επιπλοκές που θα εμφανιστούν στην παιδική ηλικία.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει πως η ανώμαλη ανάπτυξη κατά την ενδομήτρια ζωή, προδιαθέτει για την εμφάνιση νοσημάτων φθοράς κατά την ενήλικη ζωή όπως υπέρταση, σακχαρώδης διαβήτης τύπου II και στεφανιαία νόσο.[88] Η ανεπαρκής τροφοδοσία του εμβρύου με θρεπτικά συστατικά οδηγεί σε μεταβολικές και ορμονικές διεργασίες που μπορεί μακροπρόθεσμα να οδηγήσουν στην εμφάνιση των νοσημάτων αυτών. Μελέτες δείχνουν πως σε παιδιά με ιστορικό ΕΥΑ που έχουν γρήγορη ανάπτυξη κατά την παιδική ηλικία, η γρήγορη άθροιση λιπώδους ιστού συνοδεύεται με αντίσταση στην ινσουλίνη και κατά συνέπεια σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.[89] Η τακτική παρακολούθηση του βάρους, του ύψους και του δείκτη μάζας σώματος κατά την νεογνική παιδική και εφηβική ηλικία και η αποφυγή παχυσαρκίας μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση υπέρτασης, ΣΔ τύπου II και στεφανιαίας νόσου. [90]

1.11 Συμπεράσματα

Η αδυναμία του εμβρύου να αναπτυχθεί όσο του υπαγορεύει η γενετική του προδιάθεση σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Η αδυναμία αυτή μπορεί να προκαλείται από ανωμαλίες που αφορούν το έμβρυο, από

εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την τροφοδοσία του με θρεπτικά συστατικά, η τέλος διαταραχές της πλακουντιακής λειτουργίας που μεσολαβεί μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού μεταβολισμού. Η καθυστέρηση στην ανάπτυξη που οφείλεται σε εμβρυϊκούς παράγοντες όπως χρωμοσωμικές ή ανατομικές ανωμαλίες και ενδομητρικές λοιμώξεις, συνοδεύεται με συγκεκριμένη πρόγνωση. Στις περιπτώσεις όμως που η ΕΥΑ οφείλεται σε ανωμαλίες του πλακούντα, τότε η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης είναι αποτέλεσμα την ανεπαρκούς παροχής συστατικών στο έμβρυο και σε μικρότερο βαθμό η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η πρόγνωση σε αυτές τις περιπτώσεις είναι άμεσα συνυφασμένη με την επιμελή παρακολούθηση του εμβρύου από τον μαιευτήρα, και τη σωστή χρονική τοποθέτηση του τοκετού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΑΙΤΙΑ ΤΗΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

2.1 Εισαγωγή

Η αύξηση του εμβρύου επηρεάζεται από πολλούς γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες και επομένως η ΕΥΑ αποτελεί μία πολύπλοκη νόσο που δεν μπορεί να αποδοθεί σε βλάβη ενός συγκεκριμένου γενετικού μηχανισμού. Κάθε γονιδιακός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του εμβρύου θα πρέπει να δράσει σε ένα σχετικά πολύπλοκο σύστημα περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Η έρευνα αυτών των προδιαθεσικών παραγόντων έχει σαν στόχο, καταρχήν την εξακρίβωση της παθοφυσιολογίας και επιπλέον την αναζήτηση πιθανών διαγνωστικών και προγνωστικών μεθόδων.

2.2 Χρωμοσωμικές διαταραχές

Υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης ΕΥΑ και των καρυοτυπικών ανωμαλιών του εμβρύου. Μία μελέτη που περιελάμβανε 243 έμβρυα με ΕΥΑ χωρίς εμφανείς ανατομικές βλάβες, ανέδειξε ποσοστό ανώμαλου καρυότυπου στο 2%. Αυτό το ποσοστό ανήλθε στο 40% αν υπήρχε διαπιστωμένη ανατομική ανωμαλία του εμβρύου.[58] Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές διαταραχές ήταν στο 13, 18 και 21 χρωμόσωμα. Επομένως είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γίνεται ενδελεχής υπερηχογραφικός έλεγχος του εμβρύου που εμφανίζει ΕΥΑ και ειδικά σε περιπτώσεις με πρώιμη έναρξη ή βαρεία εξέλιξη, να γίνεται επιπρόσθετα και έλεγχος καρυότυπου.

2.3 Μωσαϊκισμός του πλακούντα

Οι καρυοτυπικές ανωμαλίες που αφορούν αποκλειστικά εξωεμβρυονικές δομές όπως ο πλακούντας, (δυσαρμονία καρυοτυπικών ευρημάτων μεταξύ πλακούντα και εμβρύου), περιγράφονται σε ποσοστό έως 2% του συνόλου των περιστατικών που έχουν υποβληθεί σε λήψη χοριακών λαχνών.[91] Οι περισσότερες περιπτώσεις αφορούν φυσιολογικές κυήσεις, όποτε και το ποσοστό των ανώμαλων κυττάρων είναι χαμηλό και η πρόγνωση είναι συνήθως καλή. Σε αυτά τα περιστατικά η βλάβη έχει συμβεί στις αρχικές μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ σε πιο σοβαρές περιπτώσεις υπάρχει τρισωμικό κύημα και βλάβη στη μειωτική διαίρεση. Το αρχικό λάθος στη μειωτική διαίρεση αφορά τον ένα γονέα και ακολουθεί μιτωτική διάσωση με την απώλεια του επιπλέον χρωμοσώματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επαναφορά του φυσιολογικού αριθμού χρωμοσωμάτων. Όσο αργότερα διορθωθεί το λάθος τόσο μεγαλύτερο θα είναι το ποσοστό ανωμάτων κυττάρων. Η παρουσία όμως τρισωμικών κυττάρων στον πλακούντα έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένο όγκο πλακούντα, αλλαγή στη μορφολογία του, πλακουντιακή δυσλειτουργία και συνεπώς ΕΥΑ.[14]

2.4 Γονιδιακή αποτύπωση

Η μεγάλη πλειοψηφία των αυτοσωμικών γονιδίων εκφράζονται και από τα δύο αλληλόμορφα τα οποία είναι ισότιμα λειτουργικά. Όμως για μία μικρή ομάδα γονιδίων που ονομάζονται γονίδια αποτύπωσης, η έκφραση τους γίνεται μόνο από το ένα αλληλόμορφο και εξαρτάται από το αν βρίσκονται στο πατρικό ή μητρικό χρωμόσωμα. Η διαπίστωση του φαινομένου της αποτύπωσης έγινε για πρώτη φορά μετά από πειράματα σε ποντίκια τη δεκαετία του 1980, όπου, παρήχθησαν έμβρυα με γενετικό υλικό μόνο από τον ένα γονέα. Αν και οι δύο τύποι κυημάτων (αμιγώς

πατρικής προέλευσης, ή αμιγώς μητρικής προέλευσης), ήταν διπλοειδικά, δεν επιβίωσαν μέχρι το τέλος της κύησης. Η παρατήρηση που προέκυψε από αυτά τα πειράματα ήταν πως τα πατρικής προέλευσης έμβρυα είχαν καλά ανεπτυγμένο εξωεμβρυονικό ιστό αλλά ελάχιστο ή καθόλου εμβρυϊκό ιστό και αντίθετα, τα μητρικής προέλευσης έμβρυα είχαν κακά ανεπτυγμένο εξωεμβρυονικό ιστό και πιο καλά σχηματισμένο έμβρυο.[92, 93]

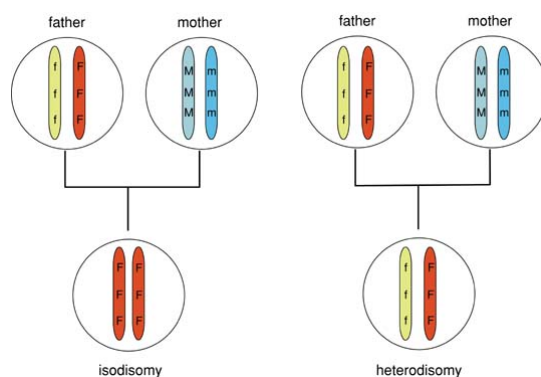
Παρόμοια ευρήματα έχουν παρατηρηθεί και σε ανθρώπινους ιστούς. Το τεράτωμα της ωοθήκης θεωρείται ότι δημιουργείται από ωοκύτταρα που ενεργοποιούνται με παθολογικό τρόπο, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένας ιστός με αμιγώς μητρικά χρωμοσώματα. Τα τερατώματα είναι όγκοι εμβρυονικής προέλευσης με στοιχεία και από τις τρεις εμβρυϊκές στιβάδες. Αν και τα τερατώματα περιέχουν διαφορετικά είδη ιστών δεν περιέχουν εξωεμβρυονικά στοιχεία. Αντίθετα η υδατιδώδης μύλη που είναι προέρχεται από τη συνένωση 2 σπερματοζωαρίων σε έναν άδειο σάκο έχει σαν αποτέλεσμα την περίσσεια πλακουντιακού ιστού, χωρίς όμως εμβρυϊκά στοιχεία. Αυτές οι μονογονεϊκές πατρικής προέλευσης κυήσεις έχουν επιθετικές διεισδυτικές ιδιότητες που υποδηλώνουν πως η δημιουργία του πλακούντα εξαρτάται από την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, ενώ η ανάπτυξη του εμβρύου απαιτεί και το μητρικό γενετικό υλικό.[94]

Σε πειράματα σε ζώα, κατάφεραν να δημιουργήσουν ποντίκια που είχαν και τα δύο χρωμοσώματα από τον ένα γονέα ένα φαινόμενο που ονομάζεται μονογονεϊκή δισωμία (uniparental disomy UPD). Στα ποντίκια αυτά παρατηρήθηκαν σημαντικές φαινοτυπικές διαφορές στα άτομα που είχαν μητρική ή πατρική UPD. Οι φαινότυποι αυτοί σχετίζονταν με διαταραχές στην ανάπτυξη όπως υπερβολική αύξηση, η υπολειπόμενη αύξηση όπως επίσης και προβλήματα συμπεριφοράς. Παρόλα αυτά δεν εμφανίζουν οι UPD όλων των χρωμοσωμάτων παθολογικούς

φαινοτύπους γεγονός που φανερώνει ότι τα γονίδια αποτύπωσης δεν διανέμονται ομοιόμορφα στο γενετικό υλικό.[95]

2.5 Μονογονεϊκή δισωμία (UPD)

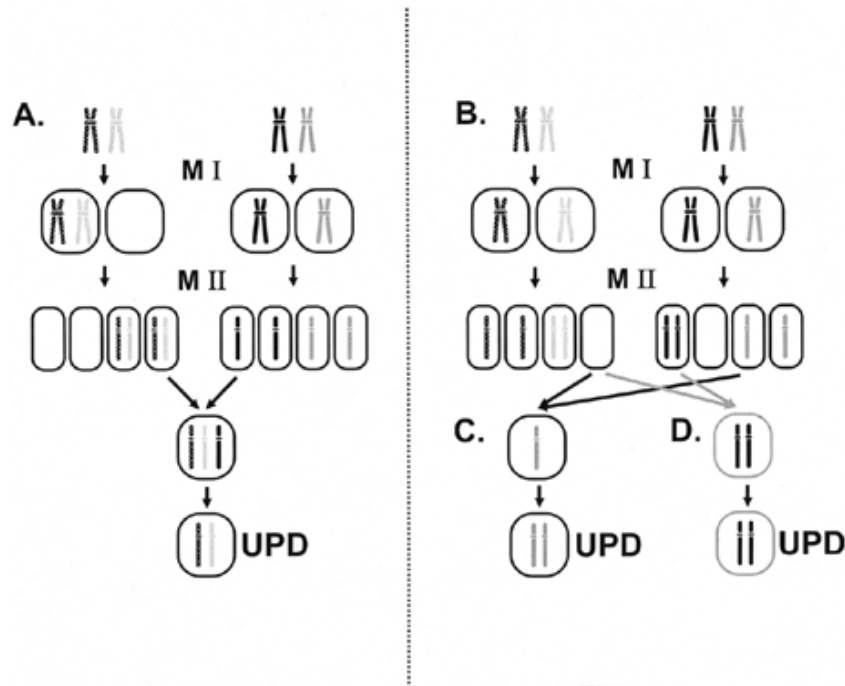
Κάθε άτομο, υπό φυσιολογικές συνθήκες κληρονομεί ένα χρωμόσωμα από κάθε γονέα, τα οποία έχουν κληρονομηθεί με τη σειρά τους από τους παππούδες. Η UPD ονομάζεται ισοδισωμία όταν τα δύο ίδια χρωμοσώματα είναι αντίγραφα του ίδιου χρωμοσώματος του ενός γονέα. Η ισοδισωμία μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα παθολογικό φαινότυπο, όταν ένα άτομο που φέρει ένα υπολειπόμενο γονίδιο στο ένα χρωμόσωμα αυτόματα γίνεται ομόζυγο και εκδηλώνει το νόσημα. Στην ετεροδισωμία, τα δύο χρωμοσώματα από τον ένα γονέα, είναι διαφορετικά μεταξύ τους και ουσιαστικά προέρχονται από τον παππού και τη γιαγιά (Σχήμα 5).[96] Στην ετεροδισωμία, μπορεί να υπάρχει διαταραχή στην έκφραση των γονιδίων αποτύπωσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία παθολογικών φαινοτύπων (Πίνακας 3).



Σχήμα 5: Ισοδισωμία και ετεροδισωμία σχηματικά. Εικόνα από το διαδίκτυο

Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να προκύψει μία UPD, ο πιο συχνός είναι η διάσωση ενός τρισωμικού εμβρύου με την απώλεια ενός υπεράριθμου χρωμοσώματος. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται ταυτόχρονα και μωσαϊκισμός του πλακούντα (Σχήμα 6).[14] Η τρισωμία 16 είναι η πιο συχνή τρισωμία που έχει συνδεθεί με την εμφάνιση μωσαϊκισμού και συνεπώς το

χρωμόσωμα 16 ήταν από τα πρώτα που μελετήθηκαν σε σχέση με την εμφάνιση ΕΥΑ.[97, 98] Σε αυτές τις περιπτώσεις δεν είναι βέβαιο αν η ΕΥΑ οφείλεται στον μωσαϊκισμό του πλακούντα ή είναι αποτέλεσμα της UPD που διαταράσσει την έκφραση των γονιδίων αποτύπωσης που σχετίζονται με την ανάπτυξη.



Σχήμα 6: Μηχανισμοί δημιουργίας της μονογονεϊκής δισωμίας. Εικόνα από το διαδίκτυο

Χρωμόσωμα	Γονεϊκή προέλευση	Σύνδρομο
6	Πατρική	Παροδικός νεογνικός διαβήτης
7	Μητρική	Σοβαρό IUGR, Silver-Russel
11	Πατρική	Beckwith Wiedemann syndrome
14	Μητρική	Υποτονία, καθυστέρηση κινητικής
15	Μητρική	Prader-Willi syndrome
	Πατρική	Angelman syndrome
16	Μητρική	Σοβαρό IUGR
20		Albrights κληρονομική

Πίνακας 3: Γνωστοί τύποι μονογονεϊκής δισωμίας και τα σύνδρομα που προκαλούν

Υπάρχουν πάντως ενδείξεις πως όσον αφορά το χρωμόσωμα 7, η παρουσία τρισωμικών κυτταρικών σειρών στον πλακούντα, δεν επιδρά στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ σημαντική καθυστέρηση της ανάπτυξης παρατηρείται όταν υπάρχει μωσαϊκισμός του πλακούντα και UPD μητρικής προέλευσης του χρωμοσώματος 7.[99]

2.6 Γονίδια αποτύπωσης και εμβρυϊκή ανάπτυξη

Η γονιδιακή αποτύπωση αποτελεί μια επιγενετική τροποποίηση του DNA όπου απενεργοποιείται το ένα αλληλόμορφο ενός ζεύγους γονιδίων, με τρόπο που εξαρτάται από τη γονεϊκή του προέλευση. Συμβαίνει κυρίως μετά από μεθυλίωση των κυτοσινών σε περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε δινουκλεοτίδια κυτοσίνης-γουανίνης (CpG), περιοχές που είναι επίσης γνωστές ως περιοχές ελέγχου της αποτύπωσης (Imprinting Control Regions, ICR). Αυτά τα «αποτυπώματα» παραμένουν σταθερά κατά τους διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής του DNA κατά την ανάπτυξη του οργανισμού.[100, 101] Εμπλέκονται άμεσα στην μεταγραφή επιδρώντας στη σύνδεση μεθυλ-ευαίσθητων συνδετικών πρωτεϊνών στο DNA, και έμμεσα αλλάζοντας την περιοχική δομή της χρωματίνης.

Τα γονίδια αποτύπωσης επομένως, εκφράζονται επιλεκτικά ή από το μητρικό είτε από το πατρικό χρωμόσωμα. Αφορούν το 0,1-0,5% των γονιδιώματος, αλλά έχουν δυσανάλογα σημαντική επίδραση στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.[92, 102] Βλάβη στην έκφραση τους όπως σε περιπτώσεις έλλειψης, λανθασμένης παύσης της έκφρασης ή απώλεια της αποτύπωσης (Loss of Imprinting LOI), έχει συνδεθεί με διάφορες παθολογικές οντότητες όπως περιπτώσεις συγγενών διαταραχών στην αύξηση.[103] Τα γονίδια αποτύπωσης κωδικοποιούν μία σειρά από πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο ελέγχοντας την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και την αξιοποίησή τους.[104, 105]

Η διαμάχη μεταξύ του πατρικού και του μητρικού γενετικού υλικού για την κατανομή των ενεργειακών πόρων στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, θεωρείται πως είναι η υποκείμενη αιτία της εξέλιξης της αποτύπωσης. Αυτή η θεωρία της διαμάχης των φύλων ή της προστασίας του ημετέρου, υποστηρίζει πως το γενετικό υλικό του πατέρα έχει την τάση να μεγιστοποιεί την πρόσληψη των ενεργειακών πόρων που παρέχονται από τη μητέρα προς το έμβρυο με σκοπό το όφελος του απογόνου του πατέρα εις βάρος των μελλοντικών εμβρύων που θα κυοφορήσει η μητέρα που μπορεί να προέρχονται από διαφορετικό γενετικό υλικό. Αντίθετα το γενετικό υλικό της μητέρας περιορίζει την αθρόα παροχή συστατικών προς το έμβρυο, με σκοπό να διανείμει ισότιμα τα ενεργειακά αποθέματα της μητέρας σε όλα τα έμβρυα ανεξάρτητα από την προέλευση του πατρικού γενετικού υλικού. Επομένως τα πατρικής προέλευσης εκφραζόμενα γονίδια, ευνοούν την ενδομήτρια ανάπτυξη, ενώ τα μητρικής προέλευσης εκφραζόμενα γονίδια, έχουν την αντίθετη δράση. Αυτή η συμπληρωματική αλλά αντίθετη δράση των γονιδίων αποτύπωσης, αποτελεί τη βάση για την θεωρία του Haig που περιγράφει την υπόθεση της γονεϊκής αντιπαράθεσης. [106, 107]

Ο προγραμματισμός της αποτύπωσης δεν είναι ίδιος σε όλους του ιστούς ενός οργανισμού. Για παράδειγμα, στα ποντίκια, τα πρόβατα και τους ανθρώπους το γονίδιο *IGF2* που είναι γονίδιο αποτύπωσης, εκφράζεται από το πατρικό χρωμόσωμα στους περισσότερους ιστούς του εμβρύου, εκτός από τον εγκέφαλο όπου εκφράζεται και από τα δύο αλληλόμορφα για όλη τη ζωή του ατόμου.[108] Το πρόγραμμα αποτύπωσης διαφέρει και μεταξύ διαφορετικών ειδών. Πολλά γονίδια έχουν αντίθετη αποτύπωση σε διαφορετικά είδη. Κάποια γονίδια έχουν αντίθετη αποτύπωση στον άνθρωπο και στα ποντίκια στα ίδια στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όλος ο προγραμματισμός της αποτύπωσης διαγράφεται με μία γενικευμένη απομεθυλίωση του γενετικού υλικού

και στη συνέχεια εγκαθίσταται εκ νέου στα επόμενα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.[100] Περίπου 80 γονίδια αποτύπωσης εκφράζονται στον πλακούντα.[109] Σε γενικές γραμμές τα πατρικής προέλευσης εκφραζόμενα γονίδια, ευνοούν την αύξηση του πλακούντα, ενώ τα μητρικής προέλευσης εκφραζόμενα γονίδια καθυστερούν την αύξηση του μεγέθους του πλακούντα. Επομένως η δράση των γονιδίων αποτύπωσης στην εμβρυϊκή αύξηση μπορεί να προέρχεται έμμεσα από τις αλλαγές που προκαλούν στην ανάπτυξη του πλακούντα και ειδικά στην λαβυρινθική τροφοβλάστη, που αποτελεί την κυριότερη επιφάνεια της εμβρυομητρικής ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών σε πιο προχωρημένα στάδια της κύησης. Σε άτομα όπου δεν εκφράζονται τα γονίδια *p57KIP2* και *Ipl* παρατηρείται πλακουντομεγαλία και υπερβολική αύξηση του εμβρύου και ταυτόχρονα η λαβυρινθική τροφοβλάστη εμφανίζει ανώμαλη αγγείωση, αν και είναι δομικά ακέραια.[110] Επομένως η λαβυρινθική τροφοβλάστη έχει κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και αποτελεί την πρωταρχική εστία δράσης των γονιδίων αποτύπωσης. Γονίδια όπως τα *Ins2*, *Gnas*, *Mash2* είναι πλέον αποδεκτό πως ρυθμίζουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη μέσω των δράσεων τους στον κυτταρικό κύκλο. Η επίδραση κάποιων άλλων γονιδίων στην εμβρυϊκή ανάπτυξη γίνεται μέσω του Insulin Growth Factor 2 (*Igf2*). Τα γονίδια αυτά είναι το ίδιο το *IGF2*, το *IGF2r*, *H19* και το *Grb10*. Η εξισορροπημένη έκφραση όλων αυτών των γονιδίων που αρκετές φορές ασκούν αντίθετη δράση στον πλακούντα και το έμβρυο, έχει σαν αποτέλεσμα την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου. [109]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ

3.1 Εισαγωγή

Το σύνολο των χαρακτηριστικών ενός κυττάρου και κατ' επέκταση ενός οργανισμού βρίσκεται αποθηκευμένο με τη μορφή κώδικα στην ακολουθία των βάσεων του DNA. Ο κώδικας αυτός μεταφέρεται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης από το πατρικό στα θυγατρικά κύτταρα. Το αλφάβητο του DNA που αποτελείται από τέσσερα γράμματα (αδερίνη, γουανίνη, κυτοσίνη και θυμίνη) μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής και τη δημιουργία του mRNA, στη συνέχεια μεταφράζεται σε ένα αλφάβητο 20 γραμμάτων (τα 20 αμινοξέα) και τη δημιουργία των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που παράγονται μέσα στα κύτταρα ρυθμίζουν το μεταβολισμό των κυττάρων, την πολικότητα τους, το σχήμα τους, τη συγκολλητικότητα τους και την υποδεκτικότητα σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Ουσιαστικά η ταυτότητα ενός κυττάρου καθορίζεται από τις πρωτεΐνες που περιέχει.[111] Πως ρυθμίζεται όμως η ποιότητα των πρωτεϊνών που θα εκφραστούν σε κάθε κύτταρο. Ποιος μηχανισμός θα καθορίσει την παραγωγή της ινσουλίνης σε ένα παγκρεατικό κύτταρο και της ακετυλοχολίνης σε ένα νευρικό; Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται είναι δύο ειδών: γενετικοί και επιγενετικοί. Οι γενετικοί μηχανισμοί αφορούν τις διαδικασίες αντιγραφής μεταγραφής και μετάφρασης του DNA ενώ οι επιγενετικοί μηχανισμοί αφορούν αλλαγές στη λειτουργία του DNA που δεν σχετίζονται με αλλαγές στην ακολουθία των βάσεων.[112] Οι επιγενετικοί

μηχανισμοί επομένως δεν προκαλούν αλλαγές στη δομή του DNA αλλά έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη ενός οργανισμού. [113]

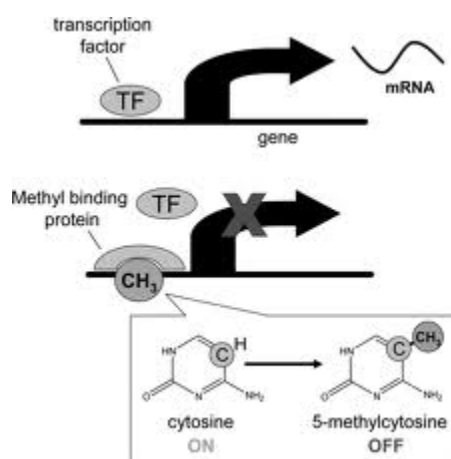
Ο σημαντικότερος ίσως επιγενετικός μηχανισμός ρύθμισης της λειτουργίας του γενετικού υλικού είναι η μεθυλίωση της κυτοσίνης του DNA.[114] Αποτελεί ένα ρυθμιστικό μηχανισμό της έκφρασης του γενετικού υλικού που έχει σαν κυριότερο σκοπό τη διατήρηση της σταθερότητας του. Στον άνθρωπο η μεθυλίωση του εκκινήτη των γονιδίων δρα σαν ρυθμιστικός μηχανισμός της έκφρασης του DNA. Τα γονίδια που μεθυλιώνονται «κλειδώνονται» και δεν μπορούν να εκφραστούν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μεθυλίωση περιοχών των χρωμοσωμάτων που θεωρούνται ασταθείς, όπως η ετεροχρωματίνη γύρω από το κεντρομερές, που θεωρείται εξαιρετικής σημασίας για τη διατήρηση της σταθερότητας του χρωμοσώματος.[115] Η μεθυλίωση εμπλέκεται σε έναν ευρύ αριθμό βιολογικών φαινομένων μεταξύ των οποίων η καταστολή της έκφρασης των γονιδίων, η καρκινογένεση, η γονιδιακή αποτύπωση, η απενεργοποίηση του ενός Χ χρωμοσώματος, και τέλος η πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.[116]

3.2 Μηχανισμός

Η μεθυλίωση της κυτοσίνης του DNA είναι μία ενδογενής μετατροπή του DNA στα θηλαστικά και πραγματοποιείται με την ενζυματική προσθήκη μιας μεθυλοομάδας στη θέση 5' του άνθρακα της κυτοσίνης. Τα ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση της κυτοσίνης είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες οι οποίες μετατρέπουν την κυτοσίνη σε μεθυλκυτοσίνη.[40, 117, 118] Στους ανθρώπους, περίπου το 80% των δινουκλεοτιδίων CpG είναι μεθυλιωμένα. Τα παραπάνω δινουκλεοτίδια δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένα στο γενετικό υλικό. Μεμονωμένα δινουκλεοτίδια CpGs απαντώνται ένα ανά 80 δινουκλεοτίδια. Συναντούμε όμως και νησίδια δινουκλεοτιδίων CpGs τα οποία αποτελούνται από 200 περίπου ζεύγη βάσεων και

στα οποία παρατηρείται πενταπλάσια περίπου συχνότητα εμφάνισης δινουκλεοτιδίων κυτοσίνης-γουανίνης από ότι στο υπόλοιπο γενετικό υλικό. Από τη στιγμή που ένα δινουκλεοτίδιο μεθυλιώνεται σε ένα κύτταρο, θα παραμείνει μεθυλιωμένο και σε όλους τους απογόνους του.[119]

Η μεθυλίωση στους εκκινητές των γονιδίων έχει σαν αποτέλεσμα την μη αναγνώριση τους από τους παράγοντες μεταγραφής και την RNA πολυμεράση, αφού οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες προτιμούν να συνδέονται με μία πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται μεθυλ-κυτοσίνη συνδετική πρωτεΐνη ή MeCP.[120, 121] Όταν η περιοχή ενός εκκινητή αναγνωριστεί από έναν παράγοντα μεταγραφής ως μεθυλιωμένη, τότε η μεταγραφή θα ανασταλεί (Σχήμα 7).[122]



Σχήμα 7: Σχηματική αναπαράσταση της αναστολής της μεταγραφής μετά από μεθυλίωση των εκκινητών του γονιδίου. Εικόνα από το διαδίκτυο.

