

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δήμητρα Κάππου

Ειδ. Ιατρός Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Ο ρόλος της παθολογικής αγγειογένεσης του πλακούντα στην εκδήλωση ενδομήτριας καθυστέρησης της εμβρυικής ανάπτυξης σχετιζόμενης ή μη με προεκλαμψία. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Ang-1, Ang-2 και των υποδοχέων τους Tie-1 και Tie-2 και του γονιδίου PlGF και του υποδοχέα του sFlt-1 σε πλακούντες από παθολογικές κυήσεις.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΠΑΝΤΩΝΙΟΥ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΟΥ

ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ 2016

ΑΘΗΝΑ

Στους γονείς μου Ιωάννη και Αλεξάνδρα,

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
Ευχαριστίες	5
Βιογραφικό	7
Περίληψη	23
Summary	25
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Πλακούντας: δομή και λειτουργία	28
2. Ο ρόλος της αγγειογένεσης στον πλακούντα	35
2.1 Αγγειογένεση στον πλακούντα και προεκλαμψία	35
2.2 Αγγειογένεση στον πλακούντα και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης	38
3. Προεκλαμψία	41
3.1 Ορισμός	42
3.2 Παράγοντες κινδύνου και πρόβλεψη προεκλαμψίας	45
4. Ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης	53
4.1 Ορισμοί και παρακολούθηση	56
5. Placental growth factor (PlGF) & sFlt-1	60
6. Αγγειοποιητίνες	67
6.1 Αγγειοποιητίνες και φυσιολογική κύηση	70
6.2 Ο ρόλος των αγγειοποιητινών στις παθολογικές κυήσεις	73
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Εισαγωγή	79

2. Σχεδιασμός	84
3. Εργαστηριακή Ανάλυση	88
4. Στατιστική Ανάλυση	91
5. Αποτελέσματα	92
6. Συζήτηση - Συμπεράσματα	99
7. Βιβλιογραφία	107
8. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά	120
9. Ανακοινώσεις σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια	132

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κλινικής Ιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Δημήτριο Σπαντίδο, την Αν. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Αθηνών κα Αναστασία Κωνσταντινίδου και τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Νικόλαο Παπαντωνίου που αποτέλεσαν τα μέλη της Τριμελούς επιτροπής της παρούσας διατριβής και με βοήθησαν σημαντικά στη εκπόνηση και ολοκλήρωσης της.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Δήμητρα Κάππου

Ειδικευόμενη Ιατρός Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Ημερομηνία γέννησης	28 Ιανουαρίου 1985
Τόπος γέννησης	Μαρούσι , Αττική
Διεύθυνση κατοικίας	Βύρωνος 124, Τ.Κ. 121 37, Αθήνα
Τηλέφωνο Οικίας	210-5738028
Κινητό	6985800945
E-mail	d.kappou@yahoo.com

Α. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑΣ

Σπουδές

- 2002: αποφοίτηση από το 4^ο Ενιαίο Λύκειο Περιστερίου με μέσο όρο 19.2/20 [Άριστα]
- 2002-2008: Πτυχιούχος Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης, με βαθμό 7.3 (Λίαν Καλώς)

Υπηρεσία ως ιατρός

7/2009-7/2010	Υπηρεσία υπαίθρου, Π.Ι. Προφήτη Ηλία, Ν. Ηρακλείου
---------------	--

9/2010-7/2011	Research Fellow in Fetal Medicine Unit at King's College Hospital, NHS trust, London, UK [Honorary Contract of Employment at King's College Hospital and University College Hospital (UCLH)]
7/2011-01/2012	Ειδικότητα στη Γενική Χειρουργική, ΓΝ Παιδών Πεντέλης [προς απόκτηση τίτλου ειδικότητας Μαιευτικής Γυναικολογίας]
04/2012-08/2013	Research Fellow in Fetal Medicine Unit at King's College Hospital, NHS trust, London, UK [Honorary Contract of Employment at King's College Hospital and University College Hospital (UCLH)]
02/2014-έως σήμερα	Ειδικότητα στη Μαιευτική-Γυναικολογία, Α' Πανεπιστημιακή Κλινική, ΓΝ Αλεξάνδρα [προς απόκτηση τίτλου ειδικότητας Μαιευτικής Γυναικολογίας]
05/2016	Clinical Observer in Obstetric Medicine at St Thomas Hospital under the supervision of Professor Catherine Nelson-Piercy

Ιατρική εκπαίδευση

- Σεμινάριο Advanced Life Support in Obstetrics [ALSO] (2009)
- MRCOG part 1, Royal College of Obstetricians and Gynecologists (RCOG), London, UK, 2009
- Πιστοποιητικά Υπερηχογραφίας:
 - *Certificate of Competence in Ultrasound Examination at 11-13⁺⁶ weeks* (Fetal Medicine Foundation, UK)
 - *Certificate of Competence in 18-23 weeks scan* (Fetal Medicine Foundation, UK)
 - *Certificate of Competence in the cervical assessment* (Fetal Medicine Foundation, UK)
 - *Certificate of Competence in the Doppler ultrasound scan* (Fetal Medicine Foundation, UK)

- Μεταπτυχιακό Δίπλωμα "Παθολογία της Κύησης", Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών (2015)

Ξένες γλώσσες

- Αγγλικά [Proficiency Certificate, University of Cambridge]
- Γαλλικά [Delf 1]

Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα

08/2008-08/2009	Επιστημονικός συνεργάτης Μ/Γ Κλινικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης
10/2008-10/2009	Συμμετοχή σε ερευνητικό πρόγραμμα με τίτλο "Λοιμώξεις σε καρκινοπαθείς" στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου [υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σαμώνη] με υποτροφία της Παγκρήτιας Ένωσης Βιοιατρικής Έρευνας

B. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΕΡΓΟΥ

Πλήρεις δημοσιεύσεις σε διεθνή ιατρικά περιοδικά

1	Matalliotakis IM, Cakmak H, Ziogos MD, Kalogeraki A, Karrou D , Arici A. Endometriosis-associated Lyme disease. J Obstet Gynaecol. 2010;30(2):184-6.
2	Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Soufla G, Symvoulakis E, Vassalou E, Lymbouridou R, Samara KD, Karrou D , Spandidos DA, Siafakas NM. Expression analysis of Akt and MAPK signaling pathways in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). J Recept Signal Transduct Res 2010;30(4):262-9.

-
- 3 Sifakis S, Akolekar R, Mantas N, **Kappou D**, Nicolaides KH. Placental Growth Hormone (PGH) at 11-13 weeks in preeclampsia *Hypert Preg* 2011;30(1):74-82

 - 4 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum insulin like growth factor-I (IGF-1) at 11-13 weeks in preeclampsia. *Prenat Diagn* 2010; 30(11): 1026-31.

 - 5 **Kappou D**, Matalliotakis M, Matalliotakis I. Medical treatments for endometriosis. *Minerva Ginecol* 2010;62(5):415-32

 - 6 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum insulin like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) at 11-13 weeks in preeclampsia. *Prenat Diagn* 2011;31(2):196-201.

 - 7 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) at 11-13 weeks in preeclampsia. *J Hum Hypertens* 2012 Apr;26(4):253-8.

 - 8 Hatzaki A, Sifakis S, Apostolopoulou A, Bouzarelou D, Konstantinidou A, **Kappou D**, Sideris A, Tzortzis E, Athanassiadis A, Florentin L, Theodoropoulos P, Makatsoris C, Karadimas C, Velissariou V. FGFR-3 Related Skeletal Dysplasias Diagnosed Prenatally by Ultrasonography and Molecular Analysis: Presentation of 17 Cases. *Am J Med Genet Part A* 2011;155A(10):2426-35.

 - 9 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP-3 at 11-13 weeks in trisomy 21 and trisomy 18 pregnancies. *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol* 2011;157(2):166-8.

 - 10 Matalliotakis I, Cakmak H, Matalliotakis M, **Kappou D**, Arici A. High rate of allergies among women with endometriosis. *J Obstet Gynecol* 2012 Apr;32(3):291-3.

 - 11 Orfanoudaki IM, **Kappou D**, Sifakis S. Recent advances in optical imaging for cervical cancer detection. *Arch Gynecol Obstet* 2011;284(5):1197-208.

 - 12 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum insulin like growth factor (IGF-I) and binding proteins IGFBP-1 and IGFBP-3 at 11-13 weeks' gestation in pregnancies delivering small for gestational age neonates. *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol* 2012 Mar;161(1):30-3.

 - 13 Sifakis S, Manolacos E, Vetro A, **Kappou D**, Peitsidis P, Kontodiou M, Garas A, Vrachnis N, Konstandinidou A, Zuffardi O, Orru S, Papoulidis I. Prenatal diagnosis of Wolf-Hirschhorn syndrome confirmed by comparative genomic hybridization array: report of two cases and
-

-
- review of the literature. *Mol Cytogenet.* 2012 Feb 28;5:12.
-
- 14 Sifakis S, Papantoniou N, **Kappou D**, Antsaklis A. Noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome: current knowledge and novel insights. *J Perinat Med.* 2012 Feb 13;40(4):319-27.
-
- 15 Vrachnis N, Sifakis S, Samoli E, **Kappou D**, Pavlakis K, Iliodromiti Z, Botsis D. Three-dimensional ultrasound and three-dimensional power Doppler improve the preoperative evaluation of complex benign ovarian lesions. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2012;39(4):474-8
-
- 16 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth hormone at 11-13 weeks' gestation in pregnancies delivering small for gestational age neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 Sep;25(9):1796-9.
-
- 17 Sifakis S, Kaminopetros P, **Kappou D**, Dimitriadis T. Successful term pregnancy in a patient with cervicovaginal fistula managed with transabdominal laparoscopic cervical cerclage. *J Obstet Gynaecol.* 2012 Oct;32(7):700-1.
-
- 18 Sifakis S, Eleftheriades M, **Kappou D**, Murru R, Konstantinidou A, Orru S, Ziegler M, Liehr T, Manolakos E, Papoulidis I. Prenatal diagnosis of proximal partial trisomy 1q confirmed by comparative genomic hybridization array: molecular cytogenetic analysis, fetal pathology and review of the literature. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014;100(4):284-93.
-
- 19 Koutroulakis D, Sifakis S, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Theodoropoulou E, Kavvalakis MP, **Kappou D**, Tsatsakis AM. Dialkyl phosphates in amniotic fluid as a biomarker of fetal exposure to organophosphates in Crete, Greece; association with fetal growth. *Reprod Toxicol.* 2014;46:98-105.
-
- 20