Ορισμένοι παράγοντες μεταγραφής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην μεθυλίωση, ακόμη και η παρουσία ενός μεθυλιωμένου δινουκλεοτιδίου αρκεί για να ανασταλεί η μεταγραφή. Σε άλλους εκκινητές η επίδραση της μεθυλίωσης είναι πιο σταδιακή –όσο μεγαλύτερο το ποσοστό των μεθυλιωμένων δινουκλεοτιδίων των CpG τόσο μεγαλύτερη η αναστολή της μεταγραφής. Σε μερικές περιπτώσεις όταν ένα ανενεργό γονίδιο πρέπει να ενεργοποιηθεί, πυρηνικές δεμεθυλάσες θα

αφαιρέσουν τις μεθυλοομάδες από τον εκκινητή. Υποστηρίζεται πως το μοτίβο μεθυλίωσης σε κάθε οργανισμό, σαν σκοπό έχει τη διαμερισματοποίηση του γονιδιώματος σε μεταφραστικά ενεργείς και ανενεργείς ζώνες.[116]

Έχουν αναγνωρισθεί 5 ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση της κυτοσίνης του DNA, στα θηλαστικά.[117, 118] Καταστροφή ενός από τα γονίδια που ελέγχουν την έκφραση αυτών των ενζύμων στα εμβρυϊκά κύτταρα των ποντικών αποβαίνει θανατηφόρος. Έμβρυα ποντικών που έχουν ομόζυγη έλλειψη *Dnmt1* ή *Dnmt3B* πεθαίνουν πριν τη γέννηση, ενώ η έλλειψη του *Dnmt3A* οδηγεί σε θάνατο 4 εβδομάδες μετά τη γέννηση.[123] Τα παραπάνω ένζυμα είναι παρόντα στη μεθυλίωση του γενετικού υλικού των γενετικών κυττάρων, αλλά φαίνεται πως δρουν σε διαφορετικές θέσεις του DNA. Η ενζυμική δράση της *Dnmt1* αφορά σχεδόν αποκλειστικά τη μεθυλίωση ημιμεθυλιωμένου DNA, πρόκειται δηλαδή για το ένζυμο που «ολοκληρώνει» τη μεθυλίωση και εκφράζεται σε όλα τα σωματικά κύτταρα.[124]

Ο «χάρτης» μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδιακών περιοχών παρουσιάζει πολυμορφία μεταξύ διαφορετικών ατόμων και είναι κληρονομούμενος, γεγονός που υποδηλώνει ή την διατήρηση ενός συγκεκριμένου σχεδίου σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης ή την καταγραφή του προτύπου της μεθυλίωσης στο γενετικό υλικό.[125, 126]

3.3 Ρόλος

Η μεθυλίωση του DNA αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που δεν χρειάζονται από ένα συγκεκριμένο κύτταρο. Αυτός ο μηχανισμός που επιτρέπει την διαφοροποίηση - π.χ. το κύτταρο που θα διαφοροποιηθεί σε ηπατοκύτταρο θα αναστείλει όλα τα γονίδια υπεύθυνα για την μεσεγχυματική διαφοροποίηση και αυτή η αναστολή θα

πρέπει να είναι μόνιμη- δηλαδή θα κληροδοτηθεί από το πατρικό κύτταρο σε όλα τα θυγατρικά.

Το ωάριο και το σπερματοζωάριο αποτελούν κύτταρα που είναι περισσότερο διαφοροποιημένα από τα αρχικά πολυδύναμα κύτταρα του εμβρύου και συνεπώς άκρως μεθυλιωμένα. Μετά τη δημιουργία του ζυγώτη και κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, στο DNA του μοριδίου (έμβρυο 16 κυττάρων τρεις ημέρες μετά από τη σύλληψη) υπόκειται γενικευμένη απομεθυλίωση. Τα δινουκλεοτίδια απομεθυλιώνονται σε μεγάλη κλίμακα έτσι ώστε ενεργοποιείται σχεδόν όλο το γονιδίωμα (με την εξαίρεση ορισμένων γονιδίων αποτύπωσης). Στη συνέχεια, όσο τα κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται, οι εκκινητές των γονιδίων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση θα μεθυλιωθούν ξανά με βάση ένα αυστηρό πρόγραμμα το οποίο εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου.[100]

3.4 Διαταραχές στο μηχανισμό μεθυλίωσης

Η μεθυλίωση επομένως είναι ένας μηχανισμός ο οποίος σαν σκοπό έχει την ομαλή λειτουργία και ανάπτυξη ενός οργανισμού. Αποτελεί όμως μία πολύ ευαίσθητη διαδικασία, ευάλωτη σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, που όταν διαταραχθεί μπορεί να οδηγήσει σε μία σειρά νοσημάτων που συνήθως σχετίζονται με την κυτταρική αύξηση.[40, 127, 128]

Ένα παράδειγμα διαταραχής στο μηχανισμό της μεθυλίωσης αφορά μία μορφή συγγενούς νοητικής καθυστέρησης, το σύνδρομο Rett, που είναι ένα φυλοσύνδετο νόσημα που χαρακτηρίζεται από νευροαναπτυξιακή καθυστέρηση και αυτιστική συμπεριφορά και αφορά αποκλειστικά θηλυκά άτομα.[129] Είναι αποτέλεσμα μία μετάλλαξης σε ένα γονίδιο του X χρωμοσώματος, που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που συνδέεται με μεθυλιωμένο DNA.[130]

Άλλα νοσήματα έχουν συσχετιστεί επίσης με επιγενετικές βλάβες γονιδίων αποτύπωσης. Παραδείγματα είναι το Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) και το Silver-Russel syndrome (SRS) στο χρωμόσωμα 11p15, το Prader-Willi syndrome (PWS) και το Angelman syndrome (AS) στο χρωμόσωμα 15q11-q13. Το PWS είναι ένα σύνδρομο με μέτρια προς σοβαρή νοητική στέρηση όπου οι ασθενείς είναι υπέρβαροι λόγω υπερφαγίας. Οι ασθενείς με σύνδρομο AS εμφανίζουν σοβαρή νοητική στέρηση είναι πολύ αδύνατοι, υπερκινητικοί και εμφανίζουν διαταραχές στην κινητικότητα και ανεξέλεγκτο γέλιο.[131, 132]

Η αρχική ένδειξη πως αυτά τα σύνδρομα ήταν αποτέλεσμα βλάβης στην αποτύπωση, προήλθε όταν βρέθηκε πως οι ελλείψεις των γονιδίων ήταν αντίθετης γονεϊκής προέλευσης. Στο PWS η έλλειψη αφορά το πατρικό αλληλόμορφο, ενώ στο AS η έλλειψη εντοπίζεται στο μητρικό αλληλόμορφο. Επιπλέον, βρέθηκαν ασθενείς με PWS που εμφάνιζαν UPD μητρικής προέλευσης για το χρωμόσωμα 15, ενώ ασθενείς με AS είχαν UPD πατρικής προέλευσης για το ίδιο χρωμόσωμα. [133]

Το BWS χαρακτηρίζεται από ανωμαλίες στην ανάπτυξη όπως ημιϋπερτροφία, μακρογλωσσία και γιγαντισμό. Η πιο συχνή ανωμαλία στο BWS είναι η LOI στο IGF2 χωρίς κάποια εμφανή χρωμοσωμική ανωμαλία. Φαίνεται πως επιγενετικές και πιο συγκεκριμένα βλάβες στη μεθυλίωση του DNA στην περιοχή 11p15.5 είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση του συγκεκριμένου συνδρόμου. [134]

Τέλος το SRS είναι ένα ετερογενές σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από σοβαρή νοητική στέρηση, σοβαρή EYA και μειωμένη ανάπτυξη μετά τη γέννηση, δυσμορφικό προσωπείο και άλλες μικρότερες ανωμαλίες.[135] Η υπομεθυλίωση στην περιοχή 11p15 αποτελεί την κυριότερη αιτία του συνδρόμου. Η αντίθετη επιγενετική βλάβη, δηλαδή υπερμεθυλίωση στην ίδια περιοχή, έχει παρατηρηθεί σε

ασθενείς με σύνδρομο BWS το οποίο όπως προαναφέρθηκε αποτελεί ένα σύνδρομο υπερανάπτυξης. [136, 137]

Ο συσχετισμός της βλάβης του μηχανισμού της μεθυλίωσης και της δημιουργίας ή της εξέλιξης διαφόρων τύπων καρκίνου έχει πλέον αποδειχθεί και πειραματικά. Πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι σιωπηλά στα κύτταρα των όγκων, μετά από μεθυλίωση των εκκινητών τους. Αυτή η ανώμαλη μεθυλίωση είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της εξέλιξης του προκαρκινικού σταδίου σε καρκίνο. [138] Επιπλέον η ενεργοποίηση ογκογονιδίων μαζί με την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί να παίζουν μείζονα ρόλο, όχι μόνο στη δημιουργία του καρκίνου αλλά και στην εξέλιξη του και την ανταπόκριση του στη θεραπεία.

Η υπομεθυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα την ακατάλληλη ενεργοποίηση γονιδίων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη νεοπλασιών και αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν πλεονέκτημα στην ανάπτυξη τους σε σχέση με τα υγιή κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα κλωνοποιούνται και αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό κυττάρων στον όγκο. Η υπομεθυλίωση απαντάται σε πολλά είδη πρωτοπαθών καρκίνων όπως μαστού, τραχήλου, ωοθηκών, εγκεφάλου, ήπατος, εντέρου. Η έκταση της υπομεθυλίωσης σε έναν όγκο, έχει άμεση σχέση με το βαθμό κακοήθειας του. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει στο μέλλον ένα σημαντικό βιολογικό δείκτη της εξέλιξης του καρκίνου. [139, 140]

3.5 Μεθυλίωση και εμβρυϊκή ανάπτυξη

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη που ξεκινά από ένα και μοναδικό κύτταρο τον ζυγώτη, χαρακτηρίζεται από ακραία κυτταρική ανάπτυξη που περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό την απόπτωση και τη διαφοροποίηση. Στους ανθρώπους το πλήρες

έμβρυο (3εκ σε μήκος) έχει σχηματισθεί 63 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Ο υπόλοιπος χρόνος μιας φυσιολογικής κύησης (244 ημέρες) αφιερώνεται στην εμβρυϊκή αύξηση, που σημαίνει περαιτέρω αύξηση όλων των ιστών και των οργάνων που υπάρχουν στο έμβρυο και την ωρίμανση τους.[141]

Όλα τα κύτταρα του εμβρύου παρά τα διαφορετικά σχήματα μεγέθη και λειτουργία, περιέχουν την ίδια γενετική πληροφορία στον πυρήνα τους. Η κυτταρική διαφοροποίηση χαρακτηρίζεται από τη μόνιμη ενεργοποίηση και απενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων που επιτρέπουν έτσι στο αδιαφοροποίητο κύτταρο να εξειδικευτεί.[111] Τα αδιαφοροποίητα εμβρυϊκά κύτταρα συνήθως δίνουν ένα επίσης αδιαφοροποίητο κύτταρο και ένα πιο διαφοροποιημένο θυγατρικό κύτταρο. Τα θυγατρικά κύτταρα προοδευτικά διαφοροποιούνται πλήρως μετά από διαδοχικές διαιρέσεις.[142] Έτσι τα διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα έχουν μόνιμως απενεργοποιημένα μια μεγάλη σειρά γονιδίων. Κατά τη δημιουργία και την αρχική ανάπτυξη του εμβρύου, όλα τα γονίδια είναι δυνητικά ενεργά και ικανά για μεταγραφή.[143] Αυτός ο γονιδιακός καταρράχτης είναι κρίσιμος όχι μόνο για τη διατήρηση της φυσιολογικής ζωής των κυττάρων αλλά επίσης και για τη απόφαση της πορείας του κάθε κυττάρου κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη (διαφοροποίηση).[141]

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης τέτοιου είδους γεγονότα, πραγματοποιούνται χωρίς άμεσο γενετικό έλεγχο αλλά με επιγενετικούς μηχανισμούς, ο βασικότερος εκ των οποίων στον άνθρωπο είναι η μεθυλίωση του DNA.

Η ανάπτυξη των θηλαστικών χαρακτηρίζεται από διπλή μεθυλίωση του γενετικού υλικού που συμβαίνει αρχικά κατά την ανάπτυξη γαμετών και στη συνέχεια κατά την προεμφυτευτική περίοδο.[100] Τα ευρέως μεθυλιωμένα πρωτογενή ωοθυλάκια μετά την ενεργοποίησή τους υπόκεινται ταχεία

υπομεθυλίωση με αποτέλεσμα να χάνεται σχεδόν όλη η μεθυλίωση. Η ακριβής χρονική στιγμή της de novo μεθυλίωσης δεν έχει ακριβώς καθοριστεί αλλά συμβαίνει με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε οι ώριμοι γαμέτες και των δύο φύλων τελικά να είναι ευρέως μεθυλιωμένοι και συνεπώς άκρως διαφοροποιημένοι.

Η δεύτερη φάση του επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης πραγματοποιείται μεταξύ της γονιμοποίησης και του σχηματισμού της βλαστοκύστης.[144, 145] Κατά τη γονιμοποίηση παρατηρείται μία ταχύτατη ασύμμετρη και χαρακτηριστική για κάθε γονεϊκό κύτταρο, απώλεια της μεθυλίωσης. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται χωρίς να υπάρξει αντιγραφή ή μεταγραφή του DNA και ονομάζεται ενεργής απομεθυλίωση. Από κει και πέρα παρατηρείται μία σταδιακή μείωση της μεθυλίωσης μέχρι το στάδιο του μοριδίου. Αυτή η μείωση είναι αποτέλεσμα της απουσίας της κυριότερης μεθυλοτρανφεράσης Dnmt1 κατά την αντιγραφή του DNA. Έτσι οι μόλις αντιγραμμένες αλυσίδες του DNA δεν μπορούν να μεθυλιωθούν και το ποσοστό των μεθυλιωμένων κυτοσινών ανά πυρήνα, σταδιακά μειώνεται.[112] Αυτή η απώλεια της μεθυλίωσης του DNA που έχει να κάνει με τις διαδοχικές αντιγραφές ονομάζεται παθητική απομεθυλίωση. Η έναρξη της de novo μεθυλίωσης αρχίζει μετά από τον 5^ο κυτταρικό κύκλο και συμβαδίζει με την έναρξη της διαδικασίας διαφοροποίησης.

Η εγκατάσταση των δύο πρώτων διαφορετικών κυτταρικών σειρών έχει ως αποτέλεσμα μια ακόμη ασυμμετρία. Τα κύτταρα της έσω θήκης, από τα οποία προέρχονται όλοι οι ιστοί του ενήλικα, υπερμεθυλιώνονται ενώ το τροφοεκτόδερμα από το οποίο προέρχονται όλοι οι σχηματισμοί του πλακούντα, υπομεθυλιώνεται. Αυτή η διαφορά παραμένει και αντανακλά το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης των σωματικών κυττάρων και το χαμηλό ποσοστό μεθυλίωσης των εξωεμβρυικών ιστών του πλακούντα.[146] Από τον σωματικό ιστό που δημιουργείται από την έσω θήκη είναι και τα υψηλά μεθυλιωμένα PGCs τα οποία σχηματίζονται την 7^η ημέρα από

εξω- εμβρυϊκό μεσόδερμα του αναπτυσσόμενου εμβρύου.[147] Η μετανάστευση τους μέσω της αλλαντοΐδος στις αναπτυσσόμενες γενετικές ταινίες, όπου τελικά θα διαφοροποιηθούν σε ώριμους γαμέτες, ολοκληρώνει τον κύκλο του επιγενετικού επαναπρογραμματισμού.

Παρά τη γενικευμένη μείωση του ποσοστού μεθυλίωσης κατά την προεμφυτευτική περίοδο ανάπτυξης, τα γονίδια αποτύπωσης παραμένουν ανθεκτικά στην απομεθυλίωση. Μία από τις θεωρίες που προσπαθεί να εξηγήσει τον ρόλο της ενεργητικής απομεθυλίωσης είναι πως εξυπηρετεί ουσιαστικά την δράση των γονιδίων αποτύπωσης που είναι θεμελιώδη για τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η επιλεκτική μεθυλίωση και απομεθυλίωση ρυθμιστικών της ανάπτυξης γονιδίων αποτύπωσης επιτρέπει την μονογονεϊκή τους έκφραση.[100]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ INSULIN GROWTH FACTOR II (IGF2) ΚΑΙ H19 ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Τα γειτονικά εδραζόμενα γονίδια *IGF2* και *H19* έχουν παρόμοια προφίλ έκφρασης αλλά αντίθετη αποτύπωση. Το *H19* εκφράζεται αποκλειστικά από το μητρικό χρωμόσωμα, ενώ το *IGF2* από το πατρικό. Τα δύο αυτά γονίδια είναι από τα πρώτα που μελετήθηκαν όσον αφορά τον μηχανισμό λειτουργίας τους και την επίδραση τους στην ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου.[148, 149]

4.1 Το γονίδιο *Insulin Growth Factor 2 (IGF2)*

Ο άξονας των *Insulin Growth Factors* αποτελεί πολύ σημαντικό ρυθμιστή της ανάπτυξης κατά την εμβρυϊκή ζωή αλλά και μετά τη γέννηση.[150] Στη νεογνική και την παιδική ηλικία, η αυξητική ορμόνη GH ρυθμίζει την ανάπτυξη μέσω της συστηματικής και τοπικής παραγωγής IGF1.[151] Τα *IGF1* και *IGF2* εκφράζονται καθόλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, από τη γονιμοποίηση μέχρι τη γέννηση. Το γονίδιο *IGF2* εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό στους εμβρυϊκούς ιστούς.[103] Ο *IGF2* είναι ένας παράγοντας ομόλογος της ινσουλίνης που ευνοεί την ανάπτυξη κυρίως μέσω της σύνδεσης του με τον the insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*), ενός υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης, που ενεργοποιεί τον insulin receptor substrate 1 (*IRS1*) και τα μονοπάτια του AKT και της MAP κινάσης με αποτέλεσμα την πυροδότηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της γενικότερης αύξησης.[152] Η δράση του *IGF2* αναστέλλεται από τον insulin-like growth factor 1

receptor (IGF1R), που λειτουργεί σαν δικλείδα ασφαλείας στην περίσσεια IGF2.[65, 153]

Παρόλα αυτά δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το *IGF2* ευνοεί την πρώιμη εμβρυϊκή και πλακουντιακή ανάπτυξη. Σε πειραματόζωα στα οποία απουσιάζει η έκφραση των υποδοχέων ινσουλίνης και του IGF1 που ως γνωστόν μεσολαβούν για την επίδραση του IGF2 στη αύξηση του εμβρύου, τα συγκεκριμένα πειραματόζωα, δεν εμφανίζουν διαταραχές στην ανάπτυξη του πλακούντα. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως υπάρχουν, άγνωστοι προς το παρόν υποδοχείς για τον IGF2 στον πλακούντα που είναι υπεύθυνοι για τη δράση του IGF2. Το *IGF2* θεωρείται σημαντικό για τη μετανάστευση και τη διεύθυνση της τροφοβλάστης και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα αρχικά στάδια της αύξησης του πλακούντα, σε πολλά άλλα είδη εκτός του ανθρώπου. Σε ποντίκια με πλήρη έλλειψη του *Igf2* έχει παρατηρηθεί 40% μείωση του μέσου όρου κυττάρων του λαβυρίνθου και της συνδετικής ζώνης του πλακούντα. Επομένως το γονίδιο *IGF2* φαίνεται πως επιδρά στον αριθμό, το μέγεθος και των τύπο των κυττάρων του πλακούντα. [64, 153]

4.2 Το γονίδιο *H19*

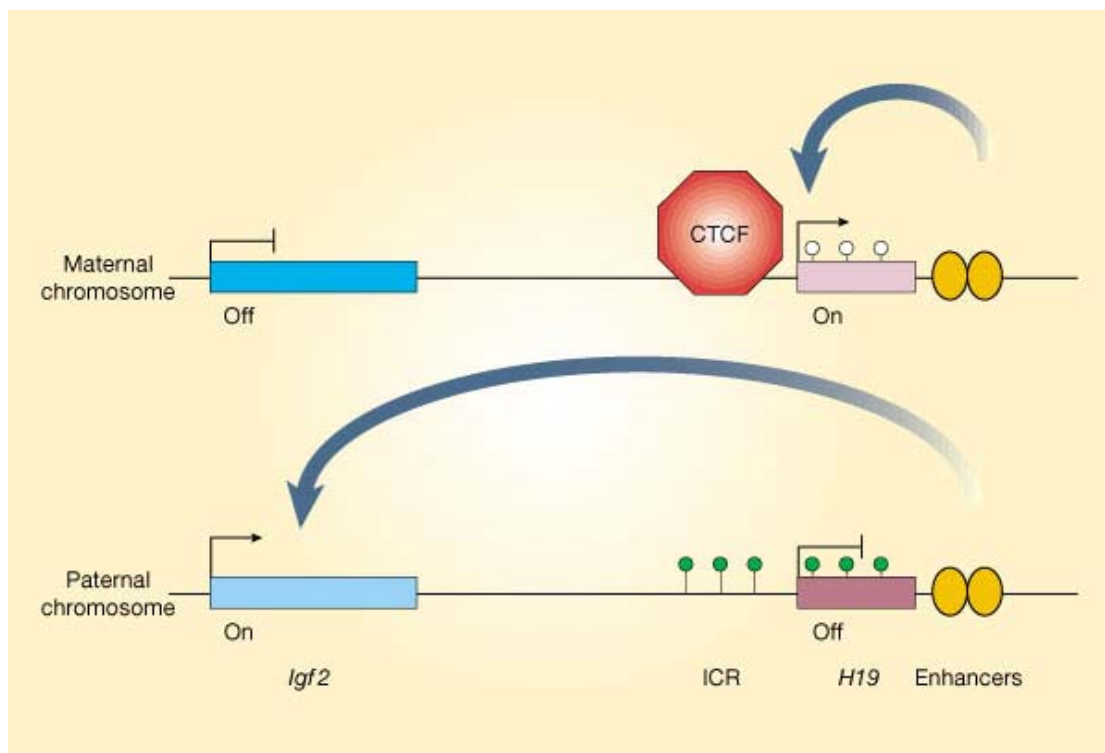
Το γονίδιο *H19* ανήκει σε μία κατηγορία γονιδίων που κωδικοποιούν mRNA που δεν μεταφράζεται.[154] Αν και είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στους εμβρυϊκούς ιστούς, ο βιολογικός του ρόλος δεν είναι ξεκάθαρος.[155, 156] Έχει φανεί μετά από πειράματα σε ποντίκια πως η κυριότερη δράση του *H19* γίνεται μέσω της δράσης του σε γειτονικά γονίδια όπως το *IGF2* και *INS2*. Πειραματικά μοντέλα σε ποντίκια που δεν εκφράζουν το γονίδιο *H19* έδειξαν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο, που πιθανότατα όμως σχετίζεται με διαταραχή στην αποτύπωση του *IGF2* που μοιράζεται κοινούς μεταγραφικούς μηχανισμούς με το *H19*.[157]

Αντίθετα η υπερβολική έκφραση του *H19* δε σχετίζεται με κάποιο συγκεκριμένο φαινότυπο.[158] Παρόλα αυτά δεν είναι σχεδόν αδύνατο ένα γονίδιο που εκφράζεται σε τέτοιο βαθμό κατά την εμβρυϊκή ζωή, να μην έχει ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη.[159] Ο Naimeh και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση της νηστείας στην έκφραση του *IGF2* και του *H19* στο ήπαρ του εμβρύου σε πρόβατα. Το mRNA του *H19* ελαττώθηκε κατά 61% σε σύγκριση με την έκφραση στο ήπαρ της ομάδας ελέγχου, ενώ τα επίπεδα του mRNA του *IGF2*, δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά.[160]

4.3 Μεταγραφή, αποτύπωση και μεθυλίωση των *IGF2/H19*

Η μονοαλληλική έκφραση των *IGF2/H19* πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο τουλάχιστον μηχανισμών: την παύση των εκκινήτων του *H19* στο πατρικό αλληλόμορφο και την παρεμπόδιση της μεταγραφής στους εκκινήτες στο μητρικό αλληλόμορφο.[161] Και οι δύο μηχανισμοί αυτής της σχετιζόμενης με τη γονεϊκή προέλευση έκφρασης, εξαρτώνται από μία περιοχή που βρίσκεται πιο πάνω από τους εκκινήτες του *H19* (Imprinting Control Region ICR).[162, 163] Αυτή η περιοχή με διαφορετική μεθυλίωση σε κάθε αλληλόμορφο, είναι υπερμεθυλιωμένη σε όλα τα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης στο πατρικό αλληλόμορφο και έχει ιδιότητες αναστολής της μεταγραφής.[164] Στο υπομεθυλιωμένο μητρικό χρωμόσωμα, η περιοχή ICR δρα ως αναστολέας της μεταγραφής εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση των εκκινήτων του *IGF2* με μόρια που διεγείρουν τη μεταγραφή και βρίσκονται σε μακρινή απόσταση.[165, 166] Στο πατρικό χρωμόσωμα, η υπερμεθυλίωση εμποδίζει τη λειτουργία του ICR και επομένως μπλοκάρει την ανασταλτική στη μεταγραφή του δράση και συνεπώς το *IGF2* μεταγράφεται. Βρέθηκε πρόσφατα πως ο παράγοντας CTCF που είναι μία πρωτεΐνη που μπλοκάρει τους διεγέρτες της μεταγραφής, συνδέεται αποκλειστικά με μη μεθυλιωμένες CpG ακολουθίες στην ICR

περιοχή, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται έτσι η μονοαλληλική έκφραση των δύο γονιδίων αποτύπωσης (Σχήμα 8).[167, 168]



Σχήμα 8: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αποτύπωσης των γονιδίων *IGF2/H19*

Το θεωρητικό μοντέλο που περιγράφει τους κοινούς μεταγραφικούς μηχανισμούς των *IGF2/H19* περιγράφει πως η μονοαλληλική έκφραση είναι εφικτή με διεγέρτες της μεταγραφής των δύο γονιδίων που εδράζονται πιο κάτω από την περιοχή ICR και που είναι κοινοί και για τα δύο γονίδια.[169] Εκτός από τον παραπάνω ρόλο της περιοχής ICR που περιγράφηκε και αφορά την έκφραση του *IGF2*, στο πατρικό αλληλόμορφο η ICR εμποδίζει την μεταγραφή του *H19* με την εξάπλωση της μεθυλίωσης και προς τους εκκινητές του *H19*. Όταν συμβεί αυτό, τότε ο εκκινητής του *H19* απενεργοποιείται ανεξάρτητα από το ICR.[170] Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο, κατά πόσο η υπερμεθυλίωση στην περιοχή ICR στο πατρικό αλληλόμορφο είναι ικανή από μόνη της για να παρεμποδίσει την έκφραση

του *H19* ή χρειάζεται μία σχετική εξάπλωση της υπερμεθυλίωσης προς τις γειτονικές αλληλουχίες των εκκινητών του γονιδίου.

4.4 Επίδραση του περιβάλλοντος στην έκφραση των *IGF2/H19*

Η σημασία της μεθυλίωσης της κυτοσίνης του DNA στην αποτύπωση, έχει σαν συνέπεια την ευαισθησία των γονιδίων αποτύπωσης σε περιβαλλοντικές επιδράσεις και ειδικά στη διαθεσιμότητα μεθυλοομάδων και διατροφικών συμπληρωματικών παραγόντων όπως η βιταμίνη B12 και το φυλικό οξύ).[171] Αμινοξέα όπως η μεθειονίνη, η θρεονίνη και η γλυκίνη, έχουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των μεθυλοομάδων, και η μεταβολή της διαθεσιμότητας τους μέσω της διατροφής κατά τη διάρκεια της κύησης, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του προφίλ της μεθυλίωσης στο ήπαρ του εμβρύου ποντικών αλλά και μετά τη γέννηση τους.[172] Ομοίως η ανάπτυξη εμβρύων ποντικών σε υλικό που στερείται παρόμοιων παραγόντων, έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της μεθυλίωσης στην περιοχή πιο πάνω από τους εκκινητές του *H19* και απώλεια της αποτύπωσης για το *H19*.[173] Όταν οι συγκεκριμένες βλαστοκύστες μεταφέρθηκαν σε λήπτριες, τα έμβρυα που προέκυψαν ήταν μικρότερα σε μέγεθος τη 14 ημέρα και είχαν μειωμένη έκφραση για το *Igf2* και το *H19*, εξαιτίας της αυξημένης μεθυλίωσης στην περιοχή ICR. Παρόλα αυτά λίγα είναι γνωστά για την επίδραση διατροφικών και γενικότερα περιβαλλοντικών παραγόντων στη μεθυλίωση του πλακούντα και την έκφραση του *IGF2*. Μία δημοφιλής υπόθεση που επικρατεί είναι πως η κακή θρέψη κατά τα αρχικά στάδια της κύησης, έχει σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή του μοντέλου μεθυλίωσης με επιπτώσεις στην αποτύπωση γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και συνεπώς της ομαλής εμβρυοπλακουντιακής αύξησης.