1	
---	--

Kappou D, Sifakis S, Androutsopoulos V, Konstantinidou A, Spandidos DA, Papantoniou N. Placental mRNA expression of angiopoietins (Ang)-1, Ang-2 and their receptor Tie-2 is altered in pregnancies complicated by preeclampsia. *Placenta.* 2014 Sep;35(9):718-23.
-
- 21 Eleftheriades M, Papastefanou I, Lambrinouadaki I, **Kappou D**, Lavranos D, Akalestos A, Souka AP, Pervanidou P, Hassiakos D, Chrousos GP. Elevated placental growth factor concentrations at 11-14 weeks of gestation to predict gestational diabetes mellitus. *Metabolism.* 2014 Nov;63(11):1419-25.
-
- 22 Papastefanou I, **Kappou D**, Souka A, Pilalis A, Chrelis C, Siristatidis C, Kassanos D. Reproducibility study of fetal 3 - dimensional volumetry in the first trimester. The effect of the fetal size and the rotational angle of the VOCAL software. *Ultrasound Med Biol* 2014 Jan
-

- 23 Papastefanou I, **Kαρρου D**, Souka A, Chrelias C, Siristatidis C, Pilalis A, Kassanos D. Fetal volume at 11 to 14 gestational weeks: Reference ranges and association with first trimester biochemical and biophysical markers. J Perinat Med 2014;42(1):107-12.
- 24 Hassiakos D, Eleftheriades M, Papastefanou I, Lambrinouadaki I, **Kαρρου D**, Lavranos D, Akalestos A, Aravantinos L, Pervanidou P, Chrousos G. Increased Maternal Serum Interleukin-6 Concentrations at 11 to 14 Weeks of Gestation in Low Risk Pregnancies Complicated with Gestational Diabetes Mellitus: Development of a Prediction Model. Horm Metab Res. 2015 Jan 7. [Epub ahead of print]
- 25 **Kαρρου D**, Sifakis S, Konstantinidou A, Papantoniou N, Spandidos DA. Role of the angiotensin/Tie system in pregnancy (Review). Exp Ther Med. 2015 Apr;9(4):1091-1096.
- 26 **Kαρρου D**, Papastefanou I, Pilalis A, Kavalakis I, Kassanos D, Souka AP. Towards detecting open spina bifida in the first trimester: the examination of the posterior brain. Fetal Diagn Ther. 2015;37(4):294-300.
- 27 Papastefanou I, Eleftheriades M, **Kαρρου D**, Lambrinouadaki I, Lavranos D, Pervanidou P, Sotiriadis A, Hassiakos D, Chrousos GP. Maternal serum osteocalcin at 11-14 weeks of gestation in gestational diabetes mellitus. Eur J Clin Invest. 2015;45(10):1025-31.
-

Πλήρεις δημοσιεύσεις σε ελληνικά περιοδικά

- 1 **Κάππου Δ**, Μαντάς Ν, Σηφάκης Σ. Μονήρης ομφαλική αρτηρία: υπερηχογραφική διάγνωση, διερεύνηση και γενετική συμβουλευτική. Υπερηχογραφία 2009;6(4):177-87
- 2 Ζιώγος Ε, **Κάππου Δ**, Ματαλλιωτάκης Ι. Εξωπυελική ενδομητρίωση γαστρεντερικού. Newsletter Ενδομητρίωση 2009;4:8-11
- 3 **Κάππου Δ**, Κρασνικολάκης Γ, Ματαλλιωτάκης Ι. Ενδομητρίωση: βασικές θεωρίες και νεότερα δεδομένα στην αιτιοπαθογένεια και παθοφυσιολογία της νόσου. Newsletter Ενδομητρίωση 2009;5:10-14
- 4 Ζιώγος Ε, **Κάππου Δ**, Ματαλλιωτάκης Ι. Συσχέτιση βακτηριακής κόλπωσης (Bacterial vaginosis) και λοιμώξεων ουροποιητικού συστήματος. Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογία 2009;21(3):244-250.
-

-
- 5 **Κάππου Δ**, Σηφάκης Σ. Ο ρόλος της Doppler μελέτης της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας στη διάγνωση, παρακολούθηση και θεραπεία της εμβρυικής αναιμίας.Υπερηχογραφία 2010;7(2):37-52
 - 6 Σηφάκης Σ, **Κάππου Δ**, Μπότσης Δ. Λοίμωξη από το στρεπτόκοκκο της Ομάδας Β και εγκυμοσύνη. Ελληνικό Περιοδικό Μαιευτικής Γυναικολογίας
-

Ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

-
- 1 Christopoulou S, Christopoulou G, Hatzaki A, Donoghue J, Karkaletsis M, Tseva T, Kaminopetros P, **Kappou D**, Sifakis S, Velissariou V. The replacement of cytogenetic analysis of chorionic villi sampling direct preparation samples by quantitative fluorescence PCR. 7th European Cytogenetics Conference, Stockholm Sweden, 4-7 July 2009. Publication of abstract in Chromosome Res 2009;17 (suppl 1): 212
 - 2 Sifakis S, Papadopoulou E, **Kappou D**, Mantas N, Konstantinidou A, Florentin L, Velissariou V, Matalliotakis I. Cystic hygroma in two fetuses with unbalanced translocations of parental origin. 7th European Cytogenetics Conference, Stockholm Sweden, 4-7 July 2009. Publication of abstract in Chromosome Res 2009;17 (suppl 1): 228
 - 3 Kappou D, Sifakis S, Papadopoulou E, Konstantinidou A, Fragkiadaki P, Patsalis Ph, Matalliotakis I, Velissariou V. A de novo ESAC marker chromosome derived from chromosome 15 prenatally diagnoses in a fetus with macrocephaly and atrium aplasia. 7th European Cytogenetics Conference, Stockholm Sweden, 4-7 July 2009. Publication of abstract in Chromosome Res 2009;17 (suppl 1): 228-9.
 - 4 Mantas N, Sifakis S,**Kappou D**, Papadopoulou E, Koutroulakis D, Fragkiadaki P, Florentin L, Pangalos K, Velissariou V, Matalliotakis I. Chromosomal rearrangements and minor structural variations in prenatal diagnosis. 7th European Cytogenetics Conference, Stockholm Sweden, 4-7 July 2009. Publication of abstract in Chromosome Res 2009;17(suppl 1):229
 - 5 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Zaravinos A, Nicolaidis KH. Maternal serum IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP-3 at 11-13 weeks in trisomy 21 and trisomy 18 pregnancies. 9th World Congress in Fetal Medicine. 20-24 June 2010, Rhodes, Greece.
-

-
- 6 Sifakis S, Akolekar R, Mantas N, **Kappou D**, Papadopoulou E, Nicolaides KH. Maternal serum human placental growth hormone (hPGH) at 11-13 weeks in trisomy 21 and trisomy 18 pregnancies. 9th World Congress in Fetal Medicine. 20-24 June 2010, Rhodes, Greece

 - 7 Sifakis S, Akolekar R, Mantas N, **Kappou D**, Papadopoulou E, Nicolaides KH. Placental Growth Hormone & IGFs at 11-13 weeks in preeclampsia. 9th World Congress in Fetal Medicine. 20-24 June 2010, Rhodes, Greece.

 - 8 Sifakis S, **Kappou D**, Mantas N, Papadopoulou E, Sklavounou E, Konstantinidou A. Severe fetal growth restriction associated with placental mesenchymal dysplasia. 10th World Congress in Fetal Medicine, Malta, 26-30 June 2011

 - 9 Sifakis S, Akolekar R, **Kappou D**, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum insulin like growth factor (IGF-I) and binding proteins IGFBP-1 and IGFBP-3 at 11-13 weeks' gestation in pregnancies delivering small for gestational age neonates. 10th World Congress in Fetal Medicine, Malta, 26-30 June 2011

 - 10 Vrachnis N, Sifakis S, Pavlaki A, **Kappou D**, Botsis D, Creatsas G. The improvement in the preoperative assessment of benign ovarian masses by the use of three dimensional ultrasound and three dimensional power Doppler. 9th RCOG International Meeting, 28-30 September 2011, Athens, Greece

 - 11 Sifakis S, Anagnostopoulou K, Plastira K, Papadopoulou E, **Kappou D**, Konstantinidou A, Sklavounou E. A Rare Case of XX/XY Mosaicism and Trisomy 13 in Early Prenatal Diagnosis. 9th RCOG International Meeting, 28-30 September 2011, Athens, Greece

 - 12 Konstantinidou A, Katsimbali A, Dalkaraki N, **Kappou D**, Sifakis S. The association of cleft lip/palate, narrow thorax, poly/syndactyly and genital abnormalities as a feature of various single gene disorders: 3 features with 3 different diagnoses at autopsy. 11th World Congress in Fetal Medicine, 24-28 June 1012, Kos, Greece

 - 13 Sifakis S, Akolekar R, Kappou D, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum Placental Growth Hormone (PGH) at 11-13 weeks' gestation in pregnancies delivering small for gestational age neonates. 11th World Congress in Fetal Medicine, 24-28 June 1012, Kos, Greece

 - 14 **Kappou D**, Androutsopoulos V, Papantoniou N, Konstantinidou A, Koutroulakis D, Spandidos DA, Sifakis S. Placental expression of angiopoietins (Ang-1 & Ang-2) and their receptor TIE-1 in pregnancies complicated with preeclampsia with or without fetal growth restriction. 12th World Congress in Fetal Medicine, 22-26 June 2013, Spain
-

-
- 15 Eleftheriades M, Papastefanou I, Lamprinoudaki I, Akalestos A, **Kαρρου D**, Polymerou V, Lavranos D, Pervanidou P, Hassiakos H, Chrousos G. Increased Maternal Serum Placental Growth Factor (PIGF) and Interleukin (IL)-6 at 11 to 14 weeks of gestation in low risk pregnancies are predictive of gestational diabetes mellitus. Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, June 21–24, 2014 - Chicago
-
- 16 Eleftheriades M, Papastefanou I, **Kαρρου D**, Lamprinoudaki I, Lavranos D, Akalestos A, Pervanidou P, Chrousos G. Serum concentrations of 25-Hydroxy-Vitamin D at 11-14 gestational weeks in pregnancies that developed gestational diabetes mellitus. Endocrine Society's 98th Annual Meeting and Expo, April 1-4, 2016, Boston, Massachusetts.
-

Ανακοινώσεις σε ελληνικά συνέδρια

-
- 1 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Μαρταβαντζής Ν, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι, Βαρβέρης Α, Φασουλάκη Α, Τρογκάνης Ν, Στρατάκης Ι, Μαζωνάκης Μ, Βαρβέρης Χ. Μελέτη φάσης Ι εξωτερικής ακτινοθεραπείας και μέσου ρυθμού δόσης (MDR) βραχυθεραπείας σε συνδυασμό με ταυτόχρονη χορήγηση λιποσωμικής δοξορουβικίνης και cisplatinum για ασθενείς με προχωρημένο Ca τραχήλου μήτρας (στάδιο II_B-IV_A). 2^ο Παγκρήτιο Ματεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ρέθυμνο 4-5 Απριλίου 2009.
-
- 2 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Μαρταβαντζής Ν, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι, Βαρβέρης Α, Φασουλάκη Α, Τρογκάνης Ν, Στρατάκης Ι, Μαζωνάκης Μ, Βαρβέρης Χ. Μελέτη φάσης ΙΙ εξωτερικής ακτινοθεραπείας και μέσου ρυθμού δόσης (MDR) βραχυθεραπείας σε συνδυασμό με ταυτόχρονη χορήγηση λιποσωμικής δοξορουβικίνης και cisplatinum για ασθενείς με προχωρημένο Ca τραχήλου μήτρας (στάδιο II_B-IV_A). 2^ο Παγκρήτιο Ματεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ρέθυμνο 4-5 Απριλίου 2009
-
- 3 Βλασιάδης Κ, Κουτσαμάνη Μ, **Κάππου Δ**, Παπαθωμάς Θ, Παπαδάκης Γ, Ματαλλιωτάκης Ι. Ο ρόλος του ιού των θηλωμάτων στον καρκίνο του στόματος και στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. 2^ο Παγκρήτιο Ματεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ρέθυμνο 4-5 Απριλίου 2009.
-

-
- 4 **Κάππου Δ**, Κουρλετάκης Σ, Ζιώγος Ε, Σηφάκης Σ, Γουμένου Α, Φραγκούλη Υ, Ματαλλιωτάκης Ι, Arici A. Ενδομητρίωση και οικογενής επιβάρυνση για ορισμένους τύπους καρκίνου ασθενών από τα αρχεία του Yale, 2^ο Παγκρήτιο Ματεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ρέθυμνο 4-5 Απριλίου 2009. **Βραβείο καλύτερης ελεύθερης ανακοίνωσης**
-
- 5 Καμινόπετρος Π, Μαντάς Ν, **Κάππου Δ**, Κικίδη Κ, Πρεζεράκου Μ, Σηφάκης Σ. Κολποτραχηλικό συρίγγιο και επανειλημμένες σηπτικές αποβολές 2^{ου} τριμήνου κύησης. Υπερηχογραφική διάγνωση και επιτυχής αντιμετώπιση με λαπαροσκοπική διακοιλιακή περιέδεση τραχήλου. 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Αθήνα 28-31 Μαΐου 2009.
-
- 6 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, Μαρταβαντζής Ν, **Κάππου Δ**, Γούμενου Α, Ματαλλιωτάκης Ι. Εκδήλωση ουρολοιμώξεων σε ασθενείς με βακτηριακή κόλπωση (bacterial vaginosis). 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Αθήνα 28-31 Μαΐου 2009.
-
- 7 Σηφάκης Σ, **Κάππου Δ**, Μπίλη Χ, Μαντάς Ν, Παπαδοπούλου Ε, Ματαλλιωτάκης Ι, Φλωρεντιν Λ. Αυξημένη αυχενική διαφάνεια και πτυχή σε έμβρυο με 22q11.21 duplication μετά από MLPA ανάλυση. Διαγνωστική προσέγγιση & γενετική συμβουλευτική. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Θεσσαλονίκη, 18-20 Σεπτεμβρίου 2009. Δημοσίευση της περίληψης στην Περιγεννητική Ιατρική & Νεογνολογία, 2009; 4(3):168
-
- 8 Σηφάκης Σ, Ζαραβίνος Α, Μαϊζ Ν, **Κάππου Δ**, Σπαντίδος ΔΑ, Nicolaidis ΚΗ. «Προσδιορισμός των επιπέδων του ελεύθερου εμβρυικού DNA στη διάρκεια του α' τριμήνου σε κυήσεις που επιπλέκονται με προεκλαμψία». 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Θεσσαλονίκη, 18-20 Σεπτεμβρίου 2009. Δημοσίευση της περίληψης στην Περιγεννητική Ιατρική & Νεογνολογία, 2009; 4(3):77
-
- 9 Ζιώγος Ε, Δημοσθένους Ε, Σταθουδάκης Γ, Λυγνός Μ, **Κάππου Δ**, Μαρταβαντζής Ν, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι. «Τυχαίοποιημένη μελέτη προφύλαξης με αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη ή κεφουροξίμη σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε γυναικολογικές επεμβάσεις. Συσχέτιση βακτηριακής κολπίτιδας και λοίμωξης εγχειρητικού πεδίου». 3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009.
-
- 10 Ζιώγος Ε, Δημοσθένους , Σταθουδάκης Γ, Λυγνός Μ, **Κάππου Δ**, Μαρταβαντζής Ν, Ματαλλιωτάκης Ι. Χημειοπροφύλαξη με αμπικιλίνη/σουλμπακτάμη ή κεφουροξίμη σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε καισαρική τομή. Συσχέτιση βακτηριακής κολπίτιδας και λοίμωξης εγχειρητικού πεδίου. 3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009.
-

-
- 11 Λυγνός Μ, Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Μαρταβαντζής Ν, Σηφάκης Σ, Κουμαντάκης Γ, Ματαλλιωτάκης Ι.«Μελέτη των επιπέδων της ET-1 σε ανεπίπλεκτες κύησεις».3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009.
-
- 12 Ζιώγος Ε, Λυγνός Μ., Σταθουδάκης Γ, Λυγνός Μ, **Κάππου Δ**, Ματαλλιωτάκης Ι. Μεταβολές στα επίπεδα των VEGF, bFGF, TGF-β1, ET-1, skL στο πλάσμα σε εγκυμοιούσες με υπέρταση κύησης. 3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009.
-
- 13 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, Λυγνός Μ, **Κάππου Δ**, Μαρταβαντζής Ν, Μανιδάκης Γ, Ματαλλιωτάκης Ι. Η σημασία της βακτηριακής κόλπωσης στην εκδήλωση ουρολοιμώξεων σε εγκυμονούσες. 3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009.
-
- 14 Ζιώγος Ε, Δημοσθένους Ε, Σταθουδάκης , **Κάππου Δ**, Μαρταβαντζής Ν, Μανιδάκης Γ, Ματαλλιωτάκης Ι. Σύνδρομο Klippel-Trenaunay και κύηση. Παρουσίαση περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009.
-
- 15 Λυγνός Μ, Ζιώγος Ε, **Κάππου Δ**, Νεονάκη Μ, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι.«Μελέτη των επιπέδων του b-FGF σε κύησεις ελεύθερων επιπλοκών».3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009
-
- 16 Λυγνός Μ, Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Νεονάκη Μ, Μαρταβαντζής Ν, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι. Μεταβολές στα επίπεδα των VEGF, b-FGF, TGF-β1, ET-1, skL στο πλάσμα σε εγκυμονούσες με διαβήτη κύησης.3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009
-
- 17 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, Κουμαντάκης Γ, Λυγνός Μ, **Κάππου Δ**, Ματαλλιωτάκης Ι. Μεταβολές στα επίπεδα του TGF-β1 στο πλάσμα της εγκύου κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κύησης. 3^ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 16-18 Οκτωβρίου 2009
-
- 18 **Κάππου Δ**, Σταθουδάκης Γ, Νεονάκη Μ, Ζιώγος Ε, Κυβεντίδης Θ, Ματαλλιωτάκης Ι. Ενδομητρίωση κοιλιακού τοιχώματος: Περιγραφή περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδομητρίωσης, Ηράκλειο 16-17 Οκτωβρίου 2010.
-