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ορμόνες που είναι επιρρεπείς σε διατροφικές αλλαγές και θα μπορούσαν να προκαλέσουν επιγενετικές αλλαγές.[174] Τα στεροειδή αναστέλλουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη και αλλάζουν την παροχή θρεπτικών συστατικών από τον πλακούντα. Καταστέλλουν την έκφραση του *Igf2* σε αρκετούς εμβρυϊκούς ιστούς όπως το ήπαρ οι σκελετικοί μύες καθώς και ο πλακούντας. Φαίνεται λοιπόν πως τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να επιδράσουν την έκφραση του *Igf2* και έτσι να ρυθμίσουν τη διαθεσιμότητα του insulin growth factor II κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.[175] Παρόλα αυτά ο βαθμός στον οποίο το ορμονικό προφίλ της μητέρας μπορεί να επηρεάσει τη μεθυσίωση αλλά και την αποτύπωση συγκεκριμένων γονιδίων που εκφράζονται στο έμβρυο και τον πλακούντα, παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστος.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή

Αν και τα γονίδια IGF2/H19 έχουν συνδεθεί με διάφορα σύνδρομα διαταραχών της ανάπτυξης, εντούτοις ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία της ΕΥΑ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.[176] Τα γονίδια αποτύπωσης που έχει φανεί πως εμπλέκονται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, έχουν ως επί το πλείστον μελετηθεί σε ζωικά μοντέλα.[177] Η παθογενετική συσχέτιση των παραπάνω γονιδίων με συγγενή νοσήματα που αφορούν την ανάπτυξη, αποτέλεσε το κίνητρο αυτής της μελέτης με σκοπό την ανίχνευση μία πιθανής συσχέτισης της ανώμαλης έκφρασης, αποτύπωσης και μεθυλίωσης σε πλακούντες κυήσεων που εμφάνισαν ΕΥΑ. Εφόσον είναι γνωστό πως η έκφραση των *IGF2/H19* ξεκινά από διάφορους εκκινητές και ελέγχεται από πολύπλοκους και ευαίσθητους μηχανισμούς, η επιγενετική βλάβη που θεωρητικά θα μπορούσε να διαταράξει και το πρότυπο αποτύπωσης αλλά και την έκφραση, αποτελεί μία ελκυστική θεωρία που μπορεί να αναδείξει τον συνδετικό κρίκο της δράσης περιβαλλοντικών παραγόντων στην ανάπτυξη του εμβρύου, αφού είναι αποδεκτό πως περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να επιδράσουν στο επιγενετικό προφίλ ενός γονιδίου (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της υπόθεσης της παρούσας μελέτης

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος των γονιδίων αποτύπωσης IGF2 και H19 στην παθογένεση της ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα η υπόθεση η οποία ελέγχθηκε είναι κατά πόσο τα συγκεκριμένα γονίδια τα οποία έχουν θεμελιώδη ρόλο στην πρώιμη εμβρυϊκή

ανάπτυξη, εμφανίζουν ανώμαλη έκφραση σε πλακουντιακούς ιστούς κυήσεων με EYA σε σύγκριση με την έκφραση σε πλακούντες από φυσιολογικές κυήσεις. Διερευνήσαμε ταυτόχρονα αν παρατηρούνται διαταραχές στον μηχανισμό αποτύπωσης που μπορεί να συσχετιστούν με ανώμαλη έκφραση. Τέλος μελετήσαμε το επιγενετικό προφίλ αυτών των γονιδίων στους ίδιους ιστούς και πιο συγκεκριμένα συγκρίναμε τα επίπεδα μεθυλίωσης συγκεκριμένων περιοχών των γονιδίων που αποτελούν ρυθμιστικές περιοχές της αποτύπωσης, στις δύο υπό μελέτη ομάδες. Η βασική υπόθεση που προσπαθήσαμε να επαληθεύσουμε, είναι κατά πόσο διαταραχές στο μηχανισμό μεθυλίωσης μπορεί να έχουν άμεση επίδραση στο μοντέλο αποτύπωσης των IGF2/H19 και κατά συνέπεια στην έκφραση τους, και κατά πόσο αυτή η αλυσιδωτή μοριακή βλάβη μπορεί να επηρεάσει την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Αρχικά, στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθούν ιστοί που προέρχονται από προϊόντα αυτόματων εκτρώσεων καθώς και τεμάχια πλακούντων. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσαμε να βγάλουμε συμπεράσματα για διαταραχές στους μοριακούς μηχανισμούς που επέδρασαν στα αρχικά στάδια της κύησης, οπότε και προκάλεσαν τον τερματισμό της, ή επέδρασαν όταν η εγκυμοσύνη είχε προχωρήσει, οπότε είχαν επίπτωση στην ανάπτυξη του εμβρύου. Παρόλα αυτά το πειραματικό μέρος περιορίστηκε στη μελέτη των πλακουντιακών ιστών. Συλλέχθηκαν προϊόντα αποβολών από 28 κυήσεις. Ο σχεδιασμός υπαγόρευε πως σε αυτά τα περιστατικά θα έπρεπε να αποκλειστούν άλλα αίτια αποβολών και να προχωρήσουν στο πειραματικό μέρος μόνο όσα ήταν ανεξήγητες αποβολές.

Συνεπώς θα έπρεπε όλα τα δείγματα να εξεταστούν καριοτυπικά και επιπλέον οι γυναίκες να υποβληθούν σε εξετάσεις αίματος (ανοσολογικό έλεγχο, έλεγχο θρομβοφιλίας, διαβήτη). Το κόστος των εξετάσεων αυτών ήταν εξαιρετικά μεγάλο με αποτέλεσμα το πειραματικό μέρος να περιλάβει μόνο τους ιστοτεμάχια πλακούντων από κύσεις με EYA και φυσιολογικές κύσεις.

Εξετάστηκαν αναδρομικά ιστοτεμάχια πλακούντα από 31 γυναίκες με μονήρεις κύσεις που εμφάνισαν EYA (ομάδα μελέτης) και 17 γυναίκες με μονήρεις κύσεις χαμηλού κινδύνου που δεν εμφάνισαν κάποια επιπλοκή κατά τη διάρκεια της κύησης ή του τοκετού, και γέννησαν τελειόμηνα νεογνά με βάρος γέννησης ικανοποιητικό για την ηλικία κύησης (AGA) (ομάδα ελέγχου).

Επιλογή περιστατικών και συλλογή ιστών

Η επιλογή των περιστατικών είχε γίνει κατά τη διάρκεια της κύησης από το Τμήμα Εβρουομητρικής Ιατρικής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Η διάγνωση της EYA είχε γίνει μετά από διαδοχικούς υπερηχογραφικούς ελέγχους όπου είχε φανεί πως το βάρος του εμβρύου ήταν μικρότερο από τη 10^η ΕΘ για την ηλικία κύησης και εμφάνιζε και άλλους υπερηχογραφικούς δείκτες EYA (ελαττωμένο αμνιακό υγρό, παθολογικά Dopplers στην ομφαλική, στις μητριάεις ή σε αγγεία του εμβρύου). Προγραμματισμένα υπερηχογραφήματα πραγματοποιήθηκαν σε όλες τις κύσεις με σκοπό την εκτίμηση της κατάστασης του εμβρύου, τον αποκλεισμό ανατομικών ανωμαλιών ή υπερηχογραφικών δεικτών ενδεικτικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών και τέλος με σκοπό την χρονική τοποθέτηση της διεκπεραίωσης του τοκετού.

Η ηλικία κύησης είχε υπολογιστεί με γνώμονα την τελευταία έμμηνο ρύση και είχε επιβεβαιωθεί υπερηχογραφικά κατά την 11^η-14^η εβδομάδα της κύησης. Από τη

μελέτη αποκλείστηκαν δίδυμες κυήσεις, περιστατικά χοριοαμνιονίτιδας, και κυήσεις με έμβρυα που εμφάνιζαν χρωμοσωμικές ή ανατομικές ανωμαλίες.

Όλες οι γυναίκες είχαν ενημερωθεί για τη διενέργεια της μελέτης και είχαν δώσει προφορική συγκατάθεση για την επεξεργασία του πλακούντα για ερευνητικούς σκοπούς. Η συλλογή των ιστών γινόταν κατά τη διάρκεια του κολπικού τοκετού ή της καισαρικής τομής. Στην ομάδα μελέτης υπήρχαν περιστατικά πρόωρων τοκετών, ενώ όλοι ιστοί της ομάδας ελέγχου προέρχονταν από τελειόμηνες κυήσεις. Μετά την έξοδο του πλακούντα, γινόταν η συλλογή 6 ιστοτεμαχίων από διαφορετικά σημεία του πλακούντα, με σκοπό την εξάλειψη τυχόν ετερογένειας των ιστών, από τη μητρική επιφάνεια και με βάθος περίπου 1 εκατοστό.[178] Προέκυπταν έτσι 6 ιστοτεμάχια πλακουντιακού ιστού διαστάσεων 1x1 εκατοστό. Δεν γινόταν διατομή, από περιοχές του πλακούντα με εμφανή έμφρακτα ή αποτιτανώσεις. Στη συνέχεια προχωρούσαμε στην επεξεργασία 3 ιστοτεμαχίων από κάθε πλακούντα τα οποία ξεπλένονταν προσεκτικά με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, με σκοπό την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας πρόσμειξης με μητρικό αίμα. Στη συνέχεια οι ιστοί διατέμνονταν και φυλάσσονταν στους -80°C μέχρι την τελική επεξεργασία τους. Στοιχεία που αφορούσαν την πορεία της κύησης και του τοκετού (τόκος, βάρος γέννησης, είδος τοκετού, επιπλοκές της κύησης) καθώς και χαρακτηριστικά της μητέρας (βάρος και ύψος της μητέρας, κάπνισμα, συνοδά νοσήματα), συλλέχθηκαν και συσχετίστηκαν με τα πειραματικά ευρήματα.

Εκχύλιση DNA και RNA

Το DNA εκχυλίστηκε από τους πλακούντες και των δύο ομάδων με 0,1 mg/ml πρωτεΐνάσης K (Promega, Madison, WI) και στη συνέχεια με το πρωτόκολλο φαινόλης/χλωροφορμίου.[179] Τα ιστικά τεμάχια ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια

ομογενοποιητή με το αντιδραστήριο TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) και στη συνέχεια με την προσθήκη χλωροφορμίου και φυγοκέντρησης. Το ολικό RNA διαχωρίστηκε από το υπερκείμενο με ισοπροπανόλη, ξεπλύθηκε με αιθανόλη 75% και διαλυτοποιήθηκε εκ νέου σε 50 µl DEPC-treated water. Η συγκέντρωση του RNA υπολογίστηκε αφού μετρήθηκε η απορρόφηση του υπεριώδους φωτός (UltraViolet UV) 260-nm και ο λόγος απορρόφησης 260/280-nm που μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο (Hitachi Instruments Inc., USA). Ο λόγος απορρόφησης 260/280-nm ήταν ~1,8-2.0 για όλα τα δείγματα. Πέντε µl RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε τζελ αγαρόζης 2% με σκοπό να επαληθευτεί η ακεραιότητα του RNA.

Αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο real-time PCR

Η αντίστροφη μεταγραφή για τη δημιουργία της πρώτης αλυσίδας cDNA, έγινε με το σύστημα αντίστροφης μεταγραφής της (Promega, Madison, WI) και στη συνέχεια με επεξεργασία με DNAάση με σκοπό την αποφυγή πρόσμιξης με genomic DNA. Οι αντιδράσεις της Real-time PCR πραγματοποιήθηκαν με το Mx3000P θερμικό κυκλοποιητή (Stratagene, La Jolla, CA) με τη χρησιμοποίηση του μείγματος SYBR® Green I Master Mix (Stratagene, Greece). Η glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) χρησιμοποιήθηκε για την εξομάλυνση των επιπέδων mRNA των IGF2 και H19. Τα δεδομένα που προέκυψαν, και συγκεκριμένα η συγκέντρωση των mRNAs των IGF2 και H19, συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με το λογισμικό Mx3000P real-time PCR software version 2.00, Build 215 Schema 60 (Stratagene, Greece). Χρησιμοποιήθηκαν 3 ζεύγη εκκινητών για το IGF2 και ένα για το H19 (Πίνακας 1). Ένα μικρόλιτρο cDNA από τους πλακουντιακούς ιστούς που προέρχονταν και από τις δύο ομάδες ενισχύθηκε μέσω της PCR με 2X Brilliant SYBR® Green QPCR Master Mix (που περιείχε 2,5 mM MgCl₂), 300 nM από κάθε

εκκινητή και 30 μ M παθητικής βαφής αναφοράς Rox, με τελικό όγκο 20 μ l. Μετά από την αρχική αποσταθεροποίηση στους 95°C για 10 λεπτά, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε 40 ενισχυτικούς κύκλους οι οποίοι συνίστανται από αποσταθεροποίηση στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα, αναδιάταξη στους 65°C – 67°C για 30 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C για επίσης 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ακολουθούσε η καμπύλη ανάλυσης της τήξης, όπου η θερμοκρασία αυξανόταν από τους 55 - 95°C με ρυθμό γραμμικής αύξησης 0.2°C/δευτ. Οι ιδανικές θερμοκρασίες annealing, φαίνονται στον πίνακα 1.

PCR Primer			
Primer	Sequence (5' to 3')	Optimal annealing temperature	
IGF2-758	CTT GGA CTT T(G/T)A GTC AAA TTG GC	65°C	
IGF2-857	GCG GTA CGA GCG ACG TGC CCA C		
IGF2-1093	CTC ATA CTT TAT GCA TCC CCG CAG CTA C	65 °C	
IGF2-1226	CTG TGT GCT GTG TGT GCT GTC CGT T		
IGF2-1406	CAC AAA CGC ACA GCA CAC GCA CAC ACA TGC	67 °C	
IGF2-1470	TTT GTG TGT GTG CTG TGT GCT AG		
H19-10248	CTT TAC AAC CAC TGC ACT ACC TGA C	67 °C	
H19-10423	GAT GGT GTC TTT GAT GTT GGG CTG A		
MethyLight Primers			
HUGO Gene Nomenclature	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence	Probe Oligo Sequence
IGF2 (AC006408) 65759-64972	5'- TCGTAGTTTTGGAT AGTGGATAAAGAG-3'	5'- CCAAAACACCCCCTAC TTTAATAATAAC-3'	6FAM- TTTTTTCGAAATTGTT TGGACGATGATTTGT C-BHQ-1
H19 (AF087017) upstream region 5962-6413	5'- CGGAATTGGTTGTAG TTGTGGAAT-3'	5'- ACCCAATTAAAACGA ACTCGAA-3'	6FAM- CGCGGCGGTAGTGT AGGTTTATATA-BHQ- 1
H19 (AF087017) promoter region 7574-7959	5'- AGATAGGAAAGTGGT TGCGAATG-3'	5'- TAAGTTCGGTTAATTG GATGGGAA-3'	6FAM- TTGCGGAAATCGCGG TGACGAG-BHQ-1

Πίνακας 1: Οι εκκινητές για την real time PCR και την MethyLight analysis που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

Αρνητικά δείγματα ελέγχου είχαν συμπεριληφθεί σε κάθε αντίδραση, ένα χωρίς cDNA και ένα χωρίς να έχει υποβληθεί σε αντίστροφη μεταγραφή. Η ομαλοποίηση των επιπέδων μεταγραφής υπολογίστηκε για κάθε παθολογικό και φυσιολογικό δείγμα με βάση τον τύπο: παθολογικό ή φυσιολογικό δείγμα = $(1+E_{GOI})^{-\Delta Ct} / (1+E_{GAPDH})^{-\Delta Ct}$.

Ανίχνευση των πολυμορφισμών των IGF2/H19

Οι πλακούντες και από τις δύο ομάδες μελετήθηκαν για την ύπαρξη 3 διαφορετικών πολυμορφισμών για το IGF2 και ένα για το H19, με PCR σε genomic DNA όπως έχει ήδη περιγραφεί.[180] Οι PCR εκτελέστηκαν σε συνολικό όγκο 25 μl που περιείχαν 5 μM of 5x Green GoTaq® Reaction Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTPs), 0,6 μονάδες από την GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega, Madison) και 200 ng genomic DNA ή RNA. Οι συνθήκες της PCR ήταν 95 °C για 90 δευτ, ακολούθως 29 κύκλοι των 95 °C για 25 δευτ, στην ιδανική θερμοκρασία αναδιάταξης για 1 λεπτό και τέλος στους 72 °C για 10 λεπτά. Οι ιδανικές θερμοκρασίες αναδιάταξης για κάθε ζευγάρι εκκινήτων ήταν IGF2-758/857, 65 °C; IGF2-1093/1226, 65 °C; IGF2-1406/1470, 65 °C; H19-10248/10423, 67 °C. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR, μελετήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης 3% ή σε τζελ πολυακρυλαμιδίου-ουρίας και φωτογραφήθηκαν σε διαφανοσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας. Η ανάλυση δύο από τους πολυμορφισμούς απαιτούσε την πέψη με περιοριστικά ένζυμα (Ara I, Alu I). Τέσσερα –πέντε μg των προϊόντων της PCR αναμείχθηκαν με 20-30 μονάδες του κατάλληλου ενζύμου (Promega, Madison) σε τελικό όγκο 20 μl, και η πέψη πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 6 ώρες. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε τζελ αγαρόζης 3% και φωτογραφήθηκαν σε διαφανοσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας.

Ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA

Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε μετατροπή με όξινο θειικό νάτριο (Zymo Research, Berlin, Germany) και στη συνέχεια σε ανάλυση με MethyLight (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom; Metabion, Munich Germany) όπως έχει ήδη περιγραφεί.[181] Κάθε αντίδραση MethyLight που αφορούσε μία συγκεκριμένη περιοχή των γονιδίων κάλυπτε περίπου 5–7 δινουκλεοτίδια CpG. Αναλυτικά οι εκκινητές και τα probes για όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν, φαίνονται στον πίνακα 1. Σχεδιάστηκαν δύο σετ εκκινητών και probes ειδικά για το DNA που έχει υποστεί μετατροπή με το διθειικό νάτριο: ένα σετ για την περιοχή του γονιδίου που θέλαμε να αναλύσουμε και ένα σετ αναφοράς (COL2A1) για την ομαλοποίηση του DNA. Η ειδικότητα των αντιδράσεων εκτιμήθηκε ξεχωριστά με τη βοήθεια DNA από λευκά αιμοσφαίρια ανθρώπου που είχαν υποστεί επεξεργασία με Sssl (New England Biolabs; www.newenglandbiolabs.co.uk) (υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης). Το ποσοστό των πλήρως μεθυλιωμένων μορίων σε μία συγκεκριμένη περιοχή υπολογίστηκε διαιρώντας το λόγο Γονίδιο/ COL2A1 κάθε δείγματος με το λόγο Γονίδιο/ COL2A1 του επεξεργασμένου DNA των ανθρώπινων λευκών αιμοσφαιρίων πολλαπλασιασμένος επί 100. Η συντόμευση PMR (Percentage of Methylated Reference, Ποσοστό της μεθυλίωσης αναφοράς) είναι αυτή ακριβώς η μέτρηση που προαναφέρθηκε. Η ανάλυση έγινε τυφλά και για τα δείγματα από την ομάδα μελέτης και ελέγχου, είχαν κατανεμηθεί τυχαία κατά την επεξεργασία. Η συγκέντρωση του τροποποιημένου DNA, ήταν ίδια μεταξύ των παθολογικών και φυσιολογικών δειγμάτων.

Στατιστική ανάλυση

Οι μέσες τιμές και οι σταθερές αποκλίσεις (SD) υπολογίστηκαν για όλες τις αριθμητικές παραμέτρους. Τα δεδομένα παρουσιάστηκαν με τη μορφή ποσοστού για τις περιπτώσεις των μη αριθμητικών παραμέτρων. Η κατανομή των αριθμητικών παραμέτρων στις δύο ομάδες περιστατικών, συγκρίθηκε με το με παραμετρικό Wilcoxon τεστ. Η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης, μελετήθηκε για τις ποιοτικές παραμέτρους με το χ^2 τεστ. Η σταθερά του Spearman υπολογίστηκε για να αξιολογηθεί η ύπαρξη μονοτονικής σχέσης μεταξύ των αριθμητικών παραμέτρων. Η συσχέτιση μεταξύ του mRNA και των τιμών του PMR και των χαρακτηριστικών της εγκύου και του εμβρύου, διερευνήθηκε με τη βοήθεια της ανάλυσης γραμμικών συστημάτων. Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε ένα αποτέλεσμα όταν η τιμή P ήταν μικρότερη από 0,05. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS 17 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL[fx1]).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χαρακτηριστικά περιστατικών

Αναλύσαμε 31 δείγματα από πλακούντες κύησης με EYA και 17 δείγματα από φυσιολογικές κύσεις. Το βάρος γέννησης ήταν μικρότερο από την 5^η ΕΘ για όλες τις περιπτώσεις EYA, ενώ 90% από αυτές εμφάνιζαν σοβαρή EYA, βάρος γέννησης μικρότερο από την 3^η ΕΘ. Το βάρος γέννησης για την ομάδα ελέγχου ήταν μεταξύ 10^{ης} και 90^{ης} ΕΘ. Οι ΕΘ του βάρους υπολογίστηκαν με κριτήριο χαρακτηριστικά της μητέρας και του εμβρύου με τη βάση δεδομένων (www.gestation.net). Έγινε σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων, των βασικών χαρακτηριστικών και της έκβασης της κύησης. Τα βασικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων, παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Οι κατανομές της ηλικίας της μητέρας, το βάρος της, ο δείκτης μάζας σώματος, το φύλο του νεογνού, ο τόκος και το κάπνισμα της μητέρας, ήταν ισορροπημένες μεταξύ των δύο ομάδων. Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκαν

στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικία κύησης μεταξύ των δύο ομάδων· η ηλικία κύησης της ομάδας με EYA ήταν σημαντικά μικρότερη της ομάδας ελέγχου

	EYA N=31	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ N=17	P value
Ηλικία κύησης (χρ)	29 ± 6 6.074449	27.8 ± 4.9	0.6657#
Βάρος (kgr)	62.9 ± 10.4	61.1 ± 10.3	0.3906#
BMI (kgr/m ²)	22.6 ± 3.5	23.5 ± 3.7	0.5092#
Κάπνισμα	21.4%	28.6%	0.608 ⁺
Τόκος Πρωτοτόκες	61.3%	52.9%	0.338 ⁺
Ηλικία κύησης κατά τη γέννηση (εβδ)	35.4 ± 4.5	39.3 ± 0.9	0.0001#
Βάρος Γέννησης kgr	1775.2 ± 710.9	3389.4 ± 473.4	0.0000#
Φύλο νεογνού Αγόρια	40%	35.3%	0.750 ⁺
ΕΘ βάρους γέννησης	0.8 ± 1.5	49.8 ± 9.6	0.0000#

*Στοιχεία παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ±SD ή ποσοστό

⁺χ² τεστ για ποιοτικά στοιχεία

Wilcoxon rank-sum test

Πίνακας 2: Βασικά χαρακτηριστικά των περιστατικών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Κλινική και γενετική παρακολούθηση των νεογνών

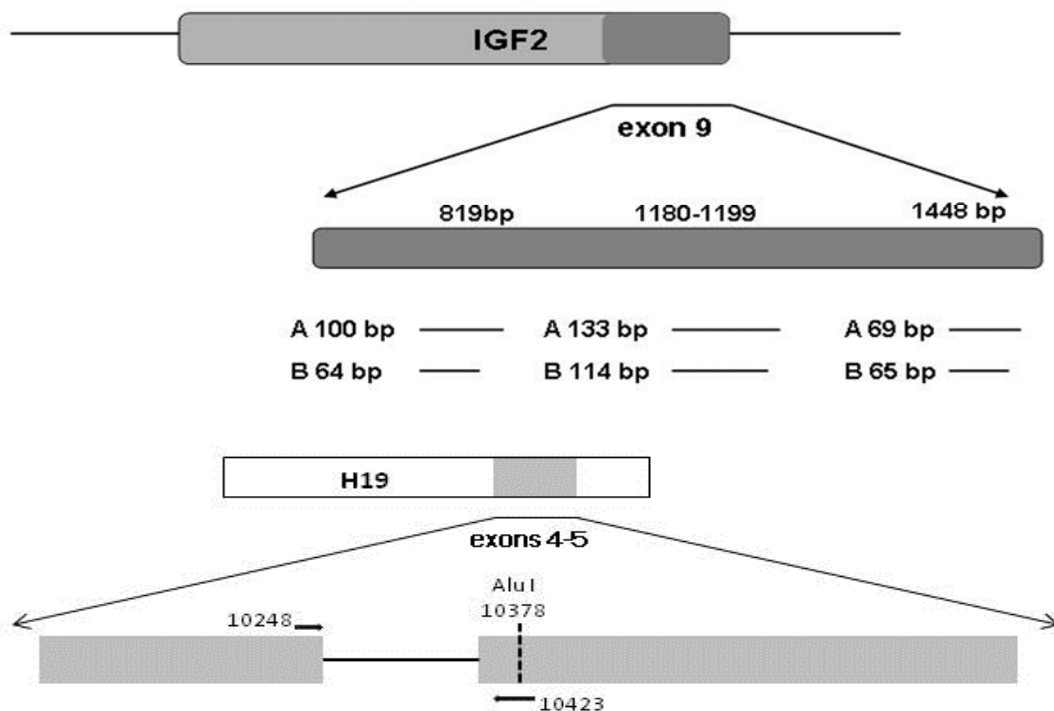
Με σκοπό να αποκλείσουμε την ύπαρξη του συνδρόμου Silver-Russell (SRS) ή την ύπαρξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών με καθυστερημένη εκδήλωση, όλα τα νεογνά εξετάστηκαν και παρακολούθηθηκαν από παιδίατρο και κλινικό γενετιστή 43-65 μήνες μετά τη γέννηση. Για τη διάγνωση του συνδρόμου χρησιμοποιήθηκαν τα διαγνωστικά κριτήρια των Price και συν τα οποία είναι τα εξής:[182]

- Βάρος γέννησης μικρότερο ή ίσο με 2 SD από τον μέσο όρο
- Μειωμένη ανάπτυξη κατά τη νεογνική περίοδο μικρότερη ή ίση με 2SD από τον μέσο όρο για τη δεδομένη ηλικία του παιδιού
- Συγκεκριμένο μέγεθος υπινιομετωπικής διαμέτρου
- Κλασικός φαινότυπος προσώπου και ασυμμετρία προσώπου

Κανένα από τα παιδιά που είχαν περιληφθεί στη μελέτη δεν ανταποκρινόταν στα διαγνωστικά κριτήρια του SRS ή είχαν άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ενδεικτικά χρωμοσωμικών ή γενετικών συνδρόμων, μέχρι την ηλικία των 3,6 – 5,2 χρόνων.

Ανίχνευση των υπό μελέτη πολυμορφισμών των IGF2 και H19 στους πλακουντιακούς ιστούς

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν 3 πολυμορφισμοί του εξωνίου 9 του *IGF2* και ένας του εξωνίου 5 του *H19*.



Σχήμα 2: Οι πολυμορφισμοί των δύο γονιδίων που μελετήθηκαν

Η ανίχνευση δύο από τους πολυμορφισμούς περιελάμβανε την πέψη της περιοχής του γονιδίου, με περιοριστικά ένζυμα, μια έλλειψη 19 bp και μία προσθήκη 4 bp στο εξώνιο 9 του IGF2 (Σχήμα 2).

Τα ετερόζυγα δείγματα για τους πολυμορφισμούς, βρέθηκαν μετά από PCR στο DNA των ιστών με τους συγκεκριμένους εκκινητές και στη συνέχεια πέψη. Η ανάλυση των αλληλόμορφων που εκφράστηκαν, έγινε μετά από RT-PCR του ολικού RNA.

Δείγματα πλακούντα	No περιστατικού	gDNA	cDNA
Απώλεια αποτύπωσης του IGF2			
EYA	10	A/B	A/B
EYA	13	A/B	A/B
EYA	16	A/B	A/B
EYA	22	A/B	A/B
EYA	25	A/B	A/B
EYA	37	A/B	A/B
EYA	43	A/B	A/B
EYA	48	A/B	A/B
EYA	98	A/B	A/B
Φυσιολογική αποτύπωση του IGF2			
EYA	7	A/B	A
EYA	50	A/B	B
Control	58	B	
EYA	62	B	
Control	66	A/B	A
Control	75	A/B	B
EYA	76	B	
Control	79	A/B	A
Control	87	A/B	B
Control	88	A	
EYA	96	A/B	B
EYA	97	A/B	A
EYA	99	A/B	A
Control	102	A/B	A
Control	118	A	
Control	128	A/B	A

Πίνακα 3: Αποτελέσματα της μελέτης της έκφρασης του *IGF2* στα δύο

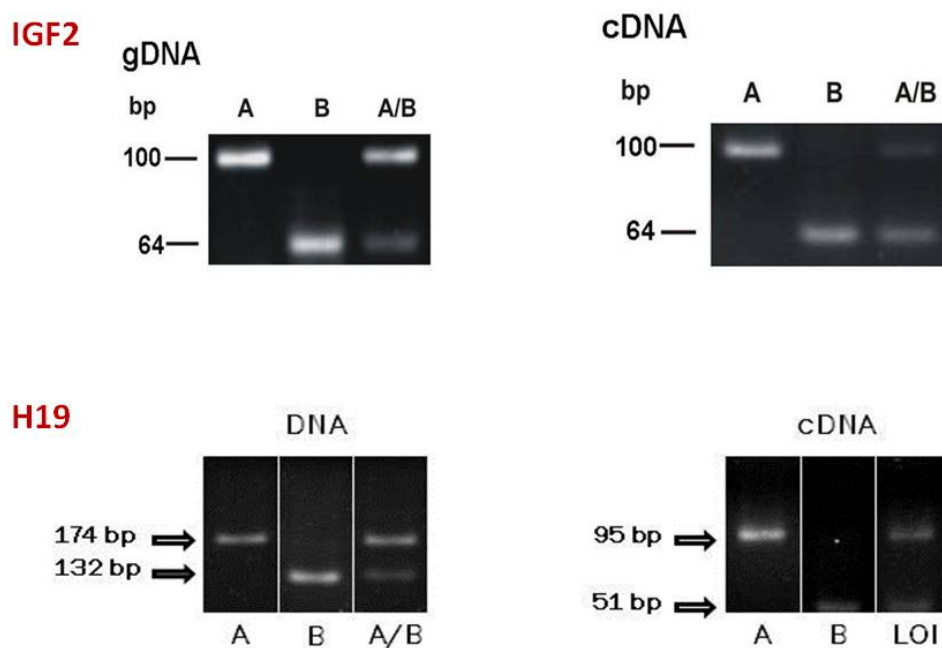
αλληλόμορφα

Συνολικά 16 δείγματα από την ομάδα μελέτης ήταν ετερόζυγα για το IGF2 και 14 για το H19, ενώ από τα 17 δείγματα της ομάδας ελέγχου, 9 ήταν ετερόζυγα για το IGF2 και 8 για το H19. Από τα συνολικά 25 ετερόζυγα δείγματα για το IGF2, απώλεια της αποτύπωσης LOI βρέθηκε σε 9 δείγματα, εκ των οποίων όλα προέρχονταν από την ομάδα με EYA (Εικόνα 1). Στα φυσιολογικά δείγματα δε διαπιστώθηκε LOI (Πίνακας 3). Υπήρχε δηλαδή στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης LOI μεταξύ των ομάδων με EYA και της ομάδας ελέγχου ($P=0.020$). Στα υπόλοιπα 16 ετερόζυγα δείγματα διαπιστώθηκε φυσιολογική αποτύπωση MOI σε 7 παθολογικά και 9 φυσιολογικά δείγματα.