-
- 19 Ματαλλιωτάκης Ι, SakkasD, **Κάππου Δ**, Γούμενου Α, Ματαλλιωτάκης Μ, Κουμαντάκης Γ, AriciA. Η επίδραση της ενδομητρίωσης στη διαδικασία εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση: αποτελέσματα αναδρομικής μελέτης από τη μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης του Πανεπιστημίου του Yale. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδομητρίωσης, Ηράκλειο 16-17 Οκτωβρίου 2010.
-
- 20 Ζιώγος Ε, Δημοσθένους Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Κονταξάκη Ο, Παρίσης Μ, Παπαθωμάς Θ, Κονδύλης Π, Μαρταβαντζής Ν, Ρελάκης Κ, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι. Προγεννητική διάγνωση συγγενούς τοξοπλάσμωσης: παρουσίαση περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 3^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.
-
- 21 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Λυγνός Μ, Κονταξάκη Ο, Χριστοδουλάκη Χ, Ζουραράκη Ε, Καραγκιούζης Θ, Παπαθωμάς Θ, Ρελάκης Κ, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι. Χλαμυδιακή λοίμωξη και κύηση: παρουσίαση περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 3^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.
-
- 22 Ζιώγος Ε, Δημοσθένους Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Κουμαντάκης Γ, Χριστοδουλάκη Χ, Παρίσης Μ, Κονδύλης Π, Μανιδάκης Γ, Ρελάκης Κ, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι. Παρακολούθηση και διεκπεραίωση τοκετού σε εγκυμονούσα με HIV λοίμωξη. 3^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.
-
- 23 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Λυγνός Μ, Ζουραράκη Ε, Καραγκιούζης Θ, Παπαθωμάς Θ, Ρελάκης Κ, Ματαλλιωτάκης Ι. Περιγραφή περιστατικού με υποτροπιάζουσα ερπητική λοίμωξη και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 3^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.
-
- 24 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, **Κάππου Δ**, Κονταξάκη Ο, Καστρινάκη Ε, Χριστοδουλάκη Χ, Παρίσης Μ, Κουρλετάκης Σ, Βασιλάκης Μ, Κονδύλης Π, Ρελάκης Κ, Ματαλλιωτάκης Ι. Ενδομήτρια λοίμωξη και πρόωρος τοκετός. Παρουσίαση περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. 3^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.
-
- 25 Ανδρεαδάκη Μ, Ματαλλιωτάκη Χ, **Κάππου Δ**, Κουμαντάκη Γ, Καλογεράκη Α. Προσδιορισμός πολλαπλασιαστικών και αποπτωτικών δεικτών στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών που εντοπίζεται στο πυελικό έδαφος” Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.
-

-
- 26 Ζιώγος Ε, Σταθουδάκης Γ, Δημοσθένους Ε, **Κάππου Δ**, Καστρινάκη Ε, Παρίσης Μ, Κουρλετάκης Σ, Βασιλάκης Μ, Σηφάκης Σ, Ματαλλιωτάκης Ι. Η χρήση της μετρονιδαζόλης στην πρόληψη του πρόωρου τοκετού σε εγκυμονούσες με ασυμπτωματική λοίμωξη με *Trichomonas vaginalis*. 3^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.
-
- 27 Σηφάκης Σ, **Κάππου Δ**, Akolekar R, Ζαραβίνος Α, Μαντάς Ν, Nicolaïdes ΚΗ. Ελαττωμένα επίπεδα του IGF-I στο μητρικό ορό την 11η-13η εβδομάδα σε κύσεις που επιπλέκονται με προεκλαμψία. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Μέτσοβο 14-16 Μαΐου 2010
-
- 28 Σηφάκης Σ, Akolekar R, **Κάππου Δ**, Ζαραβίνος Α, Μαντάς Ν, Παπαδοπούλου Ε, Nicolaïdes ΚΗ. Συσχέτιση των επιπέδων της Πλακουντιακής Αυξητικής Ορμόνης (PGH) στην 11^η – 13^η εβδομάδα κύησης με την εκδήλωση προεκλαμψίας. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Μέτσοβο 14-16 Μαΐου 2010
-
- 29 Σηφάκης Σ, Akolekar R, Ζαραβίνος Α, **Κάππου Δ**, Μαντάς Ν, Nicolaïdes ΚΗ. Μέτρηση των επιπέδων του αυξητικού παράγοντα IGF-I και των δεσμευτικών πρωτεϊνών IGFBP-1 και IGFBP-3 την 11η-13η εβδομάδα σε κύσεις με τρισωμία 21 και τρισωμία 18. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Μέτσοβο 14-16 Μαΐου 2010
-
- 30 Σηφάκης Σ, Akolekar R, Ζαραβίνος Α, **Κάππου Δ**, Μαντάς Ν, Παπαδοπούλου Ε, Nicolaïdes ΚΗ. Η Πλακουντιακή Αυξητική Ορμόνη (PGH) ως δείκτης τρισωμίας 21 και 18 στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Μέτσοβο 14-16 Μαΐου 2010
-
- 31 Σηφάκης Σ, Μανωλάκος Ε, **Κάππου Δ**, Πείτσιδης Π, Παπουλίδης Ι, Παπαδοπούλου Ε, Petersen MB, Κωνσταντινίδου Α. Προγεννητική διάγνωση συνδρόμου Wolf-Hirschhorn. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική & Γυναικολογία, Αθήνα 10-12 Δεκεμβρίου 2010
-
- 32 Χατζάκη Α, Σηφάκης Σ, Αποστολοπούλου Δ, Μπουζαρέλου Δ, Κωνσταντινίδου Α, **Κάππου Δ**, Σιδέρης Α, Τζώρτζης Ε, Αθανασιάδης Α, Φλωρεντίν Λ, Θεοδωρόπουλος Π, Μακατσώρης Κ, Καραδήμας Χ, Βελισσαρίου Β. Σκελετικές δυσπλασίες σχετιζόμενες με το γονίδιο FGFR-3: προγεννητική διάγνωση με τη χρήση υπερηχογραφίας και μοριακής ανάλυσης. Παρουσίαση 17 περιπτώσεων. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική & Γυναικολογία, Αθήνα 10-12 Δεκεμβρίου 2010
-
- 33 Ελευθεριάδης Μ, Σηφάκης Σ, Κωνσταντινίδου Α, **Κάππου Δ**, Μανωλάκος Ε, Παπουλίδης Ι.
-

Διπλασιασμός 1q proximal: προγεννητικός υπερηχογραφικός έλεγχος, ευρήματα αυτοψίας και γενετικός έλεγχος. Συμβολή στη συσχέτιση φαινοτύπου-γονοτύπου. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Σκιάθος 4-6 Μαΐου 2012.

34 Αναγνωστοπούλου Κ, Σηφάκης Σ, Κοντός Χ, Mikkelsen Μ, **Κάππου Δ**, Σκλαβούνου Ε. Προγεννητικός έλεγχος μερικής μητρικής ισοδισωμίας του χρωμοσώματος 16 και κλινική εκτίμηση στην ηλικία 13 μηνών. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Σκιάθος 4-6 Μαΐου 2012.

35 Παπαστεφάνου Ι, Σούκα Α, **Κάππου Δ**, Ελευθεριάδης Μ, Πιλάλης Α, Κασσάνος Δ. Πρόβλεψη διαταραχών της εμβρυικής ανάπτυξης σε πολυτόκες με βάση το βάρος γέννησης στην προηγούμενη κύηση και το υπερηχογράφημα 3ου τριμήνου. 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Ναύπλιο 3-5 Ιουνίου 2016 [Προφορική ανακοίνωση]

36 Παπαστεφάνου Ι, Πιλάλης Α, **Κάππου Δ**, Κασσάνος Δ, Σούκα Α. Εφαρμογή καθολικού ελέγχου πληθυσμού για τον πρόωρο τοκετό στην εποχή της προγεστερόνης. 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Ναύπλιο 3-5 Ιουνίου 2016 [Προφορική ανακοίνωση]

Βραβεία – Χορηγίες

1 **Βραβείο για την καλύτερη ελεύθερη ανακοίνωση 3^{ου} Διαπανεπιστημιακού Διανοσοκομειακού Συνεδρίου Μαιευτικής-Γυναικολογίας .**

Arici Α, Sakkas D, **Κάππου Δ**, Κρασσινολάκης Γ, Γούμενου Α, Κουμαντάκης Γ, Ζιώγος Ε, Ματαλλιωτάκης Ι. «Αποτελέσματα εμβρυομεταφοράς 3^{ης} και 6^{ης} ημέρας σε ασθενείς με ενδομητρίωση στη μονάδα IVF του Yale "Ηράκλειο, 16-18 Οκτωβρίου 2009.

2 **Βραβείο Παγκρήτιας Μαιευτικής Γυναικολογικής Εταιρείας για την καλύτερη ελεύθερη ανακοίνωση 2^{ου} Παγκρήτιου Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Μαιευτικής Γυναικολογίας.**

Κάππου Δ, Κουρλετάκης Σ, Ζιώγος Ε, Σηφάκης Σ, Γουμένου Α, Φραγκούλη Υ, Ματαλλιωτάκης Ι, Arici Α. «Ενδομητρίωση και οικογενής επιβάρυνση για ορισμένους τύπους καρκίνου ασθενών από τα αρχεία του Yale", Ρέθυμνο 4-5 Απριλίου 2009.

3 **Βραβείο Παγκρήτιας Μαιευτικής Γυναικολογικής Εταιρείας για την καλύτερη ελεύθερη**

ανακοίνωση 3^{ου} Παγκρήτιου Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Μαιευτικής Γυναικολογίας.

Ζιώγος Ε, Τσιόδρας Σ, **Κάππου Δ**, Μανιδάκης Γ, Μαρταβαντζής Ν, Γιαμαρέλλος-Μπουρμπούλης Ε, Ματαλλιωτάκης Μ, Γιαμαρέλλου Ε, Κανελακοπούλου Κ. «Αντιμικροβιακή χημειοπροφύλαξη με κεφουροξίμη ή αμπικιλλίνη/ σουλμπακτάμη σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε γυναικολογικές επεμβάσεις για καλοήθεις παθήσεις” Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.

4 Βραβείο Παγκρήτιας Μαιευτικής Γυναικολογικής Εταιρείας για την καλύτερη ελεύθερη ανακοίνωση 3^{ου} Παγκρήτιου Μετεκπαιδευτικού Σεμιναρίου Μαιευτικής Γυναικολογίας.

Ανδρεαδάκη Μ, Ματαλλιωτάκη Χ, **Κάππου Δ**, Κουμαντάκη Γ, Καλογεράκη Α . «Προσδιορισμός πολλαπλασιαστικών και αποπτωτικών δεικτών στο περιτοναϊκό υγρό ασθενών με καρκίνο ωοθηκών που εντοπίζεται στο πυελικό έδαφος” Ηράκλειο 24-25 Απριλίου 2010.

5 Βραβείο για την καλύτερη ελεύθερη ανακοίνωση 4^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ενδομητρίωσης.

Ματαλλιωτάκης Ι, Sakkas D, **Κάππου Δ**, Γούμενου Α, Ματαλλιωτάκης Μ, Κουμαντάκης Γ, AriciA. «Η επίδραση της ενδομητρίωσης στη διαδικασία εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση :αποτελέσματα αναδρομικής μελέτης από τη μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης του Πανεπιστημίου του Yale ” Ηράκλειο 16-17 Οκτωβρίου 2010.