Δείγματα πλακούντα	No περιστατικών		
	Απώλεια αποτύπωσης για το H19	gDNA	cDNA
EYA	72	A/B	A/B
Control	102	A/B	A/B
Control	82	A/B	A/B
Control	85	A/B	A/B
Control	122	A/B	A/B
	Διατήρηση αποτύπωσης για το H19		
EYA	7	A/B	A
Control	66	A/B	B
Control	87	A/B	A
EYA	96	A/B	A
EYA	97	A/B	A
Control	118	A/B	A
EYA	1	A/B	A
EYA	19	A/B	A
EYA	25	A/B	B
EYA	31	A/B	B
EYA	37	A/B	A
EYA	40	A/B	A
EYA	64	A/B	A
EYA	78	A/B	A
EYA	95	A/B	A
EYA	100	A/B	B
Control	113	A/B	B

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μελέτης έκφρασης του H19 στα δύο αλληλόμορφα

Από τα 22 ετερόζυγα δείγματα για το *H19*, LOI διαπιστώθηκε σε 5 δείγματα, 4 από τα οποία ήταν φυσιολογικά και 1 παθολογικό (Εικόνα 1). Φυσιολογική αποτύπωση για το *H19* βρέθηκε σε 13 παθολογικά και 4 φυσιολογικά δείγματα (Πίνακας 4).



Εικόνα 1: Αντιπροσωπευτικά δείγματα που εμφάνισαν απώλεια της αποτύπωσης (έκφραση και από τα δύο αλληλόμορφα) για έναν πολυμορφισμό του *IGF2* και έναν του *H19*.

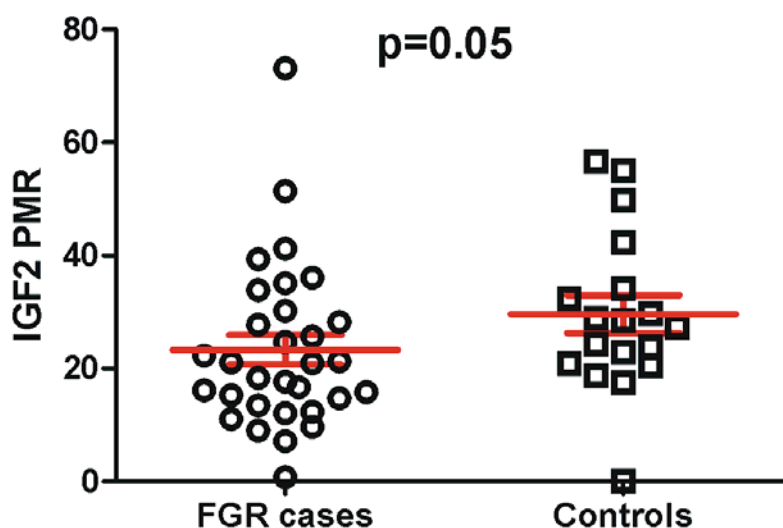
Μελέτη της έκφρασης των *IGF2* και *H19*

Μελετήσαμε την έκφραση των *IGF2* και *H19* στους φυσιολογικούς και παθολογικούς πλακούντες. Η έκφραση του *IGF2* ήταν μειωμένη στους πλακούντες με EYA σε σχέση με τους φυσιολογικούς ($P=0.01$)(Σχήμα 3).

και επιπλέον δεν διαπιστώθηκε διαφορά στον λόγο των mRNAs μεταξύ των δειγμάτων που είχαν διαταραχή στην αποτύπωση και όσων ήταν φυσιολογικά.

Ανάλυση του μοντέλου μεθυλίωσης στον πλακούντα

Το πρότυπο μεθυλίωσης σε περιοχές των γονιδίων που ελέγχουν την αποτύπωση, στους πλακούντες και των δύο ομάδων, μελετήθηκε με τη βοήθεια της μεθόδου MethyLight qPCR. Μελετήσαμε το Percentage of Methylated Reference (PMR) σε 3 διαφορετικά σημεία που αποτελούν DMR Differentially Methylated Regions DMRs. Η περιοχή των εξωνίων 2/3 του IGF2 από τη βάση 65545 μέχρι τη βάση 65682 μελετήθηκε με σκοπό την ανάλυση του ποσοστού μεθυλίωσης. Τα δείγματα με EYA παρουσίασαν μικρότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με τα δείγματα της ομάδας ελέγχου, με μέσες τιμές 23,3% και 29,6%. Η διαφορά αυτή ήταν οριακά στατιστικά σημαντική (Σχήμα 6) ($P=0.05$).



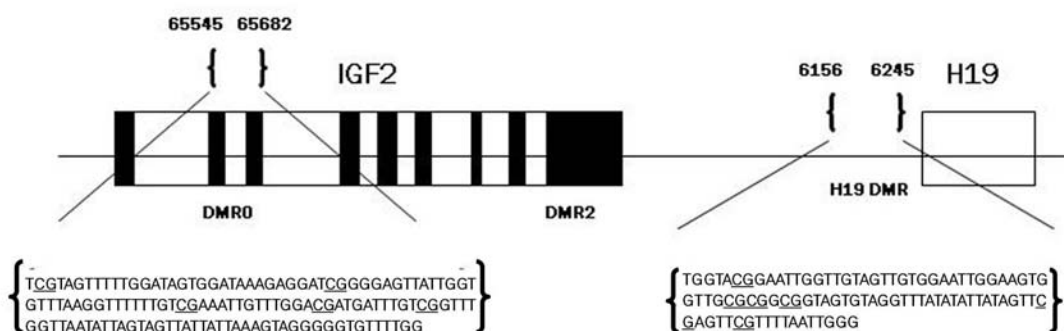
Σχήμα 6: Επίπεδα μεθυλίωσης (PMR) στην περιοχή των εκκινήτων του IGF2.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης στην περιοχή αυτή των εκκινήτων του IGF2 δεν σχετίστηκε με την έκφραση του γονιδίου. Επιπλέον οι τιμές IGF2 PMR δεν εμφάνισαν συσχέτιση με το βάρος γέννησης ($P=0.14$) ή τις ΕΘ του βάρους ($P=0.17$) ή τέλος με την ηλικία

κύησης ($P=0.2$). Επεκτείνουμε την ανάλυση στην υποκατηγορία δειγμάτων που εμφάνισαν διαταραχές στην αποτύπωση. Τα ποσοστά μεθυλίωσης στα δείγματα που είχαν LOI για το IGF2 ήταν 22,9%, ενώ αυτά που είχαν μονοαλληλική έκφραση το PMR ήταν 22.8%, επομένως δεν υπήρξε ουσιαστική διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών.

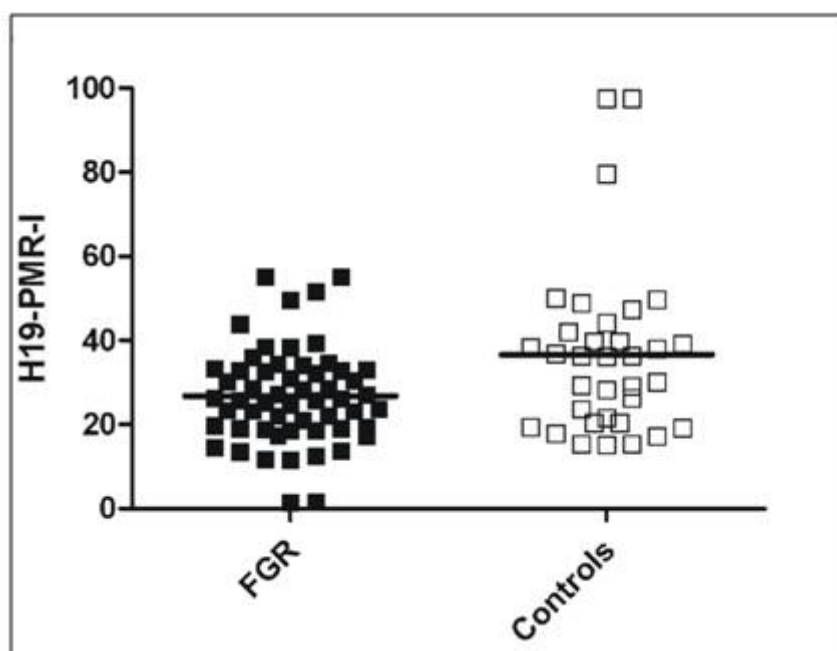
Χωρίσαμε τα δείγματα μας σε δύο ομάδες με κριτήριο όσα είχαν PMR μεγαλύτερο ή μικρότερο από 50% με σκοπό να υπολογίσουμε το odds ratio (OR) μεταξύ των παθολογικών και φυσιολογικών πλακούντων. Μικρότερος αριθμός δειγμάτων με EYA είχαν $PMR > 50$, ($OR=0.55$), χωρίς όμως σημαντική διαφορά ($P=0.57$)

Η περιοχή πιο πάνω από τους εκκινητές του *H19*, μελετήθηκε με δύο ζεύγη εκκινητών. Αναλύθηκε το μοντέλο μεθυλίωσης της περιοχής από την βάση 6156 μέχρι τη βάση 6245 που βρίσκεται πιο πάνω από την περιοχή εκκίνησης της έκφρασης του *H19* που περιέχει το έκτο και έβδομο σημεία σύνδεσης του παράγοντα CTCF που εμπλέκεται στην αντίστροφη έκφραση και των δύο γονιδίων (Εικόνα 2).[183]



Εικόνα 2: Δύο περιοχές στις οποίες μελετήσαμε τα ποσοστά μεθυλίωσης. Η περιοχή των εκκινητών του IGF2 και η περιοχή ελέγχου της αποτύπωσης ICR πριν από τους εκκινητές του H19.

Τα ποσοστά μεθυλίωσης των πλακούντων που είχαν ΕΥΑ ήταν μικρότερα από αυτά των φυσιολογικών πλακούντων (μέσες τιμές 27.4% και 36.2% αντίστοιχα (Σχήμα 7)($P=0.15$). Εφόσον η συγκεκριμένη περιοχή ελέγχει την έκφραση και των δύο γονιδίων, μελετήθηκε επίσης η συσχέτιση των μετρήσεων της μεθυλίωσης με τα επίπεδα του mRNA του IGF2 και H19. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ των τιμών του PMR στο H19 DMR με την έκφραση του IGF2 ή του H19. Ομοίως, δεν υπήρξε σχέση των μετρήσεων των PMR με τις ΕΘ βάρους γέννησης ($P=0.52$), με το βάρος γέννησης ($P=0.73$), ή με την ηλικία κύησης ($P=0.8$).

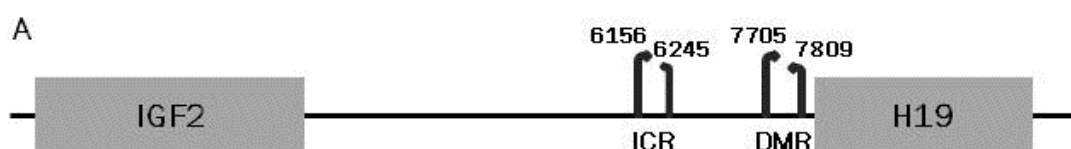


Σχήμα 7: Επίπεδα μεθυλίωσης της περιοχής μεταξύ των δύο γονιδίων που ελέγχει την αντίστροφη έκφραση τους. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Τα δείγματα που εμφάνισαν LOI για το IGF2 είχαν μεγαλύτερα PMR (31,3%) από αυτά που είχαν MOI (26,1%), χωρίς όμως σημαντική διαφορά ($P=0.84$). Συγκρίναμε επίσης τέσσερα δείγματα που εμφάνισαν απώλεια της αποτύπωσης για το H19 με τέσσερα δείγματα που διατήρησαν τη μεθυλίωση. Φάνηκε πως τα

δείγματα με φυσιολογική αποτύπωση είχαν υψηλά αλλά όχι σημαντικά υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης (71%) για την περιοχή πρόσδεσης του CTCF σε σχέση με τους ιστούς που είχαν απώλεια της αποτύπωσης (32%, $P=0,43$). Οι πλακούντες με EYA είχαν σε μικρότερο ποσοστό μετρήσεις PMR πάνω από 50% ($OR=0.55$), αν και η διαφορά στο ποσοστό αυτό δεν ήταν αξιόλογη ($P=0.57$).

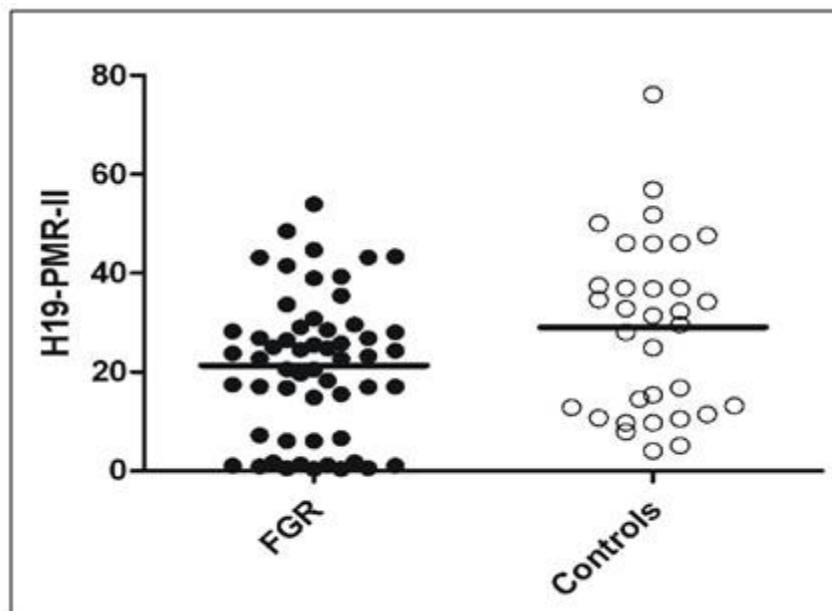
Τέλος, η περιοχή από τη βάση 7705 έως τη βάση 7809 που βρίσκεται κοντά στους εκκινητές του *H19*, μελετήθηκε για το μοντέλο μεθυλίωσης της (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Οι δύο περιοχές πριν από τους εκκινητές του *H19* που μελετήθηκαν. Η περιοχή ελέγχου της αποτύπωσης ICR (βλέπε παραπάνω) και η περιοχή που σχετίζεται με την έκφραση του *H19*

Τα δείγματα των κυήσεων με EYA εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με τους πλακούντες από φυσιολογικές κυήσεις, με τιμές 22,3% και 32,4% (Σχήμα 8)($P=0,02$). Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του προφίλ της μεθυλίωσης και της έκφρασης του *H19*. Επίσης δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των PMR και άλλων παραμέτρων όπως των ΕΘ του βάρους γέννησης ($P=0,08$), του βάρους γέννησης ($P=0,33$) και της ηλικίας κύησης ($P=0,52$). Λιγότερα δείγματα από την ομάδα μελέτης εμφάνισαν $PMR>50\%$ ($OR=0.17$), αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν σημαντική. Συγκρίναμε τέσσερα δείγματα που εμφάνισαν απώλεια της αποτύπωσης για το *H19* με τέσσερα δείγματα που διατήρησαν τη μεθυλίωση. Δεν υπήρξε διαφορά στις μέσες τιμές των ποσοστών μεθυλίωσης μεταξύ

αυτών των δειγμάτων (46,3% για τα δείγματα με LOI και 44,2% για τα δείγματα με MOI, $P=0,93$).



Σχήμα 8: Σύγκριση επιπέδων μεθυλίωσης (PMR) μεταξύ των δύο ομάδων. Τα δείγματα με EYA είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα PMR σε σχέση με τους πλακούντες από την ομάδα ελέγχου ($P=0.02$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα γονίδια *IGF2/H19* αποτελούν δύο από τα πρώτα γονίδια αποτύπωσης που αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν. Όπως αναφέρθηκε και στο γενικό μέρος, πρόκειται για δύο γονίδια με αντίστροφη έκφραση που εδράζονται στο 11p15.5 γειτονικά το ένα με το άλλο και μοιράζονται κοινούς μεταγραφικούς μηχανισμούς. Τόσο το *IGF2* όσο και το *H19* φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.[109] Το *IGF2* εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στον πλακούντα του ποντικίου και του ανθρώπου και επηρεάζει την λειτουργική ικανότητα του πλακούντα να μεταφέρει θρεπτικά συστατικά προς το έμβρυο, καθώς επίσης

επηρεάζει και την αύξηση του μεγέθους του πλακούντα. Εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς μόνο από το πατρικό αλληλόμορφο, ενώ το μητρικό αλληλόμορφο είναι μεταγραφικά σε σιγή. Το μητρικής προέλευσης εκφραζόμενο *H19*, αν και δεν κωδικοποιεί κάποια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, μεταγράφεται σε ένα RNA που έχει ανασταλτικές της ανάπτυξης ιδιότητες, πιθανότατα έμμεσα μέσω της δράσης του στην παραγωγή του *IGF2* mRNA. [184]

Τα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία όσον αφορά την επίδραση των συγκεκριμένων γονιδίων στην εμβρυϊκή ανάπτυξη του ανθρώπου, είναι πολύ λίγα. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η εξακρίβωση του πιθανού ρόλου της μεθυλίωσης του DNA, περιοχών των *IGF2/H19* που ελέγχουν την έκφραση και την αποτύπωση των παραπάνω γονιδίων, στην παθοφυσιολογία της ΕΥΑ. Τα αποτελέσματα μας δίνουν έμφαση στον σημαντικό ρόλο της συγκεκριμένης περιοχής του χρωμοσώματος 11, όπου εδράζονται γονίδια αποτύπωσης, στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με όσα έχουν αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες σχετικά με τη μειωμένη έκφραση του *IGF2* σε πλακούντες κυήσεων με ΕΥΑ.[176, 185, 186] Το εύρημα αυτό έχει αναφερθεί τόσο σε πλακούντες από ανθρώπους όσο και σε ζώα. Σε ποντίκια όπου δεν εκφραζόταν το *Igf2* εμφάνισαν 40% μείωση τους βάρους των εμβρύων σε σχέση με τα φυσιολογικά και ταυτόχρονα παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένο μέγεθος πλακούντα.[65, 153] Το *IGF2* επιδρά στην ικανότητα του πλακούντα να μεταφέρει θρεπτικά συστατικά προς το έμβρυο και η μειωμένη έκφραση του επηρεάζει τις ικανότητες διάχυσης συστατικών όλων των στιβάδων του πλακούντα.[187] Επομένως τα μειωμένα επίπεδα mRNA που μετρήθηκαν στη μελέτη μας, συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα. Σε μία παρόμοια έρευνα τα αποτελέσματα της οποίας δημοσιεύτηκαν το 2008 από τους Guo και συνεργάτες, διαπιστώθηκε μειωμένη έκφραση του *IGF2*

στα περιστατικά με EYA, και επιπρόσθετα ή μείωση αυτή συσχετίστηκε με τις ΕΘ του βάρους γέννησης και συνεπώς με τη βαρύτητα της EYA.[185] Στη δική μας μελέτη παρόλα αυτά δεν μπορέσαμε να συσχετίσουμε τα επίπεδα του mRNA με τη βαρύτητα της EYA.

Σημαντικό εύρημα της έρευνας μας, ήταν η εύρεση αυξημένης έκφρασης του H19 στις κυήσεις με EYA. Με τα δεδομένα που έχουμε, αυτό πιθανότατα αποτελεί ένα εύρημα που δεν έχει αναφερθεί ξανά, με άγνωστη παρόλα αυτά σημασία. Αν και ο Guo και οι συνεργάτες του ανέφεραν μία αυξητική τάση του H19 mRNA σε κυήσεις με νεογνά μικρά για την ηλικία κύησης (SGA), αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.[185] Πειραματικά δεδομένα σε ποντίκια συνέδεσαν την αυξημένη έκφραση του H19 με περιστατικά μειωμένης ανάπτυξης του παιδιού μετά τη γέννηση.[184] Η συσχέτιση όμως της έκφρασης του H19 με διαταραχές της ανάπτυξης ενδομητρίως, δεν μπορεί να αποδειχθεί, κυρίως λόγω της ετερογενούς έκφρασης του γονιδίου στα διάφορα είδη ιστών.[109] Αν και υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που υποδεικνύουν πως διαταραχή στην έκφραση του H19 έχει παρατηρηθεί σε ανωμαλίες του πλακούντα όπως σε περιπτώσεις τροφοβλαστικής νόσου, εντούτοις δεν μπορούν να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα. Αυτό που θα πρέπει να σημειωθεί είναι πως ο υψηλός μέσος όρος mRNA που βρέθηκαν στα δείγματα μας, προέκυψε κυρίως από υψηλές τιμές που αφορούσαν συγκεκριμένα δείγματα. Αυτό το γεγονός μπορεί να μειώνει κατά κάποιο τρόπο τη σημασία του ευρήματος μας, παρόλα αυτά το αποτέλεσμα αυτό καθ' αυτό αποτελεί από μόνο του ένα κίνητρο για περαιτέρω έρευνα με σκοπό την εξακρίβωση του ρόλου του H19 στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Εφόσον τα γονίδια IGF2 και H19 μεταγράφονται με αντίστροφο τρόπο, το αναμενόμενο αποτέλεσμα θα ήταν τα μειωμένα επίπεδα mRNA να συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα H19 mRNA. Αν και είχαμε αυτά τα δύο ευρήματα στην

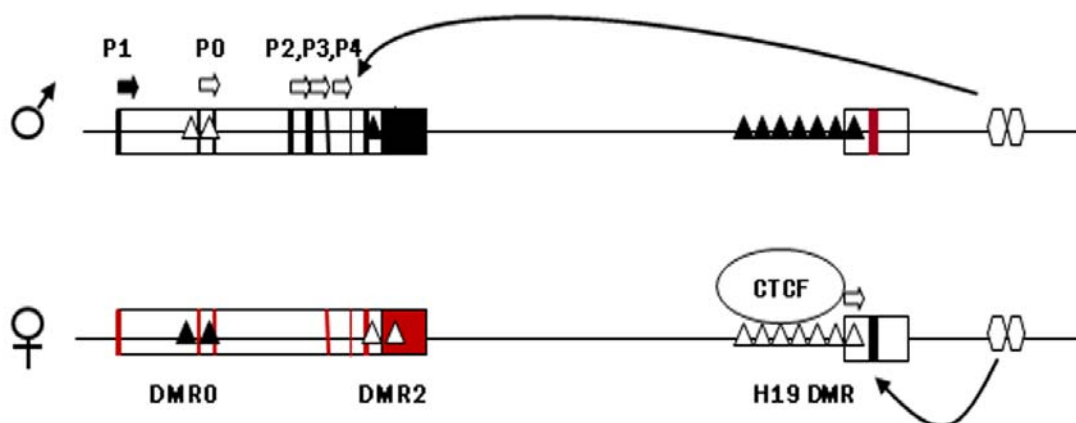
ομάδα των πλακούντων με την ΕΥΑ, δεν μπορέσαμε να αποδείξουμε κάποια συσχέτιση μεταξύ των δύο γεγονότων. Επικεντρώσαμε την ανάλυση μας στο λόγο των mRNAs των δύο γονιδίων με σκοπό να εξακριβώσουμε τυχόν συσχέτιση στις δύο ομάδες περιστατικών. Δεν διαπιστώσαμε παρόλα αυτά κάποια συσχέτιση του λόγου των mRNA στα δείγματα μας. Αυτή λοιπόν η οργανωμένη αντίθετη κοινή έκφραση των δύο γονιδίων, είναι ένα εύρημα που θα πρέπει να επιβεβαιωθεί και διερευνηθεί περαιτέρω με μεγαλύτερες μελέτες. Αυτό που υπάρχει μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία, είναι πως αν και τα *IGF2* και *H19* μοιράζονται κοινούς μεταγραφικούς μηχανισμούς με αντίθετο τρόπο, η έκφραση τους μπορεί να είναι ανεξάρτητη. Ειδικότερα έχει ήδη βρεθεί σε πρόσφατες μελέτες, πως η έκφραση του *IGF2* και του *H19* σε πλακούντες κυήσεων με ΕΥΑ, δεν σχετίζονται μεταξύ τους. [185, 188]

Η έκφραση και από τα δύο αλληλόμορφα, δηλαδή η διαταραχή στον μηχανισμό αποτύπωσης, διαπιστώθηκε μόνο σε παθολογικά δείγματα για το *IGF2*. Δεν υπήρχαν δείγματα στη μελέτη μας που εμφάνισαν LOI και για τα δύο γονίδια. Παρόμοια ευρήματα παρουσίασε ο Yu και συνεργάτες που μελέτησε το μοντέλο αποτύπωσης του *H19* σε φυσιολογικούς πλακούντες και πλακούντες προεκλαμψίας.[189] Απώλεια της αποτύπωσης (LOI) διαπιστώθηκε μόνο στα περιστατικά προεκλαμψίας, και επιπλέον το φαινόμενο συσχετίστηκε και με τη βαρύτητα της νόσου. Παρομοίως, σε άλλη μελέτη, ανώμαλη αποτύπωση διαπιστώθηκε μόνο σε ιστούς με τροφοβλαστική νόσο και όχι σε φυσιολογικό τροφοβλαστικό ιστό.[190] Εφόσον και τα δικά μας ευρήματα έδειξαν LOI μόνο στους παθολογικούς πλακούντες, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως η διαταραχή στην αποτύπωση σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του πλακούντα και μέσω αυτού του φαινομένου μπορεί να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της ΕΥΑ. Ο Yu και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα σε περιστατικά πλακούντων με

προεκλαμψία, διαπιστώνοντας LOI για το H19 κυρίως στα παθολογικά δείγματα και οδηγήθηκαν στην υπόθεση πως το φαινόμενο αυτό μπορεί να συνδέεται με ανώμαλη τροφοβλαστική διείσδυση που αποτελεί επίσης ένα συχνό εύρημα σε περιπτώσεις EYA.[189]

Στα πλαίσια της αρχικής μας υπόθεσης, η ελαττωμένη έκφραση του IGF2 και η αυξημένη έκφραση του H19 θα έπρεπε να σχετίζονται με την κατάσταση αποτύπωσης των συγκεκριμένων γονιδίων. Αυτό θα υπαγόρευε, πως τα δείγματα με την μεγαλύτερη έκφραση είναι πιθανότερο να εμφανίζουν LOI σε σχέση με όσα είχαν μειωμένη έκφραση. Αυτό όμως δεν επαληθεύτηκε, εφόσον τα δείγματα που εμφάνισαν LOI είχαν παρόμοια επίπεδα mRNA με όσα είχαν φυσιολογική αποτύπωση και για τα δύο γονίδια. Αυτή η παρατήρηση πιθανότατα φανερώνει πως δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ της αποτύπωσης και της μεταγραφής του IGF2 στον πλακούντα. Αν και μελέτες σε καρκίνους έχουν δείξει πως η διαλληλική έκφραση των γονιδίων αποτύπωσης συνοδεύεται από αυξημένη έκφραση, η ομάδα των DiPlas και συνεργατών κατέληξε σε μία πολύ σημαντική παρατήρηση που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματά μας. Οι ερευνητές συμπέραναν πως αν και τα γονίδια αποτύπωσης φαίνεται πως εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της EYA, εντούτοις πιθανότατα άλλοι μηχανισμοί και όχι η αποτύπωση είναι αυτοί που ευθύνονται για τη διαταραχή στην έκφραση αυτών των γονιδίων.[188] Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και ερευνητές που μελέτησαν την αποτύπωση και την έκφραση του H19 σε πλακούντες κυήσεων με προεκλαμψία.[189] Δεν υπήρξε συσχέτιση της παθολογικής αποτύπωσης με ανώμαλη έκφραση. Τέλος σε μελέτες περιστατικών καρκίνου διαπιστώθηκε πως αν και η εμφάνιση LOI σε παράγοντες ανάπτυξης όπως το IGF2 μπορεί να αποτελεί το αρχικό στάδιο για την καρκινογένεση, δεν υπάρχει προφανής συσχέτιση του προφίλ αποτύπωσης και της έκφρασης στα καρκινικά κύτταρα.[191]

Με τη βοήθεια της ανάλυσης MethyLight qPCR μελετήσαμε το προφίλ μεθυλίωσης τριών DMRs στη μεταγραφική και την αποτύπωση των *IGF2* και *H19*. Στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύσαμε το προφίλ μεθυλίωσης μίας περιοχής DMR που βρίσκεται στους εκκινητές του *IGF2*, μίας στους εκκινητές του *H19* και τέλος της περιοχής μεταξύ των δύο γονιδίων που θεωρείται κέντρο ελέγχου της αποτύπωσης ICR. Η διαταραχή της μεθυλίωσης σε αυτές τις περιοχές έχει κυρίως μελετηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου.[192] Το μοντέλο αντίθετης μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων *IGF2* και *H19*, περιγράφει πως η DMR περιοχή που βρίσκεται πιο πριν από τους εκκινητές του *H19* και περιέχει σημεία πρόσδεσης του παράγοντα CTCF, αν είναι μεθυλιωμένη και στα δύο αλληλόμορφα, τότε το *H19* δεν μεταγράφεται ενώ το *IGF2* μεταγράφεται και από τα δύο αλληλόμορφα (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Η θεωρία της κοινής αντίστροφης ρύθμισης της έκφρασης των *IGF2*/*H19* μέσω της μεθυλίωσης. Ο μηχανισμός παρουσιάζεται στο πατρικό και μητρικό χρωμόσωμα. Οι κάθετες μαύρες μπάρες αναπαριστούν τα εξώνια από το αλληλόμορφο που εκφράζεται, ενώ οι κόκκινες από το αλληλόμορφο που δεν εκφράζεται. Τα μαύρα βέλη υποδηλώνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής. Τα οβάλ σχήματα αναπαριστούν τους διεγέρτες. Τρεις γνωστές περιοχές με

διαφορετική μεθυλίωση (Differentially Methylated Regions DMR) παρουσιάζονται με τη μορφή τριγώνων. Τα γεμάτα τρίγωνα αναπαριστούν τις μεθυλιωμένες περιοχές DMR και τα άδεια τις υπομεθυλιωμένες περιοχές. Η DMR περιοχή που βρίσκεται πριν από τους εκκινητές του H19, φιλοξενεί τις περιοχές πρόσδεσης του CTCF. Μεθυλίωση στη συγκεκριμένη περιοχή εμποδίζει την πρόσδεση του CTCF και επιτρέπει έτσι την αλληλεπίδραση των διεγερτών με τους εκκινητές του IGF2 και επομένως την έκφραση του IGF2. Στο μητρικό χρωμόσωμα, η υπομεθυλιωμένη περιοχή συνδέεται με τον CTCF εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση των εκκινητών του IGF2 με τους διεγέρτες με αποτέλεσμα την επίδραση των διεγερτών στους εκκινητές του H19, και συνεπώς την έκφραση του. Υπάρχουν επίσης και περιοχές DMR στο γονίδιο IGF2 (DMR0, DMR2). Η DMR0 είναι μεθυλιωμένη στο μητρικό αλληλόμορφο. Αν και η DMR στο εξώνιο 9 είναι μεθυλιωμένη στο πατρικό αλληλόμορφο, αυτή η περιοχή πιθανότατα εμπλέκεται και στην αποτύπωση του συγκεκριμένου γονιδίου.

Η ανάλυση του ποσοστού μεθυλίωσης στη συγκεκριμένη περιοχή έδειξε πως τα δείγματα με EYA εμφάνισαν χαμηλότερα, αλλά χωρίς σημαντική διαφορά επίπεδα μεθυλίωσης, από την ομάδα ελέγχου (27.4% και 30.8% αντίστοιχα). Τα ποσοστά αυτά δεν διαφέρουν σημαντικά με ότι έχει ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τη συγκεκριμένη περιοχή, σε πλακουντιακούς ιστούς.[193] Αν και στη δική μας μελέτη η υπομεθυλίωση στη συγκεκριμένη περιοχή δεν ήταν σημαντική, άλλοι ερευνητές έχουν συσχετίσει τα χαμηλά ποσοστά μεθυλίωσης με την μείωση του ρυθμού της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Επομένως βασιζόμενοι στα ευρήματά μας, αλλά και σε όσα έχουν ήδη δημοσιευτεί από άλλους, θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε πως η ανώμαλη μεθυλίωση στην ICR περιοχή των

IGF2/H19 θα μπορούσε να αποτελέσει το συνδετικό κρίκο μεταξύ επιγενετικών βλαβών και διαταραχών στην εμβρυϊκή και πλακουντιακή άυξηση.

Με βάση την παραπάνω θεωρία της αντίστροφης μεταγραφής των δύο γονιδίων, η μικρή αυτή διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης και τα χαμηλά ποσοστά μεθυλίωσης στα δείγματα με EYA, επιτρέπει θεωρητικά τη σύνδεση με την πρωτεΐνη CTCF και εμποδίζει την πρόσδεση παραγόντων μεταγραφής στον *IGF2* και συνεπώς εμποδίζει την έκφραση του, ενώ αντίθετα ευοδώνει την μεταγραφή του *H19*. Αν και τα αποτελέσματα της μελέτης της έκφρασης των δύο γονιδίων ταιριάζουν με αυτό το θεωρητικό μοντέλο (μειωμένη έκφραση του *IGF2* και αυξημένη για το *H19* στα παθολογικά δείγματα), παρόλα αυτά δεν μπορέσαμε να αποδείξουμε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων PMR στη συγκεκριμένη περιοχή και των τιμών mRNA του *IGF2* ή του *H19*.

Η υπομεθυλίωση στην ICR περιοχή, θεωρείται υπεύθυνη για την εμφάνιση του χαμηλού βάρους γέννησης και του μειωμένου ρυθμούς ανάπτυξης του παιδιού μετά τη γέννηση, που παρατηρείται στο ένα τρίτο των ασθενών με SRS.[194] Όλα τα παιδιά που γεννήθηκαν με EYA και περιλήφθηκαν στη μελέτη, εξετάστηκαν μετά τη γέννηση για να αποκλειστεί το συγκεκριμένο σύνδρομο καθώς και άλλες γενετικές ανωμαλίες με καθυστερημένη εκδήλωση. Κανένα από τα παιδιά αυτά δεν ανταποκρινόταν στα διαγνωστικά κριτήρια των συγκεκριμένων παθήσεων (μέσος όρος παρακολούθησης 4,3 χρόνια).

Το προφίλ μεθυλίωσης μίας DMR στους εκκινητές του *IGF2* αναλύθηκε επίσης, με σκοπό να διερευνηθεί μία πιθανή συσχέτιση με τα ευρήματα της μεταγραφής του γονιδίου στους παθολογικούς ιστούς. Η διαφορά στα ποσοστά μεθυλίωσης μεταξύ των δειγμάτων της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου ήταν οριακά σημαντικά (23.3% και 29.6% αντίστοιχα $P=0.05$). Η υπομεθυλίωση σε αυτήν την περιοχή ταιριάζει θεωρητικά με το εύρημα της απώλειας της

αποτύπωσης για το *IGF2* στα δείγματα με EYA, όχι όμως και με την μειωμένη έκφραση του *IGF2*.

Η υπομεθυλίωση σε αυτή την περιοχή έχει συνδεθεί με διαταραχές στην αποτύπωση σε καρκινικά αλλά και φυσιολογικά κύτταρα.[191] Παρόλα αυτά άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν πως η συγκεκριμένη DMR είναι ένας αναστολέας της μεταγραφής του *IGF2*, ανεξάρτητα από το *H19*. [195] Επειδή λοιπόν η απώλεια της αποτύπωσης μπορεί να σχετίζεται με την υπομεθυλίωση, υποθέσαμε πως τα δείγματα με μειωμένα PMR για το *IGF2* DMR θα είναι κυρίως όσα εμφανίζουν διαταραχές στην αποτύπωση του *IGF2* στους πλακούντες με EYA. Παρόλα αυτά τα επίπεδα μεθυλίωσης των δειγμάτων με EYA που είχαν ανώμαλη ή φυσιολογική αποτύπωση, είχαν παρόμοια PMR. Η ομάδα των Guo και συνεργατών διαπίστωσε υπομεθυλίωση του DMR2 του *IGF2* στο εξώνιο 9 σε πλακούντες νεογνών με χαμηλό βάρος γέννησης, αλλά φυσιολογικά ποσοστά μεθυλίωσης στο DMR των εκκινήτων του *H19*. [185] Δεν υπάρχει προφανής εξήγηση που να ερμηνεύει τα παρόμοια ποσοστά μεθυλίωσης μεταξύ των δειγμάτων που είχαν LOI και MOI. Εφόσον το προφίλ μεθυλίωσης του *IGF2* έχει βρεθεί να εξαρτάται από κάθε ιστό ξεχωριστά, χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για να μπορέσουν να αποσαφηνίσουν τα πειραματικά μας αποτελέσματα.

Χαμηλά ποσοστά μεθυλίωσης διαπιστώθηκαν επίσης στο DMR των εκκινήτων του *H19*. Υπομεθυλίωση στη συγκεκριμένη περιοχή, έχει βρεθεί σε όλα τα στάδια της φυσιολογικής αύξησης του πλακούντα.[148] Το ίδιο εύρημα έχει επίσης περιγραφεί και σε πλακούντες κυήσεων με χαμηλό βάρος γέννησης του εμβρύου.[185] Θεωρητικά η υπομεθυλίωση στην περιοχή των εκκινήτων ενός γονιδίου, ευθύνεται για την αυξημένη έκφραση του. Επομένως οι χαμηλές τιμές PMR του *H19* στην ομάδα με την EYA βρίσκονται σε αντιστοιχία με τα αυξημένα

επίπεδα mRNA του γονιδίου. Δε βρέθηκε παρόλα αυτά συσχέτιση μεταξύ μετρήσεων των PMR και του mRNA.

Το εύρος των τιμών των PMR και στις δύο ομάδες ιστών που μελετήσαμε, ήταν αρκετά μεγάλο. Υπήρχαν δείγματα που εμφάνιζαν πολύ υψηλές και άλλα πολύ χαμηλές τιμές PMR. Αυτή η ετερογένεια έχει ήδη περιγραφεί και από άλλους ερευνητές. Η ετερογένεια στη μεθυλίωση του DNA στο ίδιο άτομο φαίνεται πως είναι συχνό φαινόμενο στο ανθρώπινο γονιδίωμα.[196] Ειδικότερα στον πλακούντα έχει παρατηρηθεί μεγάλη ποικιλομορφία στα συνολικά επίπεδα μεθυλίωσης σε σχέση με άλλους ιστούς, πιθανότατα λόγω του ρόλου του να αποδέχεται αντικρουόμενα ερεθίσματα από τη μητέρα και το έμβρυο.[197] Η ετερογένεια αυτή στον πλακούντα δεν αφορά αποκλειστικά τη μεθυλίωση γονιδίων αποτύπωσης, αλλά και άλλες κατηγορίες γονιδίων.[198-200] Η ακριβής φύση αυτής της ετερογενούς επιγενετικής ρύθμισης καθώς επίσης και ο ρόλος της στην πορεία της κύησης, δεν έχει αποσαφηνιστεί.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λίγα μόνο γονίδια αποτύπωσης έχουν μελετηθεί όσον αφορά το ρόλο τους στην παθοφυσιολογία της ΕΥΑ. Μέχρι τώρα υπάρχουν ελάχιστα πειραματικά δεδομένα διαταραχής της αποτύπωσης και της μεθυλίωσης που να σχετίζονται με την εμφάνιση ΕΥΑ. Από τη συγκεντρωτική μελέτη που κάναμε, αξιολογώντας ταυτόχρονα, τρία διαφορετικά μοριακά φαινόμενα (έκφραση, αποτύπωση, μεθυλίωση), προέκυψαν αρκετά συμπεράσματα αλλά και ερωτήματα.

Η μειωμένη έκφραση του IGF2 στους πλακούντες των κυήσεων με ΕΥΑ, συνάγει με το ρόλο του συγκεκριμένου γονιδίου στη λειτουργία του πλακούντα. Ταυτόχρονα η αυξημένη έκφραση του H19 στην ίδια ομάδα ιστών είναι ένα εύρημα που είναι συμβατό με τη ήδη γνωστή συμπεριφορά του H19 σε σύνδρομα

διαταραχής της ανάπτυξης μετά τη γέννηση. Παρόλα αυτά είναι δύσκολο να εξακριβωθεί αν η παρατηρούμενη ανώμαλη έκφραση και των δύο γονιδίων αποτελεί έναν παράγοντα που συνδέεται αιτιολογικά με την EYA ή είναι απλά μία συνέπεια της γενικότερης πλακουντιακής δυσλειτουργίας που οδηγεί σε μια μεταγραφική δυσλειτουργία των γονιδίων αποτύπωσης.

Η ανώμαλη διαλληλική έκφραση των γονιδίων αποτύπωσης είναι ένα εύρημα το οποίο έχει περιγραφεί κατά κύριο λόγο σε περιπτώσεις ανώμαλης πλακουντοποίησης όπως περιπτώσεις προεκλαμψίας και τροφοβλαστικής νόσου. Υποθέτουμε πως σε περιπτώσεις EYA, ο πλάκουντας ανταποκρίνεται στη χρόνια χαμηλή αιματική ροή με την ενεργοποίηση μίας σειράς γονιδίων μέσω της αποτύπωσης. Επομένως η απώλεια της αποτύπωσης και η διαλληλική έκφραση του *IGF2* που διαπιστώθηκε στους πλακούντες με EYA, μπορεί να αποτελεί μία προσπάθεια του πλακούντα να αντιρροπήσει τη μειωμένη του λειτουργική ικανότητα, με την ενεργοποίηση και του δεύτερου αλληλόμορφου ενός παράγοντα ανάπτυξης όπως είναι το *IGF2*. Δεν είναι όμως ξεκάθαρο ποια είναι η άμεση επίδραση της αποτύπωσης στα γονίδια *IGF2* και *H19* και γιατί αυτή η διαταραχή στην αποτύπωση δεν σχετίζεται με τα επίπεδα του mRNA των δύο γονιδίων.

Στη μελέτη μας διαπιστώσαμε διαταραχή του προφίλ μεθυλίωσης στην περιοχή ICR στα δείγματα με EYA. Επίσης φάνηκε μία σχέση της ανώμαλης μεθυλίωσης και της απώλειας της αποτύπωσης του *IGF2* που μπορεί να σχετίζεται με την EYA. Η υπομεθυλίωση των τριών περιοχών που μελετήσαμε ταιριάζει με δεδομένα που υπάρχουν ήδη στη βιβλιογραφία. Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης ήταν στο DMR των εκκινήτων του *H19* που αν και θεωρητικά συνδέεται με την αυξημένη έκφραση του *H19* δεν είναι ξεκάθαρο αν τα δύο γεγονότα αποτελούν στοιχείο των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην EYA ή είναι συνέπειες την πλακουντιακής ανεπάρκειας.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης είναι ο μεγάλος αριθμός των πλακούντων με σοβαρή EYA καθώς επίσης και των δειγμάτων που εμφάνισαν απώλεια της αποτύπωσης για το IGF2. Ταυτόχρονα όμως θα πρέπει να αναγνωρίσουμε και κάποιους σημαντικούς περιορισμούς. Καταρχήν δεν συμπεριλάβαμε τα βάρη των πλακούντων στη μελέτη των οποίων η συσχέτιση με τις μοριακές παραμέτρους, θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντική πληροφορία. Επιπρόσθετα, η μέτρηση των επιπέδων μεθυλίωσης στο ομφαλικό αίμα θα μπορούσε να δώσει μία εικόνα για το προφίλ μεθυλίωσης των γονιδίων στο ίδιο το έμβρυο.

Οι πληροφορίες που έχουμε μέχρι τώρα για τους επιγενετικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την απώλεια και τη διατήρηση της αποτύπωσης, είναι ελλιπείς. Η έρευνα που έχει γίνει μέχρι σήμερα σε περιοχές γονιδίων που ρυθμίζουν την αποτύπωση αποκάλυψε πολύπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν διεγέρτες, αναστολείς και μετατροπές με ιστόνες, που συνήθως είναι μηχανισμοί που εξαρτώνται από τον ιστό στον οποίο εφαρμόζονται.

Η επιγενετική τροποποίηση των γονιδίων αποτύπωσης που ελέγχουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη θα μπορούσε να ερμηνεύσει την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στη λειτουργία του πλακούντα με συνέπειες στην εμβρυϊκή αύξηση αλλά και στη μετέπειτα εξωμήτριο ζωή. Η αρχική μας υπόθεση ήταν να συσχετίσουμε μια αλυσίδα μοριακών γεγονότων με την εμφάνιση της EYA. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την ευαίσθητη επιγενετική ισορροπία των γονιδίων αποτύπωσης κατά την ενδομήτριο ζωή, μπορεί να οδηγήσουν σε ανώμαλη αποτύπωση και κατά συνέπεια ανώμαλη έκφραση. Εφόσον πολλά από αυτά τα γονίδια έχουν θεμελιώδη ρόλο την ομαλή λειτουργία της εμβρυοπλακουντιακής ομάδας, η ανώμαλη έκφραση τους μπορεί να συνδεθεί αιτιολογικά με την εμφάνιση EYA. Αν και από τη μελέτη προέκυψαν σημαντικά

συμπεράσματα που αφορούσαν μεμονωμένες διαταραχές στους μοριακούς μηχανισμούς που μελετήσαμε, δεν καταφέραμε όμως να βρούμε μία άμεση συσχέτιση όλων αυτών των ευρημάτων σύμφωνα με την αρχική υπόθεση. Παρόλα αυτά, πολλά από τα ευρήματά μας είναι σημαντικά γιατί αναφέρονται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, και αποτελούν αφορμή για μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, στις οποίες θα μπορούσε να δοθεί απάντηση στα πολλά ερωτήματα που προέκυψαν από τη δική μας ερευνητική προσπάθεια.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gardosi, J., et al., *Customised antenatal growth charts*. Lancet, 1992. **339**(8788): p. 283-7.
2. Sankaran, S. and P.M. Kyle, *Aetiology and pathogenesis of IUGR*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2009. **23**(6): p. 765-77.
3. Baschat, A.A., *Pathophysiology of fetal growth restriction: implications for diagnosis and surveillance*. Obstet Gynecol Surv, 2004. **59**(8): p. 617-27.
4. Usher, R. and F. McLean, *Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation*. J Pediatr, 1969. **74**(6): p. 901-10.
5. Battaglia, F.C. and L.O. Lubchenco, *A practical classification of newborn infants by weight and gestational age*. J Pediatr, 1967. **71**(2): p. 159-63.
6. Breart, G., et al., *Risk of fetal growth retardation as a result of maternal hypertension. Preparation to a trial on antihypertensive drugs*. Dev Pharmacol Ther, 1982. **4 Suppl**: p. 116-23.
7. Ounsted, M., V. Moar, and W.A. Scott, *Perinatal morbidity and mortality in small-for-dates babies: the relative importance of some maternal factors*. Early Hum Dev, 1981. **5**(4): p. 367-75.
8. Ross, M.G. and M.H. Beall, *Adult sequelae of intrauterine growth restriction*. Semin Perinatol, 2008. **32**(3): p. 213-8.
9. Barker, D.J., *Fetal growth and adult disease*. Br J Obstet Gynaecol, 1992. **99**(4): p. 275-6.
10. Williams, R.L., et al., *Fetal growth and perinatal viability in California*. Obstet Gynecol, 1982. **59**(5): p. 624-32.
11. Lubchenco, L.O., et al., *Intrauterine Growth as Estimated from Liveborn Birth-Weight Data at 24 to 42 Weeks of Gestation*. Pediatrics, 1963. **32**: p. 793-800.
12. Lee, P.A., et al., *International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001*. Pediatrics, 2003. **111**(6 Pt 1): p. 1253-61.

13. Seeds, J.W. and T. Peng, *Impaired growth and risk of fetal death: is the tenth percentile the appropriate standard?* Am J Obstet Gynecol, 1998. **178**(4): p. 658-69.
14. Monk, D. and G.E. Moore, *Intrauterine growth restriction--genetic causes and consequences.* Semin Fetal Neonatal Med, 2004. **9**(5): p. 371-8.
15. Vaessen, N., et al., *Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birthweight.* Lancet, 2002. **359**(9311): p. 1036-7.
16. Tower, C., et al., *Altered transmission of maternal angiotensin II receptor haplotypes in fetal growth restriction.* Hum Mutat, 2006. **27**(2): p. 138-44.
17. Murphy, V.E., et al., *Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus.* Endocr Rev, 2006. **27**(2): p. 141-69.
18. Lin, C.C., S.J. Su, and L.P. River, *Comparison of associated high-risk factors and perinatal outcome between symmetric and asymmetric fetal intrauterine growth retardation.* Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(6 Pt 1): p. 1535-41; discussion 1541-2.
19. Resnik, R., *Intrauterine growth restriction.* Obstet Gynecol, 2002. **99**(3): p. 490-6.
20. Villar, J. and J.M. Belizan, *The timing factor in the pathophysiology of the intrauterine growth retardation syndrome.* Obstet Gynecol Surv, 1982. **37**(8): p. 499-506.
21. Lockwood, C.J. and S. Weiner, *Assessment of fetal growth.* Clin Perinatol, 1986. **13**(1): p. 3-35.
22. Bauer, R., et al., *Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets.* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. **110 Suppl 1**: p. S40-9.
23. Hindmarsh, P.C., et al., *Intrauterine growth and its relationship to size and shape at birth.* Pediatr Res, 2002. **52**(2): p. 263-8.
24. Hamilton, B.E., J.A. Martin, and P.D. Sutton, *Births: preliminary data for 2003.* Natl Vital Stat Rep, 2004. **53**(9): p. 1-17.
25. McIntire, D.D., et al., *Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants.* N Engl J Med, 1999. **340**(16): p. 1234-8.
26. Johar, R., et al., *Birth weights in term infants. A 50-year perspective.* J Reprod Med, 1988. **33**(10): p. 813-6.

27. Forbes, K. and M. Westwood, *Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth*. J Endocrinol, 2010. **207**(1): p. 1-16.
28. Harvey, M.B., et al., *Roles of growth factors during peri-implantation development*. Hum Reprod, 1995. **10**(3): p. 712-8.
29. Aplin, J., *Maternal influences on placental development*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(2): p. 115-25.
30. Meschia, G., et al., *Utilization of substrates by the ovine placenta in vivo*. Fed Proc, 1980. **39**(2): p. 245-9.
31. Battaglia, F.C. and T.R. Regnault, *Placental transport and metabolism of amino acids*. Placenta, 2001. **22**(2-3): p. 145-61.
32. Castellucci, M., et al., *Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development*. Hum Reprod Update, 2000. **6**(5): p. 485-94.
33. Pijnenborg, R., et al., *Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy*. Placenta, 1983. **4**(4): p. 397-413.
34. Bonds, D.R., et al., *Human fetal weight and placental weight growth curves. A mathematical analysis from a population at sea level*. Biol Neonate, 1984. **45**(6): p. 261-74.
35. Carter, A.M., *Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies—a review*. Placenta, 2000. **21 Suppl A**: p. S31-7.
36. Ziegler, E.E., et al., *Body composition of the reference fetus*. Growth, 1976. **40**(4): p. 329-41.
37. Sacks, D.A., *Determinants of fetal growth*. Curr Diab Rep, 2004. **4**(4): p. 281-7.
38. Kleijer, M.E., G.A. Dekker, and A.R. Heard, *Risk factors for intrauterine growth restriction in a socio-economically disadvantaged region*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2005. **18**(1): p. 23-30.
39. Lang, J.M., A. Cohen, and E. Lieberman, *Risk factors for small-for-gestational-age birth in a preterm population*. Am J Obstet Gynecol, 1992. **166**(5): p. 1374-8.
40. Alexander, G.R., et al., *Birth outcomes of Asian-Indian-Americans*. Int J Gynaecol Obstet, 2007. **97**(3): p. 215-20.

41. Thompson, J.M., et al., *Risk factors for small-for-gestational-age babies: The Auckland Birthweight Collaborative Study*. *J Paediatr Child Health*, 2001. **37**(4): p. 369-75.
42. Raum, E., et al., *The impact of maternal education on intrauterine growth: a comparison of former West and East Germany*. *Int J Epidemiol*, 2001. **30**(1): p. 81-7.
43. Thame, M., et al., *Fetal growth is directly related to maternal anthropometry and placental volume*. *Eur J Clin Nutr*, 2004. **58**(6): p. 894-900.
44. Hackman, E., et al., *Maternal birth weight and subsequent pregnancy outcome*. *JAMA*, 1983. **250**(15): p. 2016-9.
45. Stein, A.D., et al., *Intrauterine famine exposure and body proportions at birth: the Dutch Hunger Winter*. *Int J Epidemiol*, 2004. **33**(4): p. 831-6.
46. Brooks, A.A., et al., *Birth weight: nature or nurture?* *Early Hum Dev*, 1995. **42**(1): p. 29-35.
47. Mitchell, E.A., et al., *Maternal nutritional risk factors for small for gestational age babies in a developed country: a case-control study*. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004. **89**(5): p. F431-5.
48. Cheng, C.J., et al., *Body mass index change between pregnancies and small for gestational age births*. *Obstet Gynecol*, 2004. **104**(2): p. 286-92.
49. Dejmek, J., et al., *The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth*. *Environ Health Perspect*, 2002. **110**(6): p. 601-6.
50. Kallen, K., *Maternal smoking during pregnancy and infant head circumference at birth*. *Early Hum Dev*, 2000. **58**(3): p. 197-204.
51. Kujovich, J.L., *Thrombophilia and pregnancy complications*. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. **191**(2): p. 412-24.
52. Infante-Rivard, C., et al., *Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(1): p. 19-25.
53. Verspyck, E., et al., *Thrombophilia and fetal growth restriction*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004. **113**(1): p. 36-40.

54. Chaddha, V., et al., *Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency*. Semin Fetal Neonatal Med, 2004. **9**(5): p. 357-69.
55. Graham, C.H., et al., *Adriana and Luisa Castellucci award lecture 1999: role of oxygen in the regulation of trophoblast gene expression and invasion*. Placenta, 2000. **21**(5-6): p. 443-50.
56. Garite, T.J., et al., *Twins and triplets: the effect of plurality and growth on neonatal outcome compared with singleton infants*. Am J Obstet Gynecol, 2004. **191**(3): p. 700-7.
57. Chauhan, S.P., et al., *Detecting fetal growth restriction or discordant growth in twin gestations stratified by placental chorionicity*. J Reprod Med, 2004. **49**(4): p. 279-84.
58. Snijders, R.J., et al., *Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities*. Am J Obstet Gynecol, 1993. **168**(2): p. 547-55.
59. Hohlfeld, P., et al., *Fetal toxoplasmosis: ultrasonographic signs*. Ultrasound Obstet Gynecol, 1991. **1**(4): p. 241-4.
60. Buchheit, J., et al., *Congenital cytomegalovirus disease in the Louisville area: a significant public health problem*. J Ky Med Assoc, 1994. **92**(10): p. 411-5.
61. Kingdom, J., et al., *Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2000. **92**(1): p. 35-43.
62. Brodsky, D. and H. Christou, *Current concepts in intrauterine growth restriction*. J Intensive Care Med, 2004. **19**(6): p. 307-19.
63. Fox, H., *Pathology of the placenta*. Clin Obstet Gynaecol, 1986. **13**(3): p. 501-19.
64. Soothill, P.W., et al., *Prediction of morbidity in small and normally grown fetuses by fetal heart rate variability, biophysical profile score and umbilical artery Doppler studies*. Br J Obstet Gynaecol, 1993. **100**(8): p. 742-5.
65. Baker, J., et al., *Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth*. Cell, 1993. **75**(1): p. 73-82.

66. Gilbert, W.M., A.L. Young, and B. Danielsen, *Pregnancy outcomes in women with chronic hypertension: a population-based study*. J Reprod Med, 2007. **52**(11): p. 1046-51.
67. Marsal, K., *Obstetric management of intrauterine growth restriction*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2009. **23**(6): p. 857-70.
68. Shepard, M.J., et al., *An evaluation of two equations for predicting fetal weight by ultrasound*. Am J Obstet Gynecol, 1982. **142**(1): p. 47-54.
69. Hadlock, F.P., et al., *Sonographic estimation of fetal weight. The value of femur length in addition to head and abdomen measurements*. Radiology, 1984. **150**(2): p. 535-40.
70. Cruz-Martinez, R. and F. Figueras, *The role of Doppler and placental screening*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2009. **23**(6): p. 845-55.
71. Westergaard, H.B., et al., *A critical appraisal of the use of umbilical artery Doppler ultrasound in high-risk pregnancies: use of meta-analyses in evidence-based obstetrics*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2001. **17**(6): p. 466-76.
72. Hernandez-Andrade, E., et al., *Uterine artery score and perinatal outcome*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2002. **19**(5): p. 438-42.
73. Mari, G. and R.L. Deter, *Middle cerebral artery flow velocity waveforms in normal and small-for-gestational-age fetuses*. Am J Obstet Gynecol, 1992. **166**(4): p. 1262-70.
74. Mari, G., *Doppler ultrasonography in obstetrics: from the diagnosis of fetal anemia to the treatment of intrauterine growth-restricted fetuses*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(6): p. 613 e1-9.
75. Erz, W. and M. Gonser, *[Doppler ultrasound of the middle cerebral artery: pre-final normalization of cerebrovascular circulation?]*. Geburtshilfe Frauenheilkd, 1995. **55**(7): p. 407-10.
76. Ferrazzi, E., et al., *Temporal sequence of abnormal Doppler changes in the peripheral and central circulatory systems of the severely growth-restricted fetus*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2002. **19**(2): p. 140-6.
77. Hecher, K., et al., *Monitoring of fetuses with intrauterine growth restriction: a longitudinal study*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2001. **18**(6): p. 564-70.
78. Lingman, G., J. Laurin, and K. Marsal, *Circulatory changes in fetuses with imminent asphyxia*. Biol Neonate, 1986. **49**(2): p. 66-73.

79. Rizzo, G., et al., *Umbilical vein pulsations and acid-base status at cordocentesis in growth-retarded fetuses with absent end-diastolic velocity in umbilical artery*. Biol Neonate, 1995. **68**(3): p. 163-8.
80. Anceschi, M.M., et al., *Computerized cardiotocography in the management of intrauterine growth restriction associated with Doppler velocimetry alterations*. Int J Gynaecol Obstet, 2004. **86**(3): p. 365-70.
81. Chauhan, S.P., et al., *Perinatal outcome and amniotic fluid index in the antepartum and intrapartum periods: A meta-analysis*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **181**(6): p. 1473-8.
82. Phelan, J.P., et al., *Amniotic fluid index measurements during pregnancy*. J Reprod Med, 1987. **32**(8): p. 601-4.
83. Manning, F.A., *Assessment of fetal condition and risk: analysis of single and combined biophysical variable monitoring*. Semin Perinatol, 1985. **9**(4): p. 168-83.
84. Brodzki, J., et al., *Early intervention in management of very preterm growth-restricted fetuses: 2-year outcome of infants delivered on fetal indication before 30 gestational weeks*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2009. **34**(3): p. 288-96.
85. Li, H., S. Gudmundsson, and P. Olofsson, *Prospect for vaginal delivery of growth restricted fetuses with abnormal umbilical artery blood flow*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003. **82**(9): p. 828-33.
86. Harvey, D., et al., *Abilities of children who were small-for-gestational-age babies*. Pediatrics, 1982. **69**(3): p. 296-300.
87. Tideman, E., K. Marsal, and D. Ley, *Cognitive function in young adults following intrauterine growth restriction with abnormal fetal aortic blood flow*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2007. **29**(6): p. 614-8.
88. Barker, D.J. and C. Osmond, *Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales*. Lancet, 1986. **1**(8489): p. 1077-81.
89. Eriksson, J.G., et al., *Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life*. Diabetologia, 2003. **46**(2): p. 190-4.
90. Singhal, A., et al., *Low nutrient intake and early growth for later insulin resistance in adolescents born preterm*. Lancet, 2003. **361**(9363): p. 1089-97.