6 Χορηγία «Γ. Παπανικολάου» 2011 της Ελληνικής Μαιευτικής και Γυναικολογικής Εταιρείας (χορηγία 11.000 ευρώ)

Βραχνης Ν, Φραγκιαδάκη Π, Σουλιτζής Ν, Κουτρουλάκης Δ, **Κάππου Δ**, Γκούρβας Β, Κωνσταντινίδου Α, Σηφάκης Σ, Σπαντίδος ΔΑ. «Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch σε πλακούντες κυήσεων που επιπλέκονται με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης».

7 Βραβείο για την καλύτερη ελεύθερη ανακοίνωση 17^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Περιγεννητικής Ιατρικής.

Κάππου Δ, Ανδρουτσόπουλος Β, Παπαντωνίου Ν, Κωνσταντινίδου Α, Κουτρουλάκης Δ, Σπαντίδος ΔΑ, Σηφάκης Σ. «Μελέτη της έκφρασης των παραγόντων ANG-1, ANG-2 και του υποδοχέα τους Tie-2 σε πλακούντες κυήσεων με προεκλαμψία».

Συγγραφικό Έργο

-
- 1 **Καρπου D**, Matalliotakis M, Sifakis S, Ziogos E, Matalliotakis I. The association of Endometriosis to various types of malignancies: A comprehensive review of current knowledge and future directions (chapter 19). In: New Developments in Endometriosis. Published by CreateSpace, an Amazon.com company, 2011, pp 416-56

 - 2 Matalliotakis I, **Καρπου D**, Matalliotaki C, Koumantakis G, Arici A. Basic theories and new implications in pathogenesis and pathophysiology of endometriosis(chapter 2). In: New Developments in Endometriosis. Published by CreateSpace, an Amazon.com company, 2011, pp 42-83

 - 3 **Καρπου D**, Papadopoulou E, Sifakis S. Non invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. Chapter 11, pages 177-190.In: "Prenatal Diagnosis and Screening for Down Syndrome", edited by Subrata Dey (ISBN 978-953-307-355-2). InTech Publications, Vienna, August 2011

 - 4 **Καρπου D**, Vrachnis N, Sifakis S. Recent insights into the role of the insulin-like growth factor axis in preeclampsia. In: "Obstetrics" ISBN: 978-953-307-444-3, InTech–Open Access Publisher, InTech Publishing, Vienna

 - 5 **Κάππου Δ**, Ματαλλιωτάκης Ι. Ενδομητρίωση: η σύγχρονη αντίληψη για τη φύση της νόσου. Τόμος Πρακτικών στο 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας

 - 6 Ματαλλιωτάκης Ι, **Κάππου Δ**, Ζιώγος Ε, Κουμαντάκης Ε. Ενδομητρίωση και καρκίνος. Ειδικός τόμος διαλέξεων από την 8^η Επιστημονική Συνάντηση με θέμα " Νέες εξελίξεις στην πρόληψη και αντιμετώπιση του Γυναικολογικού Καρκίνου", Θεσσαλονίκη 20-22 Μαρτίου 2009
-

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση της πλακουντιακής έκφρασης των αγγειοποιητινών (Ang)-1, Ang-2 και του υποδοχέα τους Tie-2, σε κυήσεις με προεκλαμψία (PE) με ή χωρίς συνυπάρχουσα ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (IUGR).

Υλικό & Μέθοδος: Case-control μελέτη που βασίζεται στη συλλογή πλακουντιακού ιστού από 28 κυήσεις στην ομάδα PE, 30 κυήσεις στην ομάδα PE-IUGR, 30 κυήσεις στην ομάδα IUGR και 40 κυήσεις στην ομάδα ελέγχου. Η έκφραση των παραγόντων αυτών αξιολογήθηκε με τη μέθοδο quantitative real-time PCR.

Αποτελέσματα: Στις ομάδες κυήσεων με PE και PE-IUGR παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της Ang-2 ($p < 0.001$) και του υποδοχέα Tie-2 ($p = 0.008$) και χαμηλότερη έκφραση της Ang-1 ($p = 0.001$) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Η μεταβολή αυτή που καταγράφηκε στην έκφραση της Ang-1 ήταν το ίδιο σημαντική και στις δύο ομάδες ενώ ήταν πολύ πιο έντονη για την Ang-2 και τον υποδοχέα Tie-2 στην ομάδα PE-IUGR σε σχέση με τις φυσιολογικές κυήσεις. Συσχέτιση μεταξύ των μορίων Ang-2 και Tie-2 παρατηρήθηκε στην ομάδα PE ($r = 0.8602$, $p < 0.001$) και στην ομάδα PE-IUGR ($r = 0.6342$, $p < 0.001$). Επιπλέον, στην ομάδα PE-IUGR, η Ang-1 βρέθηκε να συσχετίζεται με την Ang-2 ($r = 0.3458$, $p = 0.0452$) και τον υποδοχέα Tie-2 ($r = 0.4448$, $p = 0.0084$). Η \log_{10} Ang-1 αλλά όχι η Ang-2 φάνηκε ότι εξαρτάται από την ηλικία κύησης ($R^2 = 0.40$, $p < 0.001$). Μετά από μετατροπή σε Multiples of the Median (MoM) η παράμετρος \log_{10} MoM Ang-1 παρατηρήθηκε να είναι μειωμένη στην ομάδα κυήσεων με προεκλαμψία (mean = -0.8181 , $p < 0.001$) καθώς και στην ομάδα κυήσεων με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (mean = -1.2583 , $p < 0.001$) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (mean = -0.0924). Στις κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, τα επίπεδα έκφρασης των Ang-2 και Tie-2 είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$ και $p = 0.002$ αντίστοιχα). Τα επίπεδα έκφρασης της Ang-1 είναι χαμηλότερα στις παθολογικές κυήσεις ($p = 0.001$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση

μεταξύ του παράγοντα Ang-1 και του υποδοχέα Tie-2 σε πλακούντες με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης αλλά όχι σε πλακούντες από ανεπίπλεκτες κυήσεις.

Συμπεράσματα: Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής έδειξε ότι η πλακουντιακή έκφραση της Ang-2 και του υποδοχέα Tie-2 είναι αυξημένη ενώ τα επίπεδα έκφρασης της Ang-1 είναι μειωμένα στις κυήσεις με προεκλαμψία ως μεμονωμένη νόσο ή σε συνδυασμό με περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης. Επίσης, τα ευρήματα της μελέτης αυτής καταδεικνύουν ανάλογες μεταβολές στην πλακουντιακή έκφραση των αγγειοποιητινών Ang-1 & Ang-2 και του υποδοχέα τους Tie-2 σε κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι ο άξονας των αγγειοποιητινών φαίνεται να διαταράσσεται στις γυναίκες με προεκλαμψία ή/και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Το ερώτημα αν οι μεταβολές αυτές στην έκφραση των αγγειοποιητινών εκδηλώνονται στα πλαίσια της αγγειακής διαταραχής που παρατηρείται στις κυήσεις με τις δύο αυτές επιπλοκές της κύησης ή αποτελούν μέρος της παθοφυσιολογίας τους αναμένεται να απαντηθεί.

ΑΓΓΛΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Objective: to investigate the placental expression of angiotensin (Ang)-1, Ang-2 and their receptor, Tie-2, in preeclampsia (PE) with or without intrauterine growth restriction (IUGR).

Methods: Case-control study including placentas from 28 PE pregnancies, 30 PE-IUGR pregnancies, 30 IUGR pregnancies and 40 controls. The expression status of the genes was evaluated by quantitative real-time PCR.

Results: In both PE and PE-IUGR groups, compared to the control group, there was significantly higher expression of Ang-2 ($p < 0.001$) and Tie-2 ($p=0.008$) and lower expression of Ang-1 ($p=0.001$). The magnitude of the differences was similar for Ang-1 for both groups, whereas the magnitude of the differences was higher for Ang-2 and Tie-2 in PE-IUGR group compared to controls. Ang-2 and Tie-2 were correlated in both PE ($r=0.8602$, $p < 0.001$) and PE-IUGR ($r=0.6342$, $p < 0.001$) groups. In PE-IUGR group, Ang-1 was associated to Ang-2 ($r=0.3458$, $p=0.0452$) and Tie-2 ($r=0.4448$, $p=0.0084$). Log₁₀ Ang-1 but not Ang-2 was gestational age dependent ($R^2=0.40$, $p < 0.001$). After conversion in Multiples of the Median (MoM) log₁₀MoM Ang-1 was reduced in the PE group (mean= -0.8181, $p < 0.001$) and the PE-IUGR group (mean= -1.2583, $p < 0.001$) compared to control group (mean= -0.0924). In IUGR pregnancies, the placenta expression levels of Ang-2 and Tie-2 were significantly higher compared to the control group ($p < 0.001$ και $p=0.002$ respectively). Instead, the Ang-1 expression level was lower in pathological pregnancies ($p=0.001$). A significant correlation between Ang-1 and Tie-2 was observed in placentae from IUGR pregnancies whereas such an association did not exist in normal pregnancies.