91. Hahnemann, J.M. and L.O. Vejerslev, *Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)—diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992*. *Prenat Diagn*, 1997. **17**(9): p. 801-20.
92. McGrath, J. and D. Solter, *Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes*. *Cell*, 1984. **37**(1): p. 179-83.
93. Surani, M.A., S.C. Barton, and M.L. Norris, *Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis*. *Nature*, 1984. **308**(5959): p. 548-50.
94. Lindor, N.M., et al., *A genetic review of complete and partial hydatidiform moles and nonmolar triploidy*. *Mayo Clin Proc*, 1992. **67**(8): p. 791-9.
95. Searle, A.G. and C.V. Beechey, *Genome imprinting phenomena on mouse chromosome 7*. *Genet Res*, 1990. **56**(2-3): p. 237-44.
96. Engel, E., *A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy*. *Am J Med Genet*, 1980. **6**(2): p. 137-43.
97. Kalousek, D.K., et al., *Uniparental disomy for chromosome 16 in humans*. *Am J Hum Genet*, 1993. **52**(1): p. 8-16.
98. Moore, G.E., et al., *The incidence of uniparental disomy associated with intrauterine growth retardation in a cohort of thirty-five severely affected babies*. *Am J Obstet Gynecol*, 1997. **176**(2): p. 294-9.
99. Kalousek, D.K., et al., *Trisomy 7 CVS mosaicism: pregnancy outcome, placental and DNA analysis in 14 cases*. *Am J Med Genet*, 1996. **65**(4): p. 348-52.
100. Reik, W. and J. Walter, *Genomic imprinting: parental influence on the genome*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(1): p. 21-32.
101. Wilkins, J.F. and D. Haig, *What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(5): p. 359-68.
102. Tycko, B. and I.M. Morison, *Physiological functions of imprinted genes*. *J Cell Physiol*, 2002. **192**(3): p. 245-58.
103. Miozzo, M. and G. Simoni, *The role of imprinted genes in fetal growth*. *Biol Neonate*, 2002. **81**(4): p. 217-28.
104. Coan, P.M., G.J. Burton, and A.C. Ferguson-Smith, *Imprinted genes in the placenta—a review*. *Placenta*, 2005. **26 Suppl A**: p. S10-20.

105. Fowden, A.L., *The insulin-like growth factors and feto-placental growth*. Placenta, 2003. **24**(8-9): p. 803-12.
106. Haig, D., *Colloquium papers: Transfers and transitions: parent-offspring conflict, genomic imprinting, and the evolution of human life history*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107 Suppl 1**: p. 1731-5.
107. Moore, T. and D. Haig, *Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war*. Trends Genet, 1991. **7**(2): p. 45-9.
108. McLaren, R.J. and G.W. Montgomery, *Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep*. Mamm Genome, 1999. **10**(6): p. 588-91.
109. Fowden, A.L., et al., *Imprinted genes, placental development and fetal growth*. Horm Res, 2006. **65 Suppl 3**: p. 50-8.
110. Frank, D., et al., *Placental overgrowth in mice lacking the imprinted gene *Ipl**. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7490-5.
111. Carroll, S.B., *Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity*. Cell, 2000. **101**(6): p. 577-80.
112. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
113. Robertson, K.D. and A.P. Wolffe, *DNA methylation in health and disease*. Nat Rev Genet, 2000. **1**(1): p. 11-9.
114. Chen, R.Z., et al., *DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates*. Nature, 1998. **395**(6697): p. 89-93.
115. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. Trends Genet, 1997. **13**(8): p. 335-40.
116. Costello, J.F. and C. Plass, *Methylation matters*. J Med Genet, 2001. **38**(5): p. 285-303.
117. Bestor, T., et al., *Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases*. J Mol Biol, 1988. **203**(4): p. 971-83.
118. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
119. Wolffe, A.P. and M.A. Matzke, *Epigenetics: regulation through repression*. Science, 1999. **286**(5439): p. 481-6.

120. Bird, A.P. and A.P. Wolffe, *Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin*. Cell, 1999. **99**(5): p. 451-4.
121. Tate, P.H. and A.P. Bird, *Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(2): p. 226-31.
122. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
123. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell, 1992. **69**(6): p. 915-26.
124. Jahner, D., et al., *De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis*. Nature, 1982. **298**(5875): p. 623-8.
125. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
126. Popiela, A., et al., *The meaning of the methylation of genomic DNA in the regulation of gene expression levels*. Eur J Gynaecol Oncol, 2004. **25**(2): p. 145-9.
127. Maher, E.R. and W. Reik, *Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited*. J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 247-52.
128. Nicholls, R.D., S. Saitoh, and B. Horsthemke, *Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes*. Trends Genet, 1998. **14**(5): p. 194-200.
129. Hagberg, B., et al., *A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases*. Ann Neurol, 1983. **14**(4): p. 471-9.
130. Amir, R.E., et al., *Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes*. Ann Neurol, 2000. **47**(5): p. 670-9.
131. Ohta, T., et al., *Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(2): p. 397-413.
132. Varela, M.C., et al., *Phenotypic variability in Angelman syndrome: comparison among different deletion classes and between deletion and UPD subjects*. Eur J Hum Genet, 2004. **12**(12): p. 987-92.

133. Williams, C.A., A.I. Dagli, and D.J. Driscoll, *Angelman Syndrome*. 1993.
134. Joyce, J.A., et al., *Imprinting of IGF2 and H19: lack of reciprocity in sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(9): p. 1543-8.
135. Preece, M.A., *The genetics of the Silver-Russell syndrome*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2002. **3**(4): p. 369-79.
136. Wakeling, E.L., et al., *Silver-Russell syndrome and ring chromosome 7*. *J Med Genet*, 2000. **37**(5): p. 380.
137. Wakeling, E.L., et al., *Biallelic expression of IGFBP1 and IGFBP3, two candidate genes for the Silver-Russell syndrome*. *J Med Genet*, 2000. **37**(1): p. 65-7.
138. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. *Science*, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
139. Del Senno, L., et al., *Differential hypomethylation of the c-myc protooncogene in bladder cancers at different stages and grades*. *J Urol*, 1989. **142**(1): p. 146-9.
140. Vachtenheim, J., I. Horakova, and H. Novotna, *Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 1994. **54**(5): p. 1145-8.
141. Oligny, L.L., *Human molecular embryogenesis: an overview*. *Pediatr Dev Pathol*, 2001. **4**(4): p. 324-43.
142. Veraksa, A., M. Del Campo, and W. McGinnis, *Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans*. *Mol Genet Metab*, 2000. **69**(2): p. 85-100.
143. Aoki, F., D.M. Worrad, and R.M. Schultz, *Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo*. *Dev Biol*, 1997. **181**(2): p. 296-307.
144. Dean, W., F. Santos, and W. Reik, *Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer*. *Semin Cell Dev Biol*, 2003. **14**(1): p. 93-100.
145. Mayer, W., et al., *Demethylation of the zygotic paternal genome*. *Nature*, 2000. **403**(6769): p. 501-2.

146. Dean, W., et al., *Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13734-8.
147. Ginsburg, M., M.H. Snow, and A. McLaren, *Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation*. Development, 1990. **110**(2): p. 521-8.
148. Jinno, Y., et al., *Establishment of functional imprinting of the H19 gene in human developing placentae*. Nat Genet, 1995. **10**(3): p. 318-24.
149. Constancia, M., et al., *Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 945-8.
150. Randhawa, R. and P. Cohen, *The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth*. Mol Genet Metab, 2005. **86**(1-2): p. 84-90.
151. Monzavi, R. and P. Cohen, *IGFs and IGFBPs: role in health and disease*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2002. **16**(3): p. 433-47.
152. Collett-Solberg, P.F. and P. Cohen, *Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system*. Endocrine, 2000. **12**(2): p. 121-36.
153. DeChiara, T.M., A. Efstratiadis, and E.J. Robertson, *A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting*. Nature, 1990. **345**(6270): p. 78-80.
154. Ariel, I., N. de Groot, and A. Hochberg, *Imprinted H19 gene expression in embryogenesis and human cancer: the oncofetal connection*. Am J Med Genet, 2000. **91**(1): p. 46-50.
155. Pachnis, V., A. Belayew, and S.M. Tilghman, *Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(17): p. 5523-7.
156. Poirier, F., et al., *The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo*. Development, 1991. **113**(4): p. 1105-14.
157. Leighton, P.A., et al., *Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice*. Nature, 1995. **375**(6526): p. 34-9.
158. Pfeifer, K., P.A. Leighton, and S.M. Tilghman, *The structural H19 gene is required for transgene imprinting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13876-83.

159. Petry, C.J., et al., *Common polymorphism in H19 associated with birthweight and cord blood IGF-II levels in humans*. BMC Genet, 2005. **6**: p. 22.
160. Naimeh, L.G., et al., *Ontogeny of the H19 gene in sheep and effect of maternal fasting on its expression in the fetus*. Endocr Res, 2001. **27**(4): p. 417-31.
161. Kaffer, C.R., A. Grinberg, and K. Pfeifer, *Regulatory mechanisms at the mouse Igf2/H19 locus*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(23): p. 8189-96.
162. Kaffer, C.R., et al., *A transcriptional insulator at the imprinted H19/Igf2 locus*. Genes Dev, 2000. **14**(15): p. 1908-19.
163. Zemel, S., M.S. Bartolomei, and S.M. Tilghman, *Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2*. Nat Genet, 1992. **2**(1): p. 61-5.
164. Thorvaldsen, J.L., K.L. Duran, and M.S. Bartolomei, *Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3693-702.
165. Bell, A.C. and G. Felsenfeld, *Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 482-5.
166. Kanduri, C., et al., *Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive*. Curr Biol, 2000. **10**(14): p. 853-6.
167. Szabo, P., et al., *Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function*. Curr Biol, 2000. **10**(10): p. 607-10.
168. Kurukuti, S., et al., *CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10684-9.
169. Leighton, P.A., et al., *An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression*. Genes Dev, 1995. **9**(17): p. 2079-89.
170. Srivastava, M., et al., *H19 and Igf2 monoallelic expression is regulated in two distinct ways by a shared cis acting regulatory region upstream of H19*. Genes Dev, 2000. **14**(10): p. 1186-95.

171. Waterland, R.A. and R.L. Jirtle, *Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases*. Nutrition, 2004. **20**(1): p. 63-8.
172. Rees, W.D., et al., *Maternal protein deficiency causes hypermethylation of DNA in the livers of rat fetuses*. J Nutr, 2000. **130**(7): p. 1821-6.
173. Doherty, A.S., et al., *Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo*. Biol Reprod, 2000. **62**(6): p. 1526-35.
174. Ain, R., L.N. Canham, and M.J. Soares, *Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway*. J Endocrinol, 2005. **185**(2): p. 253-63.
175. Thomassin, H., et al., *Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development*. EMBO J, 2001. **20**(8): p. 1974-83.
176. McMinn, J., et al., *Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction*. Placenta, 2006. **27**(6-7): p. 540-9.
177. Steinhoff, C., et al., *Expression profile and transcription factor binding site exploration of imprinted genes in human and mouse*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 144.
178. Pidoux, G., et al., *Large variability of trophoblast gene expression within and between human normal term placentae*. Placenta, 2004. **25**(5): p. 469-73.
179. Zaravinos, A., J. Bizakis, and D.A. Spandidos, *Prevalence of human papilloma virus and human herpes virus types 1-7 in human nasal polyposis*. J Med Virol, 2009. **81**(9): p. 1613-9.
180. Ulaner, G.A., et al., *Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(5): p. 535-49.
181. Weisenberger, D.J., et al., *Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(21): p. 6823-36.
182. Price, S.M., et al., *The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria*. J Med Genet, 1999. **36**(11): p. 837-42.

183. Hark, A.T., et al., *CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 486-9.
184. Gabory, A., et al., *H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice*. Development, 2009. **136**(20): p. 3413-21.
185. Guo, L., et al., *Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae*. Dev Biol, 2008. **320**(1): p. 79-91.
186. Antonazzo, P., et al., *Placental IGF2 expression in normal and intrauterine growth restricted (IUGR) pregnancies*. Placenta, 2008. **29**(1): p. 99-101.
187. Sibley, C.P., et al., *Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8204-8.
188. DiPlas, A.I., et al., *Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas*. Epigenetics, 2009. **4**(4): p. 235-40.
189. Yu, L., et al., *The H19 gene imprinting in normal pregnancy and preeclampsia*. Placenta, 2009. **30**(5): p. 443-7.
190. Kim, S.J., et al., *Altered imprinting, promoter usage, and expression of insulin-like growth factor-II gene in gestational trophoblastic diseases*. Gynecol Oncol, 2003. **88**(3): p. 411-8.
191. Murphy, S.K., et al., *Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(4): p. 283-92.
192. el-Naggar, A.K., et al., *Frequent loss of imprinting at the IGF2 and H19 genes in head and neck squamous carcinoma*. Oncogene, 1999. **18**(50): p. 7063-9.
193. Bourque, D.K., et al., *Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia*. Placenta, 2010. **31**(3): p. 197-202.
194. Abu-Amero, S., et al., *The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome*. J Med Genet, 2008. **45**(4): p. 193-9.
195. Cui, H., et al., *Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6442-6.

196. Houseman, E.A., et al., *Model-based clustering of DNA methylation array data: a recursive-partitioning algorithm for high-dimensional data arising as a mixture of beta distributions*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 365.
197. Constancia, M., G. Kelsey, and W. Reik, *Resourceful imprinting*. Nature, 2004. **432**(7013): p. 53-7.
198. Sandovici, I., et al., *Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(13): p. 1569-78.
199. Turan, N., et al., *Inter- and intra-individual variation in allele-specific DNA methylation and gene expression in children conceived using assisted reproductive technology*. PLoS Genet, 2010. **6**(7): p. e1001033.
200. Yuen, R.K., et al., *Human placental-specific epipolymorphism and its association with adverse pregnancy outcomes*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7389.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1^η ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

Koukoura O, Sifakis S, Zaravinos A, Apostolidou S, Jones A, Hajjioannou J, Widschwendter M, Spandidos D. Hypomethylation along with increased *H19* expression in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Placenta* 2011;32(1):51-7

Hypomethylation along with increased *H19* expression in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction.

Ourania Koukoura¹, Stavros Sifakis¹, Apostolos Zaravinos², Sophia Apostolidou³, Allison Jones³, Jiannis Hajjioannou¹, Martin Widschwendter³, Demetrios A. Spandidos².

¹Department of Obstetrics & Gynaecology, University Hospital of Heraklion, Crete Greece

²Laboratory of Clinical Virology, University of Crete, Heraklion, Greece

³Institute for Women's Health, University College London, United Kingdom

ABSTRACT

The expression of imprinted genes is regulated by epigenetic modifications, such as DNA methylation. Many imprinted genes are expressed in the placenta and affect nutrient transfer capacity of the placental exchange barrier. The *H19* gene is abundantly expressed by the human placenta and is implicated in the pathogenesis of congenital growth disorders such as Beckwith-Wiedemann (BWS) and Silver-Russell (SRS) syndromes. The aim of this study was to investigate the role of DNA methylation on *H19* transcription and imprinting, in the pathophysiology of fetal growth restriction (FGR). Thirty one and 17 placentas from FGR-complicated and normal pregnancies were collected, respectively. We studied gene transcription, genotyping and methylation analysis of the AluI *H19*

on exon 5 polymorphism. Placental expression levels of *H19* were significantly increased in the FGR group. The *H19* mRNA levels were similar between normal placental samples that demonstrated loss and maintenance of imprinting. Placentas from growth-restricted pregnancies had lower methylation levels compared to normals, in the *H19* promoter region. We have demonstrated an increased *H19* transcription in the FGR group of placentas. The hypomethylation of the *H19* promoters is compatible with the aberrant expression. The association of these two findings is reported for the first time in placental tissues, however, its significance remains unknown. Whether the results of this study represent an adaptation of the placenta to hypoperfusion, or they are part of FGR pathophysiology has to be further investigated.

Key Words: Placenta, *H19*, methylation, imprinting, fetal growth restriction

INTRODUCTION

Fetal Growth Restriction (FGR) comprises one of the leading obstetric complications. FGR indicates the presence of a pathophysiologic process occurring in utero that inhibits fetal growth [1]. It is associated with a spectrum of perinatal complications, including fetal morbidity and mortality, iatrogenic prematurity, fetal compromise in labor and cesarean delivery [2]. Placental insufficiency often represents the underlying cause of FGR although current classification systems propose three causative categories: fetal, maternal and uterine-placental factors [3].

Fetal growth is a complex process associated with multiple molecular factors and influenced by several nutritional and endocrine stimuli. A lot of research has been focused on genetic causes which regulate placental and fetal growth [4]. Imprinted genes are recognized to be involved in placental growth, development and function and are therefore considered suitable candidates for a role in FGR [5]. Genomic imprinting is a mechanism by which there is preferential expression of a gene based on the parental origin of the allele [6]. The genetic conflict hypothesis suggests that paternally derived genes influence nutrient acquisition in a way in which more resources are extracted from the mother whereas maternally derived genes balance the nutrient provision to the existing fetus with that of future offspring [7]. Hence maternally expressed genes are more

conservative with regard to resource provision to the fetus [7]. The transcription of imprinted genes represents a phenomenon in which epigenetic mechanisms restrict gene expression through heritable DNA modifications such as cytosine methylation [8].

The *H19* imprinted gene, which is expressed exclusively from the maternal chromosome, produces an untranslated RNA which may have growth suppressing functions [9,10]. *H19* is clustered with the *IGF2* imprinted gene on human chromosome 11p15.5 and share common tissue specific expression patterns. One key factor of imprinting in 11p15 imprinted loci is the genomic methylation within regulatory differentially methylated regions (DMRs), which leads to transcriptional activation or silencing of gene expression. *IGF2* and *H19* transcription is controlled by a specific DMR located upstream of *H19* promoters which is an imprinting control region (ICR). Promoters from both genes compete for the same enhancers which are located downstream of *H19*. Access of the maternal *IGF2* allele to the enhancer, and subsequently transcription, is controlled by the imprinting control region (ICR) [11]. ICR when unmethylated binds to a CCCTC factor (CTCF) which possesses insulator activity and preferentially silences maternal *IGF2* allele while maternal *H19* transcription is allowed by promoter-enhancer interactions [11].

The implication of *H19* with congenital growth syndromes [12] motivated us to examine the *H19* transcription imprinting and epigenetic patterns in placentas deriving from pregnancies complicated with impaired fetal growth in order to investigate a possible role of *H19* in the pathophysiology of FGR. Herein we report the methylation analysis of two different regions which are involved in *IGF2/H19* imprinting aiming to investigate a possible relationship between *H19* function in placentas of growth restricted and normal pregnancies.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

This study was approved by the Research and Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. Informed consent was obtained from all patients. Placentas were obtained after vaginal deliveries or caesarean sections from 31 women with singleton pregnancies that were complicated with FGR and 17 uncomplicated pregnancies. FGR pregnancies were recruited in the immediate

intrapartum period. Birth-weight (BW) was below the 5th percentile (www.gestation.net) and all pregnancies demonstrated sonographic findings of FGR such as reduced fetal size, abnormal Doppler measurements of the umbilical artery, and/or oligohydramnios (data not shown). Gestational age at delivery was determined by the patient's last menstrual period or/and sonographic measurements at 11-14 weeks of gestation. Exclusion criteria were chorioamnionitis as well as chromosomal abnormalities and fetal anatomical defects by the use of antenatal sonogram, fetal karyotyping (in some cases) and clinical evaluation after delivery. Control placentas were obtained from pregnancies with healthy appropriate-for-gestational-age term neonates with (BW)>10th percentile and no other pregnancy complications. Biopsy specimens were collected from 6 different locations between the decidual and chorionic plates in order to limit tissue heterogeneity [13]. Each sample contained the deciduas basalis and villous placenta. Areas involving gross calcifications or infarcts were avoided. Care was taken by visual examination and dissection to minimize contamination from fetal membranes or maternal deciduas. Three fragments from each placenta were thoroughly washed in phosphate-buffered 0.9% saline to minimize blood contamination and then snap-frozen and stored at -80°C for further treatment. Baseline demographic characteristics and medical history information (maternal weight, height, age, parity, smoking, mode of delivery, pregnancy complications, fetal gender, and BW) were recorded.

DNA and RNA extraction

Genomic DNA was extracted from FGR and normal placentas using 0.1 mg/ml proteinase K (Promega, Madison, WI) and subsequently, the phenol/chloroform protocol, as previously described [14]. For total RNA, tissue specimens were homogenized in TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) using a power homogenizer, followed by the addition of chloroform and centrifugation. Total RNA was precipitated from the supernatant with isopropanol, washed with 75% ethanol and resuspended in 50 µl DEPC-treated water. Total RNA was treated with DNase I before the reverse transcription reaction to avoid genomic DNA contamination. RNA and DNA concentration was calculated after the 260-nm absorbance and 260/280-nm absorbance ratio was measured on a UV spectrophotometer (Hitachi Instruments Inc., USA).

Reverse transcription and real-time PCR

Reverse transcription reactions for the preparation of first-strand cDNA from 2 µg of total RNA were performed using the “reverse transcription system” according to the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI). Real-time PCR reactions were carried out on a Mx3000P thermal cycler (Stratagene, La Jolla, CA) using SYBR® Green I Master Mix (Stratagene, Greece) according to the manufacturer's instructions. The primer pairs were designed to span at least one intron in order to avoid amplification of contaminating genomic DNA along with the cDNA (Table 1). After initial denaturation at 95 °C for 10 min, samples were subjected to 40 amplification cycles comprised of denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 65 °C–67 °C for 30 sec and elongation at 72 °C for 30 sec, followed by a melt curve analysis in which the temperature was increased from 55 to 95 °C at a linear rate of 0.2 °C/sec. Negative controls were included in each PCR reaction, one with no cDNA template and one with no reverse transcription treatment. Normalized transcription levels were calculated for each pathological or normal sample using the following formula: normalized sample or Control = $(1+E_{GOI})^{-\Delta Ct} / (1+E_{GAPDH})^{-\Delta Ct}$.

Genotyping of *H19* polymorphism

Genotypes of FGR and control tissues for one potential *H19* polymorphism were determined by PCR of genomic DNA as previously described [15]. Briefly, PCR reactions were performed in a total volume of 25 µl containing 5 µM of 5x Green GoTaq® Reaction Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 0.6 units of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Madison) and 200 ng of genomic DNA or cDNA. PCR conditions were 95 °C for 90 s, followed by 29 cycles of 95 °C for 25 s and optimal annealing temperature for 1 min, and finally 72 °C for 10 min. Optimal annealing temperatures for the primer pair were: H19-10248/10423, 67 °C. The PCR products were examined by electrophoresis on a 3% agarose gel and photographed on a UV transilluminator. Determination of the polymorphism required restriction enzyme digestion (Alu I). Four-five µg of PCR products was mixed with 20-30 units of the appropriate enzyme (Promega, Madison) in a total volume of 20 µl, and digested at 37 °C for ~6 h. Products were electrophoresed on 3% agarose and photographed on an

ultraviolet light transilluminator. The threshold for scoring a sample as LOI was a ratio of less than 5:1 between the more abundant and less abundant alleles. In general, samples with LOI demonstrated a ratio of 1:1 to 2:1 between expressed alleles.

Analysis of DNA Methylation

Sodium bisulfite conversion (Zymo Research, Berlin, Germany) and MethyLight analysis (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom; Metabion, Munich Germany) were performed as previously described [16,17]. Briefly two sets of primers and probes, designed specifically for bisulfite-converted DNA, have been used: a methylated set for the gene of interest and a reference set (COL2A1) to normalize for input DNA. Specificity of the reactions for methylated DNA was confirmed separately using Sssl (New England Biolabs, Ipswich, MA) treated human white blood cell DNA (heavily methylated). The percentage of fully methylated molecules at a specific locus was calculated by dividing the GENE:COL2A1 ratio of a sample by the GENE:COL2A1 ratio of the Sssl-treated human white blood cell DNA and multiplied by 100. The abbreviation PMR (Percentage of Methylated Reference) indicates this measurement. The analysis was performed blinded and cases and controls were randomly mixed for bisulfite treatment and real-time PCR. The concentration of bisulfite-modified DNA (assessed by the level of the reference gene COL2A1) was the same between FGR cases and controls.

Each MethyLight reaction, at a specific locus, covered on average 5–7 CpG dinucleotides. A detailed list of primer and probes for all analyzed loci is provided in Table 1. In order to validate the MethyLight measurements we used four serial 4-fold dilutions in triplicate, ranging from 250-3.9, in order to construct standard curves. Standard deviation ranged from 0.07-0.1. The slopes of the standard curve lines ranged from -3.29 to -3.33, whereas linearity was almost 1 (0.9997-1.000). All samples were treated in duplicate and the mean PMR value between the 2 measurements was chosen. The standard deviation of the H19 PMR values was 0.122, making the assay markedly sensitive in detecting small differences in methylation between the groups.

Statistical analysis

Mean values and standard deviations were calculated for continuous parameters. Data were presented as percentages in case of categorical variables. The distribution of continuous characteristics within two groups of individuals was compared using the non-parametric Wilcoxon rank-sum test. The potential association between categorical variables was examined by the chi-square test. The Spearman's rank correlation coefficient was estimated to assess the potential monotonic relationship between various continuous variables. Moreover, the association between mRNA or Percentage of Methylated Reference (PMR) values (independent variables) and characteristics of the study participants (for instance, BW or gestational age) was modelled using linear regression analysis. All tests of significance were two-sided and a P-value less than 0.05 declares significance. Statistical analysis was performed using SPSS 17 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL)

RESULTS

Sample characteristics

We analysed 31 placental samples from FGR-complicated pregnancies and 17 samples from normal pregnancies. BW was below the 5th percentile in all FGR pregnancies, with 90% of them being severely growth restricted, below the 3rd percentile. BW was between the 10th and 90th percentile in the control group. The percentiles were calculated based on individually customized fetal and BW percentile method (www.gestation.net). FGR cases and controls were compared in respect to baseline characteristics and outcome. The distributions of maternal age, weight, BMI, fetal gender, parity and smoking were well balanced between the two groups. As expected, there were significant differences between gestational age, BW and BW percentiles in FGR subjects versus controls. Baseline characteristics of the study are presented in Table 2.

Clinical and genetic follow up evaluation

In order to investigate the presence of Silver-Russell Syndrome (SRS) (18) or a late manifestation of other chromosomal disorders or genetic syndromes in the children who were born as growth restricted by the women recruited in this study, a follow up evaluation was carried out. In particular, all the children were examined by a team of a Paediatrician and a Clinical Geneticist 43 to 65 months

after birth. The Price et al. (19) diagnostic criteria for SRS were used: birth weight below or equal to -2 SD from the mean; poor postnatal growth below or equal to -2 SD from the mean at diagnosis; preservation of occipitofrontal head circumference; classic facial phenotype; and asymmetry. None of the children demonstrated phenotypic characteristics of SRS nor presented with a phenotype indicative of an obvious chromosomal disorder or genetic syndrome, at the age of 3.6 to 5.2 years (median 4.3 years).

Imprinting analysis of H19 in placental tissues

One *H19* exon 5 polymorphism was evaluated in this study which involved the creation of a restriction enzyme site. PCR of genomic DNA with specific primers (Table 1), followed by restriction digestion, allowed the determination of informative samples (Figure 1). RT-PCR of total RNA allowed for analysis of expressed alleles. Fourteen out of 31 (45%) FGR and 8 out of 17 control samples (47%) were informative for *H19*. Imprinting analysis of *H19* heterozygote is presented in Table 3. Of the 21 informative cases, LOI was shown in 5 specimens, 4 of which were control samples and 1 FGR (Figure 1). Maintenance of imprinting (MOI) of *H19* was demonstrated in 13 FGR and 4 control specimens.

Increased H19 expression in placentas complicated with FGR

We examined transcription of *H19* in FGR and control placentas. The mRNA levels of the *H19* transcript, were obtained after standardisation with quantitative data from the *GAPDH* “housekeeping” gene. Placental expression levels of *H19* were significantly increased in the FGR group ($P=0.04$) (Figure 2a). When a linear regression analysis was employed that included covariates such as BW, centiles and gestational age, there was no evidence of a relationship between *H19* expression with any of the parameters such as fetal growth, maternal characteristics or severity of FGR. *H19* expression remained unaffected by gestational age, as shown in Figure 2b. Interestingly *H19* mRNA levels were similar between normal placental samples that demonstrated biallelic and monoallelic expression of the *H19* gene ($P=0.7$).

DNA methylation patterns in FGR placentas

A MethyLight qPCR assay was developed to determine the methylation status of regions that control *H19* transcription. We measured the Percentage of Methylated Reference (PMR) of two different potential DMR's. Methylation status of a region from 6156 to 6245 bp upstream of the *H19* transcription start site was examined (Figure 3a). The particular site contains the sixth of seven of CTCF-binding sites and coordinates *IGF2* and *H19* reciprocal expression [11]. Compared with methylation values of normal placentas, placentas from growth restricted pregnancies had lower PMR, with mean values of 36.2% and 27.4% ($P=0.15$) (Figure 2c). There was no correlation between *H19* mRNA levels and methylation values in all of the placentas included in the study. *H19* PMR measurements of the specific region were also not associated with BW centiles ($P=0.52$), BW ($P=0.73$) nor gestational age ($P=0.8$) in linear regression analysis.