Conclusion: We have demonstrated increased placental expression of Ang-2 and Tie-2 along with lower expression levels of Ang-1 in pregnancies with PE, IUGR and PE-IUGR. Our findings show that the angiotensin axis seems to be disrupted in such pregnancies. Whether the results of this study represent the angiogenic imbalance

observed in PE and IUGR pregnancies or they are part of the pathophysiology of these conditions has to be further investigated.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Ο πλακούντας είναι όργανο που αναπτύσσεται κατά την κύηση, λειτουργεί και υποστρέφει σε 40 εβδομάδες. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός του πλακούντα αρχίζει με την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο την 10η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου. Δομικά, ο ώριμος τελειόμηνος πλακούντας του ανθρώπου είναι ένα δισκοειδούς σχήματος όργανο, στρογγυλός ή υποστρόγγυλος και σπάνια αναπτύσσεται σε ανώμαλα σχήματα όπως δίλοβος, περιχαρακωμένος, δισκοειδής. Η μέση μέγιστη διάμετρος του δίσκου του τελειόμηνου πλακούντα είναι 18 εκατοστά, το μέγιστο πάχος στο κέντρο του δίσκου είναι 2,5 εκατοστά και το μέσο βάρος 500-600 γραμμάρια (υπολογιζόμενος λόγος βάρους εμβρύου/βάρος πλακούντα 6-7/1). Τα μεγέθη αυτά βέβαια εμφανίζουν μεγάλες διακυμάνσεις καθώς εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Με βάση μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, το βάρος του πλακούντα στις 20 εβδομάδες κύησης είναι κατά προσέγγιση 150 γραμμάρια, στις 30 εβδομάδες είναι περίπου 375 γραμμάρια και στις 40 εβδομάδες είναι περίπου 600 γραμμάρια. Αύξηση του βάρους του πλακούντα για τη δεδομένη ηλικία κύησης συνήθως υποκρύπτει παθήσεις της μητέρας όπως διαβήτης, παθήσεις του εμβρύου όπως ύδρωπας ή παρουσία ευμεγεθών εμφράκτων-αιματωμάτων του πλακούντα. Αντιθέτως, το μειωμένο βάρος του πλακούντα συνήθως υποδηλώνει χαμηλή παροχή αίματος ή/και ενδομήτρια καθυστέρηση του βάρους του εμβρύου.

Κατά τη μακροσκοπική εξέταση του ώριμου πλακούντα εκτός από το βάρος και το μέγεθος, περιγράφονται η μητρική επιφάνεια, η εμβρυϊκή επιφάνεια και το περιφερικό χείλος. Η μητρική επιφάνεια του πλακούντα απαρτίζεται από 15-20 κοτυληδόνες (αγγειακές μονάδες μητρικής προέλευσης) και καλύπτεται από το βασικό πέταλο-φθαυτό. Οι συχνότερες μακροσκοπικές αλλοιώσεις της μητρικής μοίρας του πλακούντα είναι οι αιμορραγίες και οι ανωμαλίες πρόσφυσης στο τοίχωμα της μήτρας. Συγκεκριμένα, η ρήξη των μητρικών αγγείων της μητρικής επιφάνειας του πλακούντα είναι αιτία όπισθο-πλακουντιακής αιμορραγίας, όπισθο-πλακουντιακού αιματώματος και αποκόλλησης του πλακούντα. Διαταραχές ανάπτυξης του βασικού πετάλου έχουν ως αποτέλεσμα την ανώμαλη πρόσφυση

του πλακούντα στο τοίχωμα της μήτρας και στις περιπτώσεις αυτές ο πλακούντας περιγράφεται ως συμφυτικός (στιφρός, διηθητικός).

Η εμβρυική επιφάνεια του πλακούντα αποτελείται από τους υμένες (άμνιο, χόριο) και τον ομφάλιο λώρο. Η επιφάνεια αυτή είναι λεία και στιλπνή και εμφανίζει σε έκκεντρη συνήθως θέση την πρόσφυση του ομφαλίου λώρου. Ο ομφάλιος λώρος του τελειόμηνου πλακούντα έχει κατά μέσο όρο διάμετρο 1-2 εκατοστά και μήκος 55 έως 60 εκατοστά και χαρακτηρίζεται από 2 περιτυλίξεις ανά 10 εκατοστά με φορά αντίθετη αυτής των δεικτών του ρολογιού. Τα εμβρυικά αγγεία διακλαδίζονται ακτινοειδώς από το σημείο πρόσφυσης του λώρου και εξαπλώνονται σε όλη την εμβρυική επιφάνεια του πλακούντα. Το άμνιο είναι μία λεπτή, διαφανής μεμβράνη με τα εξής χαρακτηριστικά: α) επαλείφει την εμβρυική κοιλότητα, β) επικάθεται στο υποκείμενο χόριο, γ) αποτελείται από κυβοειδή κύτταρα και ελάχιστο υπόστρωμα και δ) συμμετέχει στην παραγωγή αμνιακού υγρού. Το χοριονικό πέταλο αποτελείται από μεσέγγυμα με τροφοβλαστικά κύτταρα, αναπτύσσεται υπό το άμνιο και περικλείει τα ομφαλικά αγγεία. Από το χοριονικό πέταλο εξορμούνται οι χοριακές λάχνες. Οι συνηθέστερες μακροσκοπικές αλλοιώσεις της εμβρυικής επιφάνειας του πλακούντα είναι οι κύστεις αμνίου-χορίου, τα οζίδια, η δημιουργία αμνιακών ταινιών και οι φλεγμονώδεις αλλοιώσεις.

Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση των δομών που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του εμβρύου στα πρώτα στάδια της κύησης.



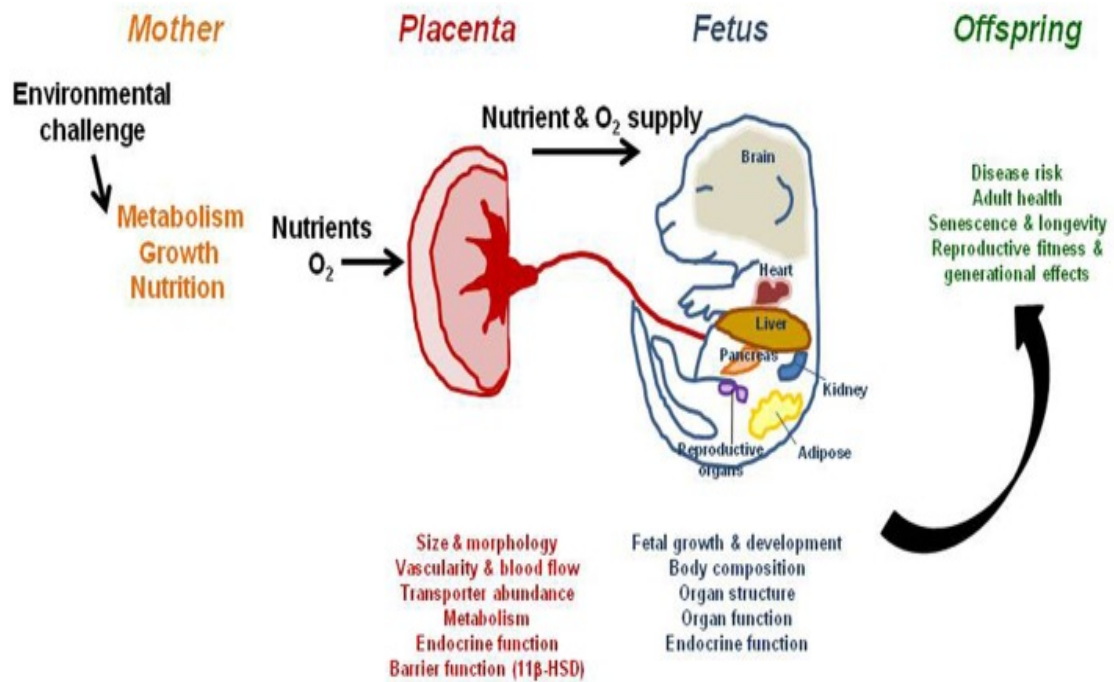
Αναλυτικότερα, το τοίχωμα της βλαστοκύστης αποτελείται από την τροφοβλάστη η οποία είναι βασικό δομικό στοιχείο του πλακούντα και διαφοροποιείται σε τρεις κυτταρικούς τύπους: α) κυτταροτροφοβλάστη, β) συγκυτιοτροφοβλάστη και γ) ενδιάμεση τροφοβλάστη [Lunghi et al, 2007]. Η κυτταροτροφοβλάστη σχηματίζει την έσω επιφανειακή στιβάδα της λάχνης, βρίσκεται πάντα υπό τη συγκυτιοτροφοβλάστη, αποτελεί τη βλαστική στιβάδα και έχει την ιδιότητα να υπόκειται σε μιτώσεις. Χαρακτηριστικό είναι επίσης ότι ο κυτταρικός αυτός πληθυσμός ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της κύησης. Η συγκυτιοτροφοβλάστη είναι ενιαία κυτταρική στιβάδα η οποία προέρχεται από την κυτταροτροφοβλάστη, ευρίσκεται πάντα στην εξωτερική επιφάνεια των λαχνών και έχει τη δυνατότητα αμοιβαδοειδών κινήσεων. Δομικά, η συγκυτιοτροφοβλάστη δε χωρίζεται σε κύτταρα ή τμήματα και δεν παρουσιάζει μιτωτική δραστηριότητα. Η τροφοβλάστη έχει πολλαπλές λειτουργίες: α) δρα ως ενδοκρινές όργανο και παράγει πλήθος βιοχημικών παραγόντων (πρωτεάσες, αυξητικούς και αγγειογενετικούς παράγοντες, προλακτίνη), β) συμμετέχει στον έλεγχο της διαδικασίας εμφύτευσης του ωαρίου, γ) σχηματίζει τις λάχνες του πλακούντα και δ) συμμετέχει στην εγκαθίδρυση της κυκλοφορίας του αίματος μεταξύ εμβρύου και μητέρας [Lunghi et al, 2007]. Λάχνες ονομάζονται οι θηλωματώδεις και διακλαδιζόμενες προσεκβολές της τροφοβλάστης και αποτελούν το βασικό δομικό συστατικό του πλακούντα. Οι λάχνες αποτελούνται από τροφοβλαστικό περίβλημα και στρώμα με πολυδύναμα κυτταρικά στοιχεία και αναπτύσσονται μέσα στη μητρική αιματολίμνη [Joshi, 1994]. Ανάλογα με την ηλικία του πλακούντα, διακρίνονται διάφοροι τύποι λαχνών (μεσεγγυματογενείς, στελεχιαίες, ενδιάμεσες ανώριμες και ώριμες, τελικές). Ο ώριμος πλακούντας διαθέτει 40-60 περίπου λαχνωτά δέντρα ή εμβρυικές κοτυληδόνες τα οποία μαζί με τις αντίστοιχες μοίρες του μεσολάχνιου χώρου είναι γνωστά ως πλακούντια. Τα πλακούντια αποτελούν τις εμβρυομητρικές μονάδες κυκλοφορίας αφού σε αυτά εκβάλλουν τα στόμια των συνολικά 100-150 σπειροειδών μητριαίων αρτηριών που αιματώνουν τη θέση εμφύτευσης [Joshi, 1994].

Η ιδιαιτερότητα και η μοναδικότητα του πλακούντα ως όργανο, έγκειται στο γεγονός ότι επιτελεί και φέρει εις πέρας ένας πλήθος λειτουργιών που έχουν ζωτική σημασία για την ανάπτυξη του εμβρύου και τη φυσιολογική έκβαση της κύησης. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της κύησης, οι παρακάτω λειτουργίες επιτελούνται

πλήρως ή μερικώς από τον πλακούντα, υποκαθιστώντας τα ανώριμα εμβρυικά όργανα: α) ανταλλαγή αερίων, β) εξισορρόπηση υγρών και pH, γ) καταβολισμός και απορρόφηση, δ) συνθετικές και εκκριτικές λειτουργίες, ε) μεταβολισμός ουσιών, στ) διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας και ανοσολογικές ρυθμίσεις.

Νεότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο πλακούντας δεν αποτελεί απλά ένα όργανο το οποίο εξυπηρετεί δομικά τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου μεταξύ μητέρας και εμβρύου [Sferruzzi-Perri and Camm, 2016]. Συγκεκριμένα, υπάρχουν πρόσφατα δεδομένα που δείχνουν ότι ο πλακούντας έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται μορφολογικά και λειτουργικά ώστε να βελτιστοποιεί την παροχή του απαραίτητου υποστρώματος και ως αποτέλεσμα να ενισχύει την ανάπτυξη του εμβρύου κάτω από αντίξοες συνθήκες στη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής [Sferruzzi-Perri and Camm, 2016]. Η προσαρμογή αυτή του πλακούντα βοηθά το έμβρυο να επιτύχει το δυναμικό ανάπτυξης που του αναλογεί και η αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας θα καθορίσει τις απόλυτες τιμές καθώς και τα σχετικά ποσοστά των διαφόρων μεταβολικών ουσιών που θα μεταφερθούν στο έμβρυο στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Η ροή αυτή των θρεπτικών ουσιών συμβάλλει στον προγραμματισμό των διαφόρων φυσιολογικών συστημάτων του εμβρύου σε επίπεδο γονιδίου, κυττάρου, ιστού και οργάνου ήδη από την ενδομήτριο ζωή. Διαταραχές σε αυτή την περίοδο μπορεί να προκαλέσουν μόνιμες δομικές και λειτουργικές αλλαγές και να οδηγήσουν στην εμφάνιση νοσημάτων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και νόσοι του καρδιαγγειακού συστήματος κατά την ενήλικη ζωή.

Εικόνα 2. Η εικόνα αυτή αποτυπώνει το σημαντικό ρόλο του πλακούντα σε φυσιολογικές συνθήκες και τις μεταβολές σε συνθήκες υποξίας και μειωμένων αποθεμάτων θρεπτικών ουσιών από τη μητέρα καθώς και τις συνέπειες που μπορεί να έχει αυτή η προσαρμογή στην ενήλικη ζωή [Sferruzzi-Perri and Camm, 2016].

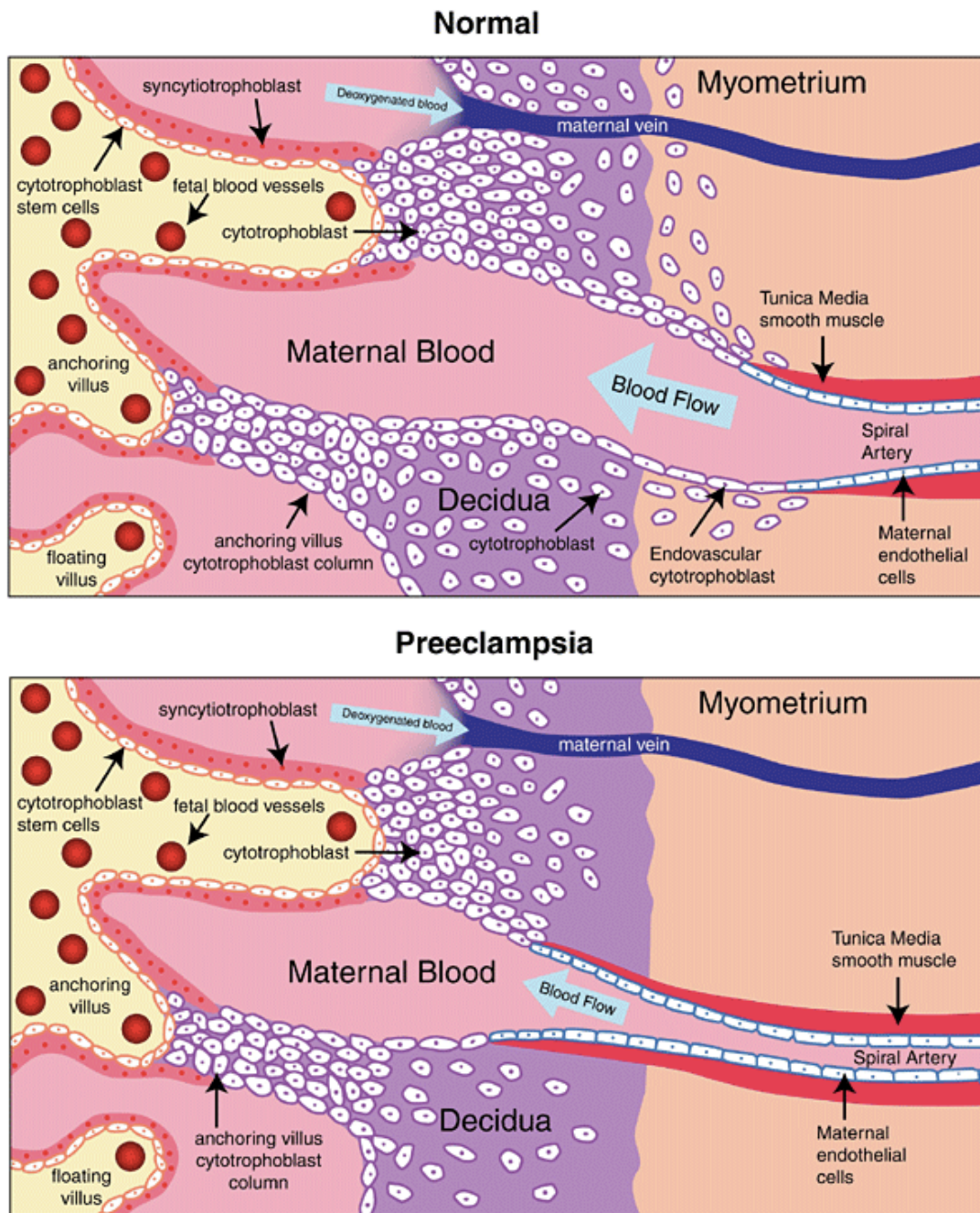


Όπως προαναφέρθηκε, ο πλακούντας αποτελείται από πολυάριθμες διακλαδιζόμενες μονάδες (tree-like projections) που ονομάζονται χοριακές λάχνες (chorionic villi) όπου λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή αερίων και θρεπτικών ουσιών μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Συγκεκριμένα, στις δομές αυτές πραγματοποιείται η μεταφορά θρεπτικών συστατικών, αερίων αλλά και βλαπτικών παραγόντων μεταξύ του αίματος του εμβρύου που κυκλοφορεί μέσω των λαχνών και του αίματος της μητέρας που κυκλοφορεί στο μεσολάχινο χώρο. Το μητρικό αίμα εισέρχεται στους μεσολάχιους χώρους του πλακούντα διαμέσου των σπειροειδών αρτηριών, οι οποίες αποτελούν κλάδους των μητριαίων αρτηριών. Γεμίζει τις χοριακές λάχνες και ρέει περιφερικά στον ακριανό κόλπο οποίος οδηγεί στις μητριαίες φλέβες. Μόρια τροφών, οξυγόνο και αντισώματα διέρχονται από το εμβρυϊκό αίμα των λαχνών. Τα άχρηστα μεταβολικά προϊόντα διέρχονται από το εμβρυϊκό αίμα στο αίμα της μητέρας. Φυσιολογικά δεν αναμειγνύεται το εμβρυϊκό με το μητρικό αίμα.

Στη φυσιολογική κύηση, οι κύτταροτροφοβλάστες αποκτούν διεισδυτικό/ενδοθηλιακό φαινότυπο καθώς φεύγουν από τον πλακούντα και εισέρχονται στο τοίχωμα της μήτρας ώστε να εγκαθιδρυθεί η μητροπλακουντιακή

κυκλοφορία. Η διαδικασία της διαφοροποίησης ξεκινά όταν οι πρόγονες μορφές των κυτταροτροφοβλαστών οι οποίες σχηματίζουν ένα μονό στρώμα που περιβάλλει τον στρωματικό πυρήνα των λαχνών μεταναστεύουν για να σχηματίσουν μία στήλη κυττάρων [Red-Horse et al, 2005]. Μετέπειτα, αυτές οι δομές προσκολλώνται στο τοίχωμα της μήτρας και δημιουργούνται τα κύτταρα που διεισδύουν στο υποκείμενο στρώμα που ονομάζεται φθαρτός (decidua). Οι κυτταροτροφοβλάστες δημιουργούν ένα άνοιγμα στα μητριάια αγγεία συνδέοντας τόσο την αρτηριακή όσο και τη φλεβική κυκλοφορία στο μεσολάχιο χώρο. Όμως όταν η σύνδεση αυτή πραγματοποιηθεί, η αναδιαμόρφωση της φλεβικής κυκλοφορίας σταματά. Αντιθέτως, οι κυτταροτροφοβλάστες μεταναστεύουν στον αυλό των σπειροειδών αρτηριών και σταδιακά αντικαθιστούν το ενδοθήλιο των αγγείων αυτών και τμήμα του μυϊκού τους τοιχώματος. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στο φθαρτό και στο έσω ένα τρίτο του μυομητρίου [Red-Horse et al, 2005]. Οι αλλαγές αυτές που συμβαίνουν στο αγγειακό δίκτυο της μήτρας μεταμορφώνουν τα αγγεία σε ένα σύστημα χαμηλής πίεσης και μεγάλης ροής ώστε να αυξηθεί η παροχή αίματος [Brosens et al, 1967]. Η φυσιολογική αυτή διαδικασία αποτυπώνεται στις μελέτες με Doppler όπου η αντίσταση στη ροή των μητριάιων αρτηριών μειώνεται με την πάροδο της κύησης [Khong et al, 1986]. Σε κύσεις με προεκλαμψία, η φυσιολογική αυτή διαδικασία διαταράσσεται, αποτυγχάνει η διείσδυση του τροφοβλαστικού ιστού στις μητρικές ελικοειδείς αρτηρίες [Εικόνα 3].