The region from 7705 to 7809 bp close to the *H19* promoter was also assessed with respect to the methylation status (Figure 3a). Samples from growth restricted pregnancies displayed significantly lower methylation levels compared to normal placentas with mean values of 22.3% and 32.4% respectively ($P=0.02$) (Figure 2d). There was no correlation between *H19* expression and methylation profile of this region. Linear regression analysis did not reveal any association between methylation levels and BW centiles ($P=0.08$), BW ($P=0.33$) and gestational age ($p=0.52$).

We compared mean methylation values between four normal placental samples with retained imprinting and four samples with relaxed imprinting. Our analysis showed that samples with normal imprinting of *H19* had higher but not significant methylation values of the CTCF binding region, than those with LOI (71% vs 32% respectively, $P=0.43$). However when compared, methylation values of the *H19* promoter, there was no difference between the two groups (46.3% samples with LOI, 44.2% samples with MOI, $P=0.93$).

DISCUSSION

The *H19* gene is one of the first imprinted genes studied [20]. Although *H19* codes an untranslated RNA of yet unknown biological significance it is abundantly expressed by the human intermediate trophoblasts and cytotrophoblasts [21]. Deletion of *H19* in mice resulted in increased placental size [22]. *H19* expression is modified during the different stages of placental growth based on a strict

program which favours biallelic expression [23]. However there is hardly any data regarding *H19* expression and imprinting in late pregnancy. The epigenetic mechanisms which are involved in *H19* function in trophoblastic tissues are also obscure. The aim of this study was to investigate the role of DNA methylation of two separate regions which control *H19* expression and imprinting, and to evaluate a possible involvement in the pathophysiology of FGR.

Placentas obtained from FGR-affected pregnancies demonstrated increased *H19* expression in our study. To the best of our knowledge this is a novel finding, with yet undetermined importance. Although Guo et al. reported an increased trend of *H19* mRNA levels in the small for gestational age placentas that they have studied, this difference was not significant [24]. Experimental data in mice have linked increased *H19* expression with postnatal growth reduction [10]. It is difficult however to correlate *H19* expression with intrauterine growth restriction due to the established high variety of *H19* transcription patterns among different tissues [25]. Even if evidence exists that associates *H19* transcription with other placental abnormalities such as gestational trophoblastic disease, no definite conclusions can be drawn for the exact role of *H19* expression on placental function and fetal growth. In addition, it should be noted that the increased expression of *H19* in the FGR group was due to the abnormally high levels in some particular cases (Figure 2a). This may have weakened the significance of the obtained results, and further investigation is required to confirm the findings of our study and to elucidate their implication in the pathogenesis of FGR. Hypomethylation at distal chromosome 11p15 represents a major cause of SRS, which is characterized by severe intrauterine growth retardation. The possibility, however, that the cases with increased *H19* expression were associated with this condition was excluded after a clinical follow up 3.6 to 5.2 years (median 4.3 years) after birth.

Compared to previous studies, a significant amount of samples demonstrated LOI in our study. However, only one out of the 14 FGR informative samples revealed relaxed imprinting while 4 out of 8 normal informative samples presented with such an event. The preservation of the monoallelic gene expression in normal placentas [23,24] along with the report of a high prevalence of LOI in preeclampsia affected placentas [23], are two observations that are not compatible with our findings. However Guo et al reported only one case of growth

affected placenta with LOI, among five informative samples that they have studied [24]. Since imprinting is a dynamic process that evolves during placental development, further investigation is clearly needed in order to elucidate the role of H19 imprinting on placental abnormalities.

Levels of H19 mRNA were similar, between normal placentas with relaxed or retained imprinting. This finding is inconsistent with several studies on cancer which advocate an increase in imprinted gene transcription whenever there is biallelic expression [26,27]. However, others postulate that in many cases, imprinting and gene transcription are not directly associated and that probably different mechanisms exist that mediate the two [28]. The same conclusion has been drawn from studies that focused their analysis on imprinted gene expression in placental tissues [29]. Our results are in agreement to those by Yu et al who found no correlation between imprinting defects and H19 expression in placentas from preeclamptic patients [23]. The authors of that study propose a possible association between LOI of H19 and abnormal trophoblast invasion that predisposes to preeclampsia. Their conclusion represents an attractive hypothesis that correlates H19 function with several pregnancy complications related to placental pathology, including FGR.

Several studies have suggested that the regulation of gene imprinting in the placenta is not subject to epigenetic mechanisms as in other tissues [30,31]. They concluded that histone modifications rather than DNA methylation are essential for gene imprinting in the placenta. In our study we have evaluated the methylation patterns of the ICR domain and at the *H19* promoter region. ICR hypomethylation is thought to be responsible for the low birth weight and poor post-natal growth observed in SRS patients [11]. Although PMR values were lower in the FGR group, in both DMRs studied statistical difference was shown only in the H19 promoter region. Methylation levels in the FGR placentas were lower in the CTCF binding site associated with SRS; however, the difference was not significant. Mean PMR values in the FGR group are similar to those reported by Bourque et al in the same region, 27.4% and 30.8%, respectively [32].

Hypomethylation of the H19 promoter region has been shown in the FGR group. Hypomethylation of the H19 promoter has been detected in all stages of normal placental development [21]. Reduced methylation levels at the same region were also reported in small for gestational age placentas. Hypomethylation

in the promoter region of a gene is generally associated with increased gene expression. Hence the reduced PMR values in the FGR group that we have found is in consistency with the increased *H19* mRNA levels. There was no correlation, however, between PMR and mRNA levels.

We have detected lower but no statistically significant methylation values in the ICR domain in the placentas from the FGR group. Hypomethylation of that site is present in approximately one third of patients with SRS which is associated with postnatal growth restriction [12]. None of the children, who were born as growth restricted by the women recruited in this study, demonstrated phenotypic characteristics of SRS. The theory on *IGF2-H19* imprinting postulates that non-methylated ICR binds to CTCF, insulating the *IGF2* promoter from the enhancers and allowing the *H19* promoter to access them. *H19* is then transcribed while *IGF2* is not (Figure 3b). Based on that theory, the reduced trend in methylation values of the ICR that we have found in the FGR samples matches the increased *H19* transcription in the same samples. Bourquet et al. established a significant reduction in methylation levels of the ICR in intrauterine growth restricted placentas [32]. Based on those results and since ICR is controlling the expression of both *H19* and *IGF2* genes which are known growth modulators, we conclude that aberrant methylation in the ICR represents a potential link between epigenetic modifications and abnormal fetal and placental growth.

Aberrant methylation patterns have been traditionally associated with imprinting defects. Based on that observation we have investigated whether samples that demonstrated relaxed imprinting, had also altered methylation patterns. There was a reduced trend in PMR values of the ICR domain in the group of normal placentas with LOI but with no statistical significance. PMR levels were similar in the DMR of the *H19* promoter. Considering the limited number of samples from the same group of placentas that demonstrated imprinting defects, no speculation can be extracted from our results.

A broad range of PMR values were shown in the placentas of both groups examined in this study (Figure 2c & 2d). This large variation has also been found by other investigators [33], probably suggesting that DNA methylation differences can be established during development [34]. An interindividual variation in DNA-methylation level is widespread in the human genome. In particular, the placenta has been reported to present high variability in overall DNA methylation compared

to other tissues [35], probably in response to its role in mediating the conflicting demands of mother and fetus [36]. Moreover, DNA methylation variation at the imprinted genes IGF2/H19 has been shown [37,38], but also a high degree of interindividual differences in DNA methylation for other genes in the human placenta has been reported [39]. The nature of this variation as well as the biological significance it may have in human phenotypic variation, placental development and fetal growth requires further elucidation.

In this study, placentas from the third trimester FGR and normal pregnancies were examined. However, the absence of gestational age-match of cases and controls (Table 2) that would offer more appropriate groups for comparison should be noted. There are no data from the literature to show that placental H19 remains constant during the late gestational period. Despite this drawback, several conclusions can be drawn and also several questions can be raised from this study. The increased H19 transcription in the FGR placentas is a finding that is compatible with its known implication in postnatal growth restricted syndromes. The hypomethylation of the H19 promoters is in accordance with the increased expression in the FGR placentas. However, whether these two events represent the component of a molecular mechanism which leads to FGR or merely the consequence of placental dysfunction is unknown. Since DNA methylation and imprinting are particularly susceptible to environmental changes, imprinted genes may respond to placental hypoperfusion, by activating altered imprinting and methylation programs. Evidence provided from the present study may serve as a stimulus for larger studies that will elucidate the role of H19 in intrauterine growth restriction.

Acknowledgements

We wish to thank Dr Dimitrios Koutroulakis for his valuable contribution in tissue sampling and data collection and also Dr Victor Gourvas and Dr Efterpi Dalpa for their technical assistance. This work was supported by a grant awarded by the Hellenic Society of Obstetrics and Gynecology.

REFERENCES

1. Hokken-Koelega ACS. Intrauterine growth retardation. *Int Growth onitor* 2001; 11: 2–8.

2. Mari G, Hanif F: Intrauterine growth restriction: how to manage and when to deliver. *Clin Obstet Gynecol* 2007; **50**: 497-509.
3. Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega AC, et al. International Small for Gestational Age Advisory Board: International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 2003; **111**: 1253-1261.
4. Randhawa RS: The insulin-like growth factor system and fetal growth restriction. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008; **6**: 235-240.
5. Steinhoff C, Paulsen M, Kielbasa S, Walter J, Vingron M: Expression profile and transcription factor binding site exploration of imprinted genes in human and mouse. *BMC Genomics* 2009; **10**: 144.
6. Efstratiadis A: Parental imprinting of autosomal mammalian genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994; **4**: 265-280.
7. Moore T, Haig D: Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 1991; **7**: 45-49.
8. Srivastava M, Frolova E, Rottinghaus B, et al: Imprint control element-mediated secondary methylation imprints at the Igf2/H19 locus. *J Biol Chem* 2003; **278**: 5977-5983.
9. Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B: Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 1993; **365**: 764-767.
10. Gabory A, Ripoche MA, Le Digarcher A, et al: H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development* 2009; **136**: 3413-3421.
11. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM: CTCF mediates methylation-sensitive enhancer blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 2000; **405**: 486-489.
12. Abu-Amero S, Monk D, Frost J, Preece M, Stanier P, Moore GE: The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2008; **45**:193-199.
13. Pidoux G, Gerbaud P, Laurendeau I, et al: Large variability of trophoblast gene expression within and between human normal term placentae. *Placenta* 2004; **25**: 469-473.

14. Zaravinos A, Bizakis J, Spandidos DA: Prevalence of human papilloma virus and human herpes virus types 1-7 in human nasal polyposis. *J Med Virol* 2009; **81**: 1613-1619.
15. Ulaner GA, Vu TH, Li T, et al: Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 535-549.
16. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, et al: Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: 6823-6826.
17. Widschwendter M, Fiegler H, Egle D, et al: Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007; **39**: 157-158.
18. OMIM. 2010. Online Mendelian Inheritance in Man, 180860, Silver-Russell syndrome; SRS
19. Price SM, Stanhope R, Garrett C, Preece MA, Trembath RC: The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J Med Genet* 1999; **36**: 837-842
20. Zhang Y, Tycko B: Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet* 1992; **1**: 40-44.
21. Jinno Y, Ikeda Y, Yun K, et al: Establishment of functional imprinting of the H19 gene in human developing placentae. *Nat Genet* 1995; **10**: 318-324
22. Esquiliano DR, Guo W, Liang L, Dikkes P, Lopez MF. Placental glycogen stores are increased in mice with H19 null mutations but not in those with insulin or IGF type 1 receptor mutations. *Placenta* 2009; **30**: 693-9
23. Yu L, Chen M, Zhao D, et al: The H19 gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 2009; **30**: 443-447.
24. Guo L, Choufani S, Ferreira J, et al: Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol* 2008; **320**: 79-91.
25. Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M: Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res* 2006; **65** Suppl 3: 50-58.
26. Kim SJ, Park SE, Lee C, et al: Alterations in promoter usage and expression levels of insulin-like growth factor-II and H19 genes in cervical carcinoma exhibiting biallelic expression of IGF-II. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1586**: 307-315

27. Cai YC, Yang GY, Nie Y, et al: Molecular alterations of p73 in human esophageal squamous cell carcinomas: loss of heterozygosity occurs frequently; loss of imprinting and elevation of p73 expression may be related to defective p53. *Carcinogenesis (Lond.)* 2000; **21**: 683–689.
28. Murphy SK, Huang Z, Wen Y, et al: Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2006; **4**: 283-292.
29. Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, et al: Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics* 2009; **4**: 235-240.
30. Lewis A, Mitsuya K., Umlauf D, et al: Imprinting on distal chromosome 7 in the placenta involves repressive histone methylation independent of DNA methylation. *Nat Genet* 2004; **36**: 1291–1295.
31. Caspary T, Cleary MA, Baker CC, Guan XJ, Tilghman SM: Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 3466–3474.
32. Bourque DK, Avila L, Peñaherrera M, von Dadelszen P, Robinson WP. Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia. *Placenta* 2010; **31**:197-202
33. Csepregi A, Ebert MP, Röcken C, et al. Promoter methylation of CDKN2A and lack of p16 expression characterize patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2010; **10**: 317.
34. Flanagan JM, Popendikyte V, Pozdniakovaite N, et al. Intra- and interindividual epigenetic variation in human germ cells. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 67–84.
35. Houseman EA, Christensen BC, Yeh RF, et al. Model-based clustering of DNA methylation array data: a recursive-partitioning algorithm for high-dimensional data arising as a mixture of beta distributions. *BMC Bioinformatics* 2008; **9**: 365.
36. Constancia M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature* 2004; **432**: 53–57.
37. Sandovici I, Leppert M, Hawk PR, Suarez A, Linares Y, Sapienza C. Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 1569-1578.

38. Turan N, Katari S, Gerson LF, et al. Inter- and intra-individual variation in allele-specific DNA methylation and gene expression in children conceived using assisted reproductive technology. PLoS Genet 2010; **6**: e1001033.

39. Yuen RK, Avila L, Peñaherrera MS, et al. Human placental-specific epipolymorphism and its association with adverse pregnancy outcomes. PLoS One 2009; **4**: e7389.

Table 1: PCR primers used in the study. Primers and Probe sequences for MethyLight used in the study.

PCR Primer			
Primer	Sequence (5' to 3')		Optimal annealing temperature
H19-10248	CTT TAC AAC CAC TGC ACT ACC TGA C		67 °C
H19-10423	GAT GGT GTC TTT GAT GTT GGG CTG A		
MethyLight Primers			
HUGO Gene Nomenclature	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence	Probe Oligo Sequence
H19 (AF087017) upstream region 5962-6413	5'- CGGAATTGGTTGT AGTTGTGGAAT-3'	5'- ACCCAATTAAAAC GAACTCGAA-3'	6FAM- CGCGGCGGTAGTGTAG GTTTATATA-BHQ-1
H19 (AF087017) promoter region 7574-7959	5'- AGATAGGAAAGT GGTTGCGAATG-3'	5'- TAAGTTCGGTTAATT GGATGGGAA-3'	6FAM- TTGCGGAAATCGCGGT GACGAG-BHQ-1

Table 2: Baseline characteristics *

	FGR N=31	CONTROL N=17	P value
Maternal age (y)	29 ± 6 6.074449	27.8 ± 4.9	0.6657 [#]
Weight (kgr)	62.9 ± 10.4	61.1 ± 10.3	0.3906 [#]
BMI (kgr/m ²)	22.6 ± 3.5	23.5 ± 3.7	0.5092 [#]
Smoking	21.4%	28.6%	0.608 ⁺
Parity Nulliparous	61.3%	52.9%	0.338 ⁺

Gestational age at delivery (wk)	35.4 ± 4.5	39.3 ± 0.9	0.0001 [#]
Birth Weight kgr	1775.2 ± 710.9	3389.4 ± 473.4	0.0000 [#]
Fetal Gender Males	40%	35.3%	0.750 ⁺
Centiles	0.8 ± 1.5	49.8 ± 9.6	0.0000 [#]

*Data presented as mean ±SD or percentage

⁺Chi-square test for categorical data.

[#]Two-sample Wilcoxon rank-sum test

Table 3: Allelic expression of H19 gene.

Placental	Case Numbers		
	Loss of imprinting of H19	gDNA	cDNA
IUGR	72	A/B	A/B
Control	102	A/B	A/B
Control	82	A/B	A/B
Control	85	A/B	A/B
Control	122	A/B	A/B
	Maintenance of imprinting of H19		
IUGR	7	A/B	A
Control	66	A/B	B
Control	87	A/B	A
IUGR	96	A/B	A
IUGR	97	A/B	A
Control	118	A/B	A
IUGR	1	A/B	A
IUGR	19	A/B	A
IUGR	25	A/B	B
IUGR	31	A/B	B
IUGR	37	A/B	A
IUGR	40	A/B	A
IUGR	64	A/B	A
IUGR	78	A/B	A
IUGR	95	A/B	A
IUGR	100	A/B	B
Control	113	A/B	B

Figure 1:

A H19 polymorphism studied (Alu I at bp 10378). Schematic of exons 4 and 5. Locations of PCR primers are indicated by numbered arrows.

B Genotyping analysis is presented in the gDNA figures. Representative samples of A homozygotes, B homozygotes, and A/B heterozygotes are shown. cDNA figures show the results of allelic expression analysis. Representative samples of H19 LOI. The PCR primers for the H19 Alu I polymorphism cross an intron, and thus products from cDNA are smaller than those from genomic DNA.

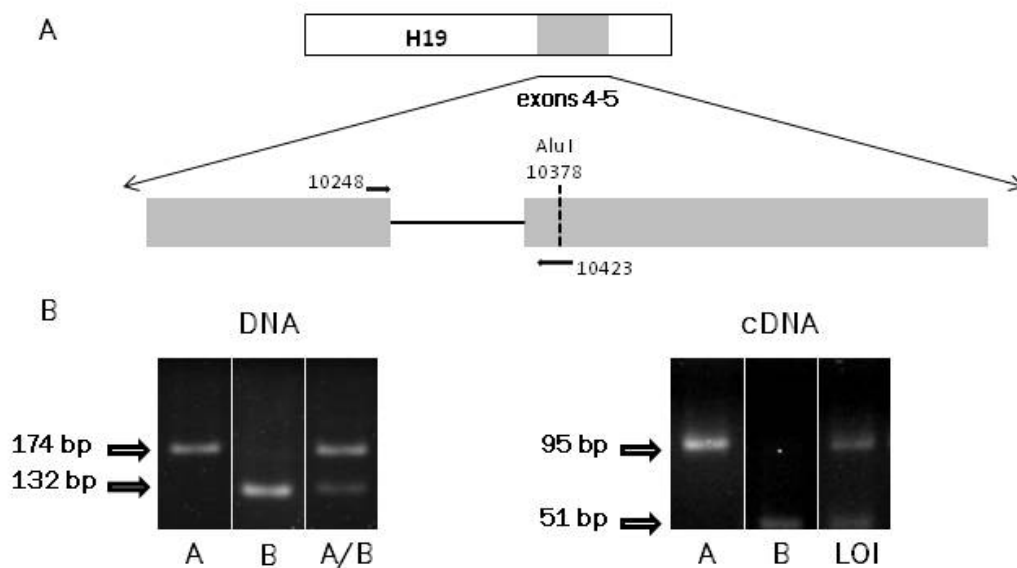


Figure 2. A. Relative *H19* mRNA levels in placentae vs. gestational age. *H19* mRNA levels in placentae are demonstrated for each individual case. Control samples are shown as squares and FGR cases are shown as diamonds. There was no significant correlation between *H19* expression and gestational age.

B. Scatter plot depicting the increased *H19* mRNA levels in FGR placentas vs. controls ($p=0.04$). Solid diamonds and rectangles represent samples with LOI

C. PMR values of the DMR region ranging from 6156-6245 bp upstream of the *H19* transcription start site.

D. PMR values of the DMR region ranging from 7705-7809 bp upstream of the *H19* transcription start site. FGR samples displayed significantly lower PMR levels vs. the normal placentas ($p=0.02$).

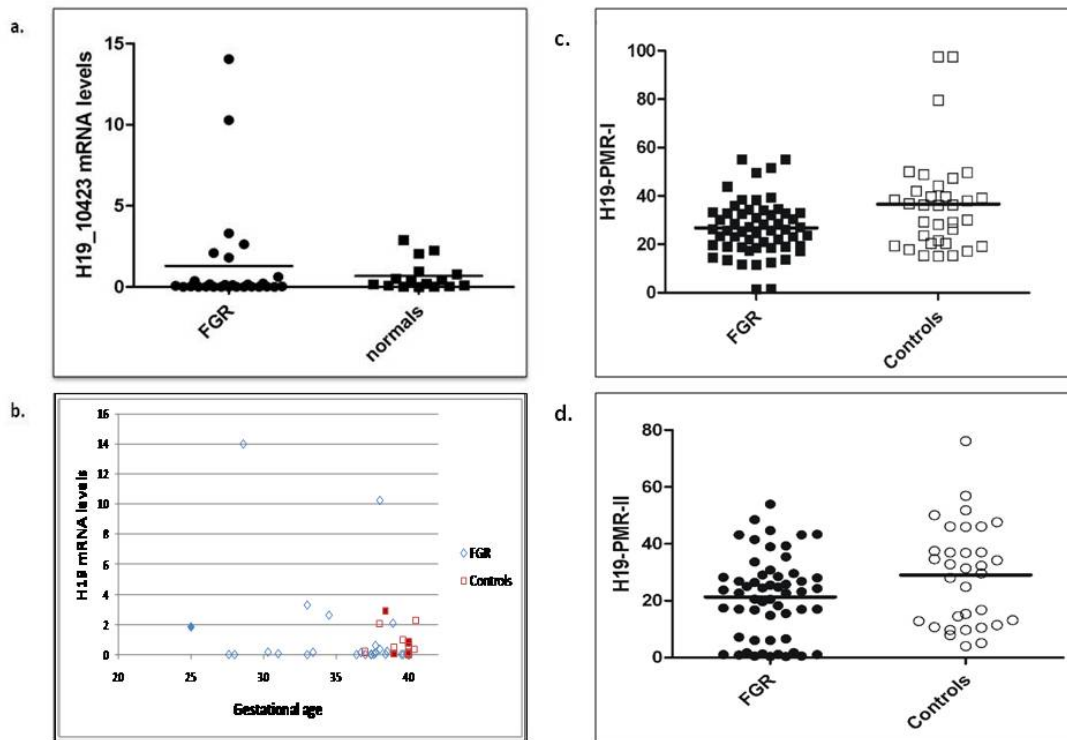
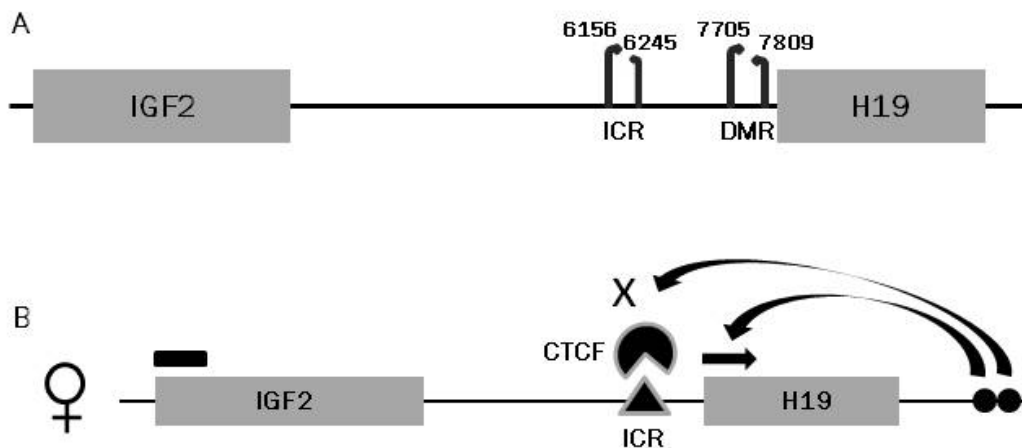


Figure 3:

A: Location of PCR primers used are indicated by numbered arrows. Two different DMRs were examined. H19 upstream region from base 6156 to 6245 which represent the ICR of the IGF2/H19 imprinting cluster and the H19 promoter region from base 7705 to 7809.

B. Schematic of reciprocal imprinting of the IGF2/H19 imprinting cluster. On the maternal chromosome, the non-methylated ICR (solid triangle) binds to the CTCF insulating the *IGF2* promoter from the enhancers located downstream of *H19* (solid circles) and allowing the H19 promoter unimpeded access to the enhancers. Maternal *H19* is subsequently transcribed. Black arrow indicates transcription.



Έχει υποβληθεί στο American Journal of Obstetrics and Gynecology

LOSS OF IMPRINTING AND ABERRANT METHYLATION OF IGF2 IN PLACENTAS FROM PREGNANCIES COMPLICATED WITH FETAL GROWTH RESTRICTION

Ourania Koukoura¹, Stavros Sifakis¹, Giannoula Soufla², Apostolos Zaravinos², Sophia Apostolidou³, Allison Jones³, Martin Widschwendter³, Demetrios A. Spandidos².

1 Obstetrics Gynaecology Department University Hospital of Heraklion Crete Greece

2 Laboratory of Clinical Virology University of Heraklion Crete Greece

3 Institute for Women's Health, University College London, United Kingdom

ABSTRACT

Problem: We investigated the hypothesis that the altered epigenetic mechanisms that regulate *IGF2* imprinting in placentas from fetal growth

restricted (FGR) pregnancies, affect *IGF2* expression leading to impaired fetal growth.

Method of study: We studied gene transcription, genotyping and the methylation patterns of *IGF2* from 31 and 17 placentas from FGR-complicated and normal pregnancies respectively.

Results: A statistically significant decrease of *IGF2* mRNA levels was observed in the placentas from FGR pregnancies. Loss of imprinting (LOI) was only detected in the abnormal placentas. The evaluation of the percentage of Methylated Reference (PMR) of two different potentially Differentially Methylated Regions (DMR) demonstrated significant PMR values in both sites for normal and FGR pregnancies with no significant differences.

Conclusions: Our results suggest the involvement of the *IGF2* imprinted gene in placental function and fetal growth and the possible association of epigenetic alterations with the pathophysiology of FGR.

Key Words: methylation, imprinting, *IGF2*, placenta, fetal growth restriction, epigenetics

INTRODUCTION

It has long been appreciated that fetal growth restriction (FGR) is not a single disorder, but instead has various causes¹. Three causative categories have been proposed: fetal, maternal and uterine-placental factors^{1,2}. Placental dysfunction ranks high among the most common causes of FGR. Although numerous placental histopathological changes have been described, little is known about the precise etiology and the contribution of placental genes in this disorder^{3,4}.

Imprinted genes are known to be involved in regulating placental growth and function and are therefore considered to be suitable candidates for a role in FGR development^{5,6}. Genomic imprinting is the preferential silencing of one copy of an autosomal gene while the other copy is expressed⁷. This parent-of-origin-specific expression is regulated by epigenetic modifications, such as DNA methylation. A large proportion of imprinted genes is expressed in the placenta and affects nutrient transfer capacity of the placental exchange barrier⁸. Imprinted genes that are paternally expressed (maternally imprinted) promote

growth of the fetus, whilst maternally expressed (paternally imprinted) genes act as growth suppressors to ensure the appropriate allocation of limited maternal resources to each offspring⁹. Insulin-like Growth Factor 2 (*IGF2*) and *H19* represent two oppositely expressed genes located adjacent to each other at 11p15.5 that share the same transcription regulatory epigenetic mechanisms¹⁰. *IGF2* is highly expressed in mouse and human placenta and affects both the functional capacity of the placenta to transfer nutrients to the fetus and the placental size^{11,12}. It is expressed in most tissues only from the paternal allele, with the maternal allele being transcriptionally silent.

Imprinting occurs primarily by allelic-specific methylation of cytosines in areas of DNA that are rich in CpG dinucleotides¹³. In most human tissues the imprinting of *IGF2* depends on a differentially methylated region (DMR) which is located upstream of *H19* promoters¹⁴. This region functions as a methylation-sensitive insulator that binds to a CCCTC factor (CTCF) on the unmethylated maternal allele preventing the interaction of *IGF2* with the enhancer located downstream of *H19*, and partitioning the two alleles into transcriptionally 'silent' and 'active'^{13,15}. Two regions of allele-specific methylation also exist within the human *IGF2*. The region spanning exons 2 and 3 is homologous to the mouse *dmr0* and another region within exon 9 is similar to mouse *dmr2*⁵.

IGF2 has been linked with pre- and postnatal growth syndromes such as Beckwith-Wiedemann (BWS, OMIM 130650)¹⁶. Loss of methylation of the *IGF2/H19* imprinted region with low expression of the *IGF2* gene has been identified as a major cause of Silver-Russell disorder, a syndromic intrauterine growth retardation condition¹⁷. *IGF2* expression is characterised by a delicate epigenetic regulation through several promoters exhibiting developmental-dependent expression patterns¹⁸. Aberrant DNA methylation which can modify imprinted gene expression may provide an attractive mechanism linking environmental causes to placental insufficiency and subsequently to the development of intrauterine growth restriction. To investigate the role of the imprinted *IGF2* in the pathogenesis of FGR, we aimed to determine whether altered *IGF2* expression correlated with relaxed imprinting in FGR placentas. We also examined the epigenetic profiles of the *IGF2/H19* domain in these tissues to determine whether deregulated methylation status correlated with *IGF2* transcription and potential imprinting deregulation. We postulated that altered

epigenetic mechanisms may affect *IGF2* imprinting and deregulate their expression leading to FGR.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

This study was approved by the Research and Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion, Crete, Greece. Informed consent was obtained from all patients. Placentas were obtained after vaginal deliveries or caesarean sections from 31 women with singleton pregnancies that were complicated with FGR, as well as from 17 normal pregnancies. The FGR pregnancies were recruited in the immediate intrapartum period. The estimated fetal weight was below the 5th percentile and all pregnancies demonstrated sonographic findings of FGR such as reduced fetal size, abnormal Doppler measurements of the umbilical artery, and/or oligohydramnios (data not shown). Exclusion criteria were multiple pregnancy, chorioamnionitis, chromosomal abnormalities and fetal anatomical defects. Control placentas were obtained from pregnancies with healthy appropriate-for-gestational-age term neonates with birthweight (BW) between 10th and 90th percentile and no other pregnancy complications. Biopsy specimens were collected from six various locations between the decidual and chorionic plates in order to limit tissue heterogeneity¹⁹. Each sample contained the deciduas basalis and villous placenta. Areas involving calcification or infarcts were avoided. Three fragments from each placenta were thoroughly washed in phosphate-buffered 0.9% saline to minimize blood contamination and then snap-frozen and stored at -80°C for further treatment. Baseline demographic characteristics and medical history information (maternal weight, height, age, parity, smoking, mode of delivery, pregnancy complications, fetal gender, and BW) were recorded. Gestational age at delivery was determined by the mother's last menstrual cycle and/or sonographic measurements at 11-14 weeks of gestation.

DNA and RNA extraction

Genomic DNA was extracted from FGR and normal placentas using 0.1 mg/ml proteinase K (Promega, Madison, WI) and, subsequently, the phenol/chloroform protocol, as previously described²⁰. For total RNA, tissue specimens were homogenized in TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) using a power

homogenizer, followed by the addition of chloroform and centrifugation. Total RNA was precipitated from the supernatant with isopropanol, washed with 75% ethanol and resuspended in 50 µl DEPC-treated water. RNA and DNA concentration was calculated after the 260-nm absorbance measured on a UV spectrophotometer (Hitachi Instruments Inc., USA). The 260/280-nm absorbance ratio was ~1.8-2.0 for all samples. Five µl of RNA were also electrophoresed in a 2% agarose gel in order to verify the RNA integrity.

Reverse transcription and real-time PCR

Reverse transcription reactions for the preparation of first-strand cDNA from 2 µg of total RNA were performed using the “reverse transcription system” according to the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI), followed by DNase treatment in order to ensure avoidance of genomic DNA contamination. Real-time PCR reactions were carried out on a Mx3000P thermal cycler (Stratagene, La Jolla, CA) using SYBR® Green I Master Mix (Stratagene, Greece) according to the manufacturer's instructions. The set of primers used in the study is listed in table 1²¹. After initial denaturation at 95 °C for 10 min, samples were subjected to 40 amplification cycles comprising denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing at 65 °C for 30 sec and elongation at 72 °C for 30 sec, followed by a melt curve analysis in which the temperature was increased from 55 to 95 °C at a linear rate of 0.2 °C/sec. Negative controls were included in each PCR reaction, one with no cDNA template and one with no reverse transcription treatment. Normalized transcription levels were calculated for each pathological or normal sample using the formula: normalized sample or Control = $(1+E_{GOI})^{-\Delta Ct} / (1+E_{GAPDH})^{-\Delta Ct}$.

Genotyping of IGF2 polymorphisms

Genotypes of FGR and control tissues were determined by PCR of genomic DNA as previously described²¹. Briefly, PCR reactions were performed in a total volume of 25 µl containing 5 µM of 5x Green GoTaq® Reaction Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 0.6 units of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Madison) and 200 ng of genomic DNA or cDNA. PCR conditions were 95 °C for 90 s, followed by 29 cycles of 95 °C for 25 s and optimal annealing temperature for 1 min, and finally 72 °C for 10 min. Optimal annealing temperatures was 65 °C. The PCR products were examined by electrophoresis on a

3% agarose gel and photographed on a UV transilluminator. Determination of the IGF2 exon 9 bp 819 polymorphism required restriction enzyme digestion with Apa I. Four-five µg of PCR products were mixed with 20-30 units of the appropriate enzyme (Promega, Madison) in a total volume of 20 µl, and digested at 37 °C for ~6 h. Products were electrophoresed on 3% agarose and photographed on a UV transilluminator.

Analysis of DNA Methylation

Sodium bisulfite conversion (Zymo Research, Berlin, Germany) and MethyLight analysis (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom; Metabion, Munich Germany) were performed as previously described²². Each MethyLight reaction, at a specific locus, covered on average 5–7 CpG dinucleotides. A detailed list of primer and probes for all analyzed loci is provided in Table 1. Briefly two sets of primers and probes, designed specifically for bisulfite-converted DNA, have been used: a methylated set for the gene of interest and a reference set (COL2A1) to normalize for input DNA. Specificity of the reactions for methylated DNA was confirmed separately using Sssl (New England Biolabs; www.newenglandbiolabs.co.uk) treated human white blood cell DNA (heavily methylated). The percentage of fully methylated molecules at a specific locus were calculated by dividing the GENE:COL2A1 ratio of a sample by the GENE:COL2A1 ratio of the Sssl-treated human white blood cell DNA and multiplied by 100. The abbreviation PMR (Percentage of Methylated Reference) indicates this measurement. The analysis was performed blinded and cases and controls were randomly mixed for bisulfite treatment and real-time PCR. The concentration of bisulfite modified DNA (assessed by the level of the reference gene COL2A1) was the same between cases and controls.

Statistical analysis

Mean values and standard deviations were calculated for continuous parameters. Data were presented as percentages in case of categorical variables. The distribution of continuous characteristics within two groups of individuals was compared using the non-parametric Wilcoxon rank-sum test. The potential association between categorical variables was examined by the chi-square test. The Spearman's rank correlation coefficient was estimated to assess the

potential monotonic relationship between various continuous variables. Moreover, the association between mRNA or Percentage of Methylated Reference (PMR) values (independent variables) and characteristics of the study participants (for instance, birth weight or gestational age) was modelled using linear regression analysis. All tests of significance were two-sided and a P-value less than 0.05 declares significance. Statistical analysis was performed using SPSS 17 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL)

RESULTS

Sample characteristics

We analysed 31 placental samples from FGR-complicated pregnancies and 17 samples from normal pregnancies. BW was below the 5th percentile in all FGR pregnancies, with almost 90% of them being below the 3rd percentile. The percentiles were calculated based on individually customized fetal and BW percentile method (www.gestation.net). FGR cases and controls were compared with respect to baseline characteristics and outcome. The distributions of maternal age, weight, BMI, fetal gender, parity and smoking were well balanced between the two groups (data not shown). As expected, there were significant differences between gestational age, BW and BW percentiles in FGR subjects versus controls.

Imprinting analysis of *IGF2* in placental tissues

Exon 9 *IGF2* polymorphism, which involved the creation of a restriction enzyme site, was evaluated in this study. PCR of genomic DNA with specific primers (Table 1), followed by restriction digestion, determined the informative samples. RT-PCR of total RNA allowed for the analysis of the expressed alleles. In total, 16 out of 31 placental FGR samples and 9 out of 17 control placentas were informative (heterozygous) for *IGF2* (Table 2). In a total of 25 informative cases, LOI was shown in 9 specimens, all of which were FGR samples (Figure 1). Normal placentas did not reveal a biallelic expression of *IGF2*. Therefore, a statistically significant difference in the incidence of LOI of *IGF2* was demonstrated between FGR and control placentas (P=0.02). The remaining 16 informative samples of *IGF2* revealed maintenance of imprinting (MOI) in 7 FGR and 9 control samples.

Quantitative analysis of the *IGF2* gene.

We tested the expression levels of *IGF2* in FGR and control placentas. *IGF2* transcripts derived from FGR placentas were down-regulated compared to controls ($P=0.01$) (Figure 2a). A linear regression analysis did not reveal a relationship between *IGF2* expression and any of the covariates including BW percentile, gestational age at birth, and maternal characteristics.

In order to examine the effect of imprinting defects on expression, we also examined the relative expression of *IGF2* in samples that demonstrated aberrant imprinting patterns. Hence, we tested whether there were different mRNA levels in placentas with a biallelic expression of *IGF2*, compared to those that maintained the imprinting status. Nine FGR samples that demonstrated LOI for *IGF2* showed decreased mRNA expression compared to FGR samples that maintained the imprinting pattern; however, this decrease was not significant.

DNA methylation patterns in FGR placentas

We measured the Percentage of Methylated Reference (PMR) of two different potential DMR's (Figure 3). *IGF2* exon 2/3 region from base 65545 to 65682 was evaluated in order to determine the methylation patterns of our samples. FGR placentas demonstrated lower methylation references compared to controls, with mean PMR values of 23.3% and 29.6%, respectively, a difference that was marginally significant ($P=0.05$) (Figure 2b). Methylation levels of the *IGF2* promoter did not correlate with gene expression. Additionally, as shown in linear regression analysis, *IGF2* PMR values were not associated with BW percentiles ($P=0.17$), BW ($P=0.14$) and gestational age ($P=0.2$). We extended our methylation analysis to the subset of samples that demonstrated LOI for *IGF2* compared to those that maintained monoallelic gene expression. The two groups showed similar methylation values (22.9% vs. 22.8%, respectively).

Methylation status of the region spanning from 6156 to 6245 bp upstream of the *H19* transcription start site, which contains CTCF-binding sites²³, was also assessed (Figure 3). Compared with methylation values of the normal placentas, those from growth-restricted pregnancies had lower PMR, (mean value 27.4% vs. 36.2%, $P=0.15$) (Figure 2c). *H19* PMR measurements of the specific region were not associated with BW percentiles ($P=0.52$), BW ($P=0.73$) or gestational age ($P=0.8$) in linear regression analysis. Since methylation of this site controls *IGF2*

transcription we investigated the impact of methylation on *IGF2* mRNA levels. No correlation was noted between the *H19* DMR methylation levels and *IGF2* expression. Samples with LOI for *IGF2* had higher PMR values compared to those with MOI with mean values of 31.3% and 26.1%, respectively. This difference did not reach statistical significance (P=0.84).

DISCUSSION

In the present study we investigated the epigenetic characteristics of the *IGF2/H19* imprinted domain in FGR placentas in the context of altered *IGF2* expression and imprinting. Alterations in the methylation profile of specific regions within the *IGF2/H19* imprinted domain were detected. We verified the already reported reduced *IGF2* expression in growth-restricted placentas. Interestingly a high prevalence of LOI was only noted in the placentas associated with FGR. However, there was a lack of correlation between these two events. Our results highlight the importance of the human chromosome 11p15.5 imprinting cluster in fetal and placental growth and the possible association of epigenetic alterations with the pathophysiology of FGR.

Our results are consistent with previously reported human and animal studies demonstrating a reduced *IGF2* mRNA level in placentas from pregnancies with FGR^{6,24}. *IGF2* underexpression results in a reduction of all placental layers and affects the diffusional properties of the placenta²⁵. Modulation of placental transfer capacity directly affects fetal growth. Guo et al. (2008) advocated a correlation between the relative *IGF2* expression and BW percentile²⁴. We were not able to reproduce this observation since there was no association between *IGF2* expression and FGR severity in our study.

The biallelic expression of *IGF2* was established exclusively in FGR samples while none of the control placentas exhibited LOI. Similar conclusions have been drawn in the study by Yu et al (2009) who evaluated the imprinting status of *H19* in normal and preeclamptic placentas²⁶. LOI of *H19* has been observed only in preeclamptic placentas and was correlated with the severity of the disease²⁶. Similarly, relaxation of the *IGF2* imprinting was demonstrated in tissues with gestational trophoblastic disease unlikely to the normal placentas²⁷. Since LOI was also established in the affected placentas in our study, we hypothesize that relaxed *IGF2* imprinting might correlate with placental

dysfunction which represents a component of the original pathogenetic process of FGR.

Fetal growth restricted samples that displayed LOI had similar *IGF2* mRNA levels compared to those with normal imprinting. This observation implies that there is probably no correlation between *IGF2* expression and the imprinting profile in the placenta. Diplas et al (2009) concluded that even if a correlation between imprinted genes and the pathophysiology of FGR is present, it appears that mechanisms other than “imprinting” contribute to altered gene transcription²⁸. Studies on cancer have been also shown that, although LOI may be the initiate step of tumorigenesis, there is no obvious correlation between imprinting relaxation and expression patterns in cancer cells²⁹.

The model of reciprocal *IGF2* and *H19* expression predicts that the DMR upstream of *H19*, which harbors sequences known to bind to the zinc finger protein CTCF, if methylated in both alleles would result to a biallelic expression of *IGF2*²³ (Figure 4). Our methylation analysis included the region located upstream of the *H19* promoters.(Figure 3) Control and FGR samples demonstrated similar methylation values (36.2% vs 27.4) with corresponds to what has already been reported in FGR as well as in control placentas in this region^{24,30}. There was no correlation between the PMR values of the specific DMR region that we have detected, and the *IGF2* mRNA values.

In order to investigate a possible correlation between methylation levels in the imprinting control region upstream of the locus *H19* and imprinting defects, we compared 9 tissues from the FGR group with LOI and 8 with MOI based on their PMR values. Samples with relaxed imprinting had comparable PMR values compared to those with MOI (31.3 vs. 26.1%). Increased methylation levels in the placentas with imprinting defects would agree with the above-mentioned model of *H19* DMR methylation controlling *IGF2* imprinting.(Figure 4) Since we did not demonstrate such a difference, no definite conclusions can be drawn regarding the association of *IGF2* imprinting status and methylation patterns in placentas; thus, this event warrants further investigation.

Similarly the difference noted in the *IGF2* PMR values between FGR placentas and controls, was marginally significant. (23.3 vs. 29.6%, $p=0.05$). Aberrant methylation of this site has been linked with imprinting defects in cancerous as well as in normal tissues²⁹. Other investigators postulated that the

human DMRO is a methylation-dependent insulator that may regulate *IGF2* expression independently of the *H19* DMR³¹. Since LOI results from failure of the cell to maintain monoallelic expression and can be associated with hypomethylation, we speculated that the reduced trend of *IGF2* DMR PMR levels is attributed to the high prevalence of samples with imprinting defects in the FGR group. However, methylation levels of *IGF2* DMR in the FGR samples that demonstrated either LOI or MOI in *IGF2* were similar.

Guo et al (2008) reported on the hypomethylation of *IGF2* DMR2 in exon 9 in placentas from SGA neonates, but normal methylation values in the *H19* DMR for the same group²⁴. There is no obvious explanation as to why samples with LOI had similar methylation levels in the *IGF2* DMR to those with MOI. Since *IGF2* DMR methylation patterns are reported to be tissue-specific⁵, more data are needed to investigate these findings.

Several conclusions can be drawn and also several questions can be raised from this study. Whether the observed *IGF2* down-regulation is a causative factor of FGR or merely a consequence of placental dysfunction remains unexplained. An abnormal biallelic expression of imprinted genes in placentas is a finding that has been reported in cases of abnormal placentation such as preeclampsia and gestational trophoblastic disease^{26,27}. We hypothesize that in FGR cases the placenta responds to chronic hypoperfusion by activating a program of gene expression via genomic imprinting. *IGF2* LOI may represent an effort made by the placenta to compensate its reduced functional capacity by leading to a biallelic production of a potent growth factor. The direct effect of *IGF2* imprinting in placental tissues is not yet clear.

Our results showed a possible relationship between aberrant DNA methylation and imprinting relaxation that might be associated with FGR. Our study is consolidated by the relatively high number of severely affected placentas studied. Although we did not include placental weights and histopathological findings, it would be interesting to examine the possible correlation of the above with imprinted gene expression in placental tissues and in umbilical cord blood. Given the complexity of imprinted gene regulation, more studies are needed on the role of imprinted genes in human placenta pathology and its involvement in fetal growth disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Dr Dimitrios Koutroulakis for his valuable contribution in tissue sampling and data collection and also George Nikolopoulos for his assistance with the statistical analysis. This work was supported by a grant awarded by the Hellenic Society of Obstetrics and Gynecology.

REFERENCES

1. Lee PA, Chernausek SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 2003;111:1253-1261.
2. Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev* 2006;27:141-169.
3. Sitras V, Paulssen R, Leirvik J, Vårtun A, Acharya G. Placental gene expression profile in intrauterine growth restriction due to placental insufficiency. *Reprod Sci* 2009;16:701-711.
4. Struwe E, Berzl G, Schild R, Blessing H, Drexel L, Hauck B, Tzschoppe A, Weidinger M, Sachs M, Scheler C, et al (2009) Microarray analysis of placental tissue in intrauterine growth restriction. *Clin. Endocrinol*, DOI 10.1111/j.1365-2265.2009.03659.x
5. Monk D, Sanches R, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Abu-Amero S, Murrell A, Friess H, Reik W, Stanier P, et al. Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum Mol Genet* 2006;15:1259-1269.
6. McMinn J, Wei M, Schupf N, Cusmai J, Johnson EB, Smith AC, Weksberg R, Thaker HM, Tycko B. Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006;27:540-549.
7. Efstratiadis A. Parental imprinting of autosomal mammalian genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4: 265-280.
8. Apostolidou S, Abu-Amero S, O'Donoghue K, Frost J, Olafsdottir O, Chavele KM, Whittaker JC, Loughna P, Stanier P, Moore GE. Elevated placental expression of

the imprinted PHLDA2 gene is associated with low birth weight. *J Mol Med* 2007;85:379-387.

9. Tycko B and Morison IM. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol* 2002;192:245-258.

10. Steinhoff C, Paulsen M, Kielbasa S, Walter J, Vingron M (2009) Expression profile and transcription factor binding site exploration of imprinted genes in human and mouse. *BMC Genomics* 2009;10:144.

11. Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:50-58.

12. Randhawa R and Cohen P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Mol Genet Metab* 2005;86:84-90.

13. Constancia M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature* 2004;432:53-57.

14. Engemann S, Strödicke M, Paulsen M, Franck O, Reinhardt R, Lane N, Reik W, Walter J. Sequence and functional comparison in the Beckwith-Wiedemann region: implications for a novel imprinting centre and extended imprinting. *Hum Mol Genet* 2000;9: 2691-2706.

15. Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenko V, Reik W, Ohlsson R. Ctf binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:10684-10689.

16. Schneid H, Seurin D, Vazquez MP, Gourmelen M, Cabrol S, Le Bouc Y. Parental allele specific methylation of the human insulin-like growth factor II gene and Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 1993;30:353-362.

17. Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet.* 2005;37:1003-1007.

18. Brice AL, Cheetham JE, Bolton VN, Hill NC, Schofield PN. Temporal changes in the expression of the insulin-like growth factor II gene associated with tissue maturation in the human fetus. *Development* 1989;106:543-554.

19. Pidoux G, Gerbaud P, Laurendeau I, Guibourdenche J, Bertin G, Vidaud M, Evain-Brion D, Frenco JL. Large variability of trophoblast gene expression within and between human normal term placentae. *Placenta* 2004;25:469-473.
20. Zaravinos A, Bizakis J, Spandidos DA. Prevalence of human papilloma virus and human herpes virus types 1-7 in human nasal polyposis. *J Med Virol* 2009;81:1613-1619.
21. Ulaner GA, Vu TH, Li T, Hu JF, Yao XM, Yang Y, Gorlick R, Meyers P, Healey J, Ladanyi M, et al. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Hum Mol Genet* 2003;12:535-549.
22. Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M, Laird PW. Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6823-6826.
23. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 2000;405:486-489.
24. Guo L, Choufani S, Ferreira J, Smith A, Chitayat D, Shuman C, Uxa R, Keating S, Kingdom J, Weksberg R. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol* 2008;320:79-91.
25. Sibley CP, Coan PM, Ferguson-Smith AC, Dean W, Hughes J, Smith P, Reik W, Burton GJ, Fowden AL, Constância M. Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8204-8208.
26. Yu L, Chen M, Zhao D, Yi P, Lu L, Han J, Zheng X, Zhou Y, Li L. The H19 gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 2009;30:443-447.
27. Kim SJ, Park SE, Lee C, Lee SY, Kim IH, An HJ, Oh YK. Altered imprinting, promoter usage, and expression of insulin-like growth factor-II gene in gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol* 2003;88:411-418.
28. Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, Sperling R, Lee YL, Wetmur J, Chen J. Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics* 2009;4:235-240.
29. Murphy SK, Huang Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR, Nichols TD, Marks JR, Berchuck A. Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and

elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. Mol Cancer Res 2006;4:283-292.

30. Bourque DK, Avila L, Peñaherrera M, von Dadelszen P, Robinson WP. Decreased Placental Methylation at the H19/IGF2 Imprinting Control Region is Associated with Normotensive Intrauterine Growth Restriction but not Preeclampsia. Placenta 2010;31:197-202.

31. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. Cancer Res. 2002;62:6442-6446.

TABLES

Table 1: PCR primers used in the study. Primers and Probe sequences for MethyLight used in the study.

PCR Primer			
Primer	Sequence (5' to 3')		Optimal annealing temperature
IGF2-758	CTT GGA CTT T(G/T)A GTC AAA TTG GC		65°C
IGF2-857	GCG GTA CGA GCG ACG TGC CCA C		
MethyLight Primers			
HUGO Gene Nomenclature	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence	Probe Oligo Sequence
IGF2 (AC006408) 65759-64972	5'- TCGTAGTTTTTGGAT AGTGGATAAAGAG-3'	5'- CCAAAACACCCCCTACTT TAATAATAAC-3'	6FAM- TTTTTTCGAAATTGTTTGGACGATGATTT GTC-BHQ-1
H19 (AF087017) upstream region 5962-6413	5'- CGGAATTGGTTGTAG TTGTGGAAT-3'	5'- ACCCCAATTTAAAACGAAC TCGAA-3'	6FAM- CGCGGCGGTAGTGTAGGTTTATATA- BHQ-1

Table 2: Allelic expression of IGF2

Placental samples	Case numbers	gDNA	cDNA
Loss of imprinting of IGF2			
FGR	10	A/B	A/B
FGR	13	A/B	A/B
FGR	16	A/B	A/B
FGR	22	A/B	A/B
FGR	25	A/B	A/B
FGR	37	A/B	A/B
FGR	43	A/B	A/B
FGR	48	A/B	A/B
FGR	98	A/B	A/B
Maintenance of imprinting of IGF2			
FGR	7	A/B	A
FGR	50	A/B	B
Control	58	B	
FGR	62	B	
Control	66	A/B	A
Control	75	A/B	B
FGR	76	B	
Control	79	A/B	A
Control	87	A/B	B
Control	88	A	
FGR	96	A/B	B
FGR	97	A/B	A
FGR	99	A/B	A
Control	102	A/B	A
Control	118	A	
Control	128	A/B	A

Figure 1: Genotyping and imprinting of the IGF2 gene in the placenta. Representative samples of *IGF2* LOI. Upper gel indicates representative samples of *Apal*-digested PCR products for genotyping of IGF2. Heterozygous cases were labeled with A/B, which were considered as informative. Lower gel indicates representative samples of *Apal*-digested RT-PCR products for imprinting status analysis. Loss of imprinting was demonstrated in sample labeled A/B.

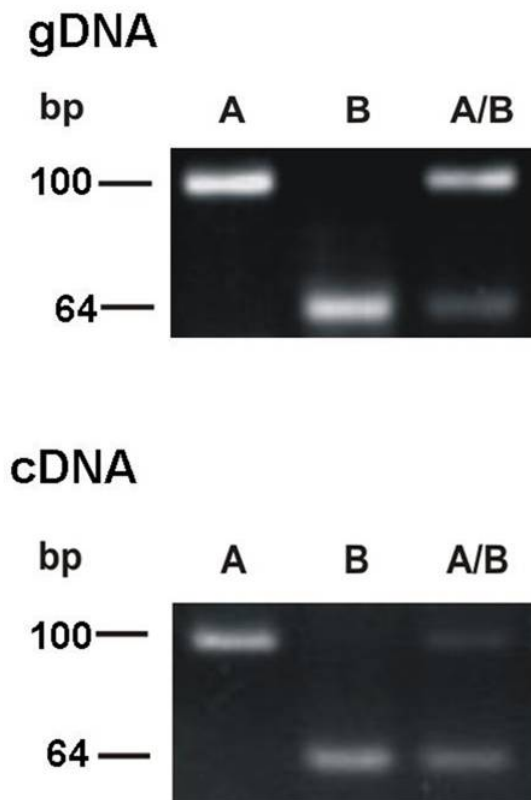


Figure 2: A. *IGF2* transcripts derived from FGR placentas were significantly down-regulated compared to controls ($P=0.01$). Mean values with SEM are depicted. **B.** Percentage of Methylated Reference (PMR) values in the *IGF2* exon 2/3 region. FGR samples demonstrated lower methylation values than normals ($P=0.05$). Bars indicate mean values and SEM. **C.** Percentage of Methylated Reference (PMR) values in the *H19* transcription start site. Bars indicate mean values and SEM. P-values are indicated.

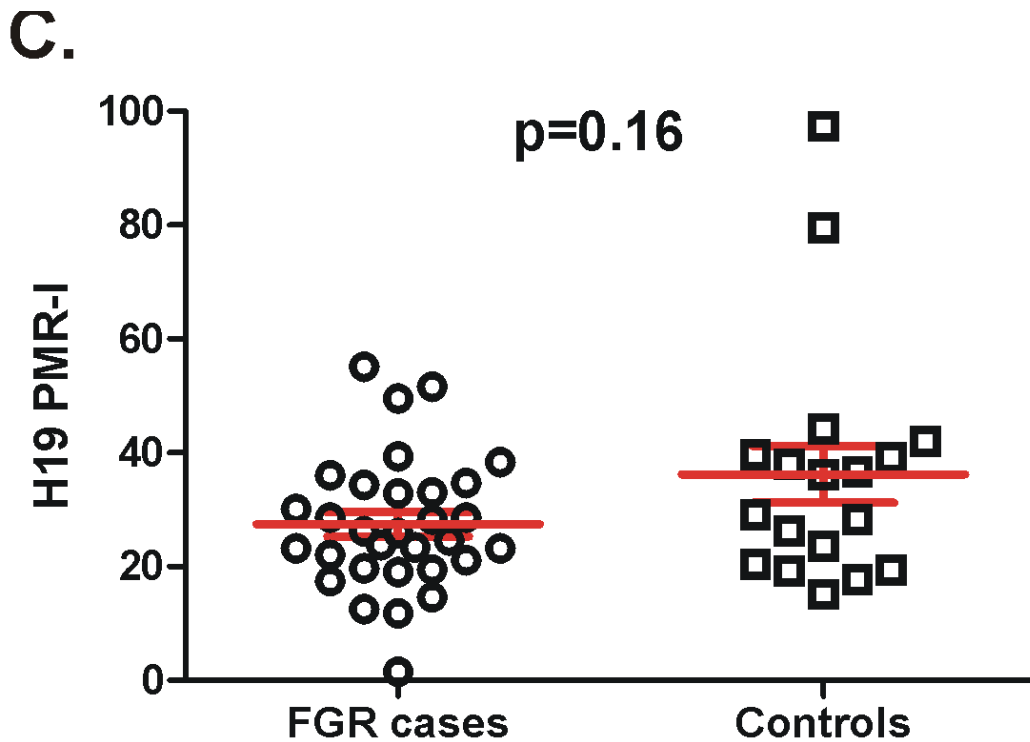


Figure 3: *IGF2/H19* imprinted cluster. Black vertical bars indicate *IGF2* exons. Location of PCR primers used, are indicated by numbered parentheses. Detailed view of the sequence is presented between brackets. CpG dinucleotide locations are underlined

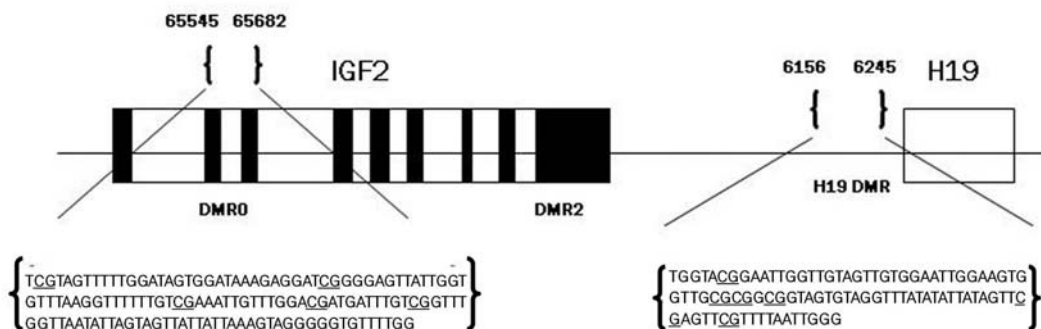


Figure 4: Schematic representation of the imprinted regulation of *IGF2/H19* cluster. Maternal and paternal chromosomes are indicated. Vertical black bars represent exons from the expressed allele; red vertical bars represent exons from the silenced allele. Black arrows show the direction of transcription (white arrows, active transcription from *IGF2* P0, P2, P3, P4 and *H19*

promoter; black arrow, non-imprinted P1 *IGF2* promoter). Ovals represent enhancers. Arrowed lines represent enhancer activity. Three known Differentially Methylated Regions (DMR) are presented as sets of triangles. Solid triangles represent methylated DMRs and clear triangles represent unmethylated regions. DMR upstream *H19* harbors the binding sites for CTCF. Methylation of this region on the paternal chromosome prevents binding with CTCF and allows the *IGF2* promoter to assess enhancers located downstream *H19*. *IGF2* is subsequently transcribed. On the maternal chromosome the non-methylated *H19* DMR is bound to CTCF insulating the *IGF2* promoter from the 3' enhancers and allowing the *H19* promoter unimpeded access to the enhancers. Maternal *H19* is subsequently transcribed. There are also differentially *IGF2*-methylated regions (DMR0, DMR2). DMR0 is methylated on the maternal allele. Although DMR at exon 9 is methylated in the paternal allele, this region most likely represents a site of tissue-specific methylation which is not involved in *IGF2* imprinting.