Εικόνα 3. Διαμόρφωση του αγγειακού δικτύου σε φυσιολογικές και παθολογικές κηύσεις [https://schoolworkhelper.net/preeclampsia-symptoms-risk-factors-prognosis/]



2. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Η επιτυχής διαδικασία της πλακουντοποίησης προϋποθέτει την διαμόρφωση ενός αγγειακού δικτύου ικανού να ανταποκριθεί στις αυξανόμενες μεταβολικές ανάγκες τόσο του αναπτυσσόμενου εμβρύου όσο και του ίδιου του πλακούντα. Η αναμόρφωση αυτή επιτυγχάνεται μέσω δύο διεργασιών: α) η δημιουργία de novo νέων αγγείων (vasculogenesis) και η αναδιαμόρφωση του ήδη υπάρχοντος αγγειακού δικτύου (branching and non-branching angiogenesis) [Maynard and Karumanchi, 2011]. Η διατάραξη της ισορροπίας στην έκφραση παραγόντων που προάγουν ή αναστέλλουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης στον πλακούντα δυνητικά οδηγεί στην εκδήλωση επιπλοκών της κύησης που συσχετίζονται με ανεπαρκή πλακουντοποίηση όπως η προεκλαμψία και η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης [Maynard and Karumanchi, 2011]. Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει το ρόλο διαφόρων αγγειογενετικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία αυτών των επιπλοκών αλλά η πλειονότητα αυτών έχει επικεντρωθεί στην οικογένεια των παραγόντων VEGF (vascular growth factor) και PlGF (placental growth factor) [Llurba et al, 2015]. Πολύ πιο περιορισμένος είναι ο αριθμός των δημοσιεύσεων σχετικά με τη συμμετοχή της οικογένειας των αγγειοποιητινών στην αγγειογένεση στον πλακούντα τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις παθολογικές κυήσεις.

2.1 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ & ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

Η προεκλαμψία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και συχνότερες επιπλοκές της κύησης που εκδηλώνονται σε έδαφος πλακουντιακής ανεπάρκειας. Η παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας συνεχίζει να είναι ένα από τα μεγαλύτερα μυστήρια της ιατρικής παρά την εντατική έρευνα που πραγματοποιείται εδώ και χρόνια στο πεδίο αυτό σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τη σύγχρονη θεώρηση, η νόσος αυτή εξελίσσεται σε δύο στάδια με τη διαταραχή στη διαδικασία της

πλακουντοποίησης να οδηγεί σε μία συστηματική φλεγμονώδη απάντηση από τη μητέρα [Phipps et al, 2016].

Ολοένα και πιο ισχυρά ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι διαταραχές στη ρύθμιση της έκφρασης αγγειογενετικών παραγόντων συγκαταλέγονται στους αιτιολογικούς παράγοντες που οδηγούν στην εκδήλωση προεκλαμψίας. Είναι χαρακτηριστικό ότι παράγοντες που κυκλοφορούν στο αίμα ασθενών με προεκλαμψία μπορούν να ασκήσουν βλαπτική δράση σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων [Rodgers et al, 1988]. Είναι επίσης δεδομένο ότι πολλές από τις κλινικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας (υπέρταση, πρωτεϊνουρία, οίδημα) αναπτύσσονται στο έδαφος αγγειακής βλάβης. Την τελευταία δεκαετία, μεγάλος είναι ο αριθμός των δημοσιεύσεων που εξετάζουν το πώς μεταβάλλεται η ισορροπία στην έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων σε κυήσεις με προεκλαμψία [Fisher, 2015]. Η πλειοψηφία των μελετών αυτών υποστηρίζει με ομοφωνία ότι τα επίπεδα παραγόντων με αντί-αγγειογενετική δράση όπως ο sFlt-1 και η ενδογλίνη είναι αυξημένα σε κυήσεις με προεκλαμψία ενώ τα επίπεδα παραγόντων που ενισχύουν την αγγειογένεση όπως ο PlGF μειώνονται δραματικά. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιγραφή των συνθηκών αυτών σε ζωικά μοντέλα οδήγησε στην εκδήλωση νόσου με συμπτώματα παρόμοια με την προεκλαμψία δηλαδή υπέρταση, πρωτεϊνουρία και αγγειακές βλάβες στους νεφρούς και στον εγκέφαλο.

Είναι ευνόητο όμως να δημιουργούνται ερωτήματα για το τι δημιουργεί αυτή την ανισορροπία και για το ποιος είναι ο ρόλος του πλακούντα. Έχει παρατηρηθεί ότι σε φυσιολογικές κυήσεις, οι κυτταροτροφοβλάστες που διεισδύουν στο τοίχωμα της μήτρας αποκτούν έντονη χρώση, δηλαδή εκφράζουν σε μεγάλο βαθμό τον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF [Fisher, 2015]. Αντιθέτως, σε κυήσεις με σοβαρή προεκλαμψία, ο ίδιος πληθυσμός κυττάρων εκφράζει σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα τον ίδιο παράγοντα. Επίσης, μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πλακούντες από κυήσεις με σοβαρή προεκλαμψία, έχουν δείξει ότι οι κυτταροτροφοβλάστες παράγουν αυξημένα επίπεδα του αντί-αγγειογενετικού παράγοντα sFlt-1 σε σύγκριση με τις κυήσεις που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου [Zhou et al, 2002]. Microarray αναλύσεις έχουν επίσης καταλήξει στην παρατήρηση ότι η παραγωγή των παραγόντων sFlt-1 και ενδογλίνη ενισχύεται σε επίπεδο mRNA στην

προεκλαμψία και η μεταβολή αυτή συνδυάζεται με γενικότερη απορρύθμιση αγγειογενετικών παραγόντων [Cox et al, 2011].

Παρά όμως την εντατική έρευνα που πραγματοποιείται, δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί αν οι αλλαγές που έχουν παρατηρηθεί στα κυκλοφορούντα επίπεδα αυτών των παραγόντων οφείλονται αποκλειστικά στις αντίστοιχες μεταβολές στην έκφραση τους στον πλακούντα ή επηρεάζονται και από το αγγειακό σύστημα της μητέρας. Οι μελέτες που πραγματεύονται την έκφραση ορισμένων παραγόντων στον πλακούντα έχουν στόχο να συνεισφέρουν στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του πλακούντα αλλά αποτελούν και ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα για το πως η βασική έρευνα μπορεί να τροφοδοτήσει την κλινική έρευνα και να οδηγήσει σε αλλαγές που μπορούν να έχουν εφαρμογή στην πράξη. Σε αυτό το πλαίσιο, όλοι οι παράγοντες που προαναφέραμε (VEGF, PlGF, sFlt-1 και ενδογλίνη) έχουν μελετηθεί στον μητρικό ορό σε κυήσεις με προεκλαμψία και αξιολογούνται ως πιθανοί βιοδείκτες για τη πρόβλεψη και διάγνωση της νόσου σε διαφορετικά τρίμηνα της κύησης [Jardim et al, 2015].

Σύμφωνα με νεότερα ερευνητικά αποτελέσματα, εκτός από τον πλακουντιακό ιστό, το αγγειακό δίκτυο ή/και άλλοι τύποι κυττάρων στη μήτρα μπορεί επίσης να είναι μη φυσιολογικοί στις κυήσεις με προεκλαμψία. Είναι γνωστό ότι οι γυναίκες με ιστορικό προεκλαμψία έχουν αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν σε μεταγενέστερο στάδιο νόσο του καρδιαγγειακού συστήματος. Αν στην προεκλαμψία, η "αποτυχία" των κυτταροτροφοβλαστών να αναδιαμορφώσουν τις μητριαίες αρτηρίες οφείλεται και σε βλάβη στο υπόστρωμα είναι ένα ερώτημα που αναμένεται να απαντηθεί. Η μη σωστή αλληλεπίδραση των δύο αυτών συστημάτων στην κύηση αποτελεί μία πρώτη ένδειξη μίας γενικότερης βλάβης του αγγειακού δικτύου της μητέρας? Ένα άλλο στοιχείο που συνηγορεί υπέρ αυτής της άποψης είναι η πιο συχνή επίπτωση της προεκλαμψίας σε γυναίκες με προϋπάρχουσα υπέρταση. Μία πρόσφατη μελέτη επίσης αναφέρει διαταραχή στην αγγειογένεση στον φθαρτό στην ομάδα αυτών των ασθενών [Liu et al, 2015]. Για ορισμένους κυτταρικούς τύπους, μεταβολές στην έκφραση τους στο φθαρτό έχουν περιγραφεί ήδη από τα πρώτα στάδια της κύησης προτού εκδηλωθούν τα πρώτα κλινικά σημεία της προεκλαμψίας. Επιπρόσθετα, υπέρ-έκφραση του παράγοντα VEGF στο φθαρτό

έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση συνδρόμου με παρόμοια χαρακτηριστικά με την προεκλαμψία σε ποντίκια [Fan et al, 2014]. Αναλυτικά, στη συγκεκριμένη μελέτη, οι συγγραφείς έδειξαν ότι στις γυναίκες με προεκλαμψία, η έκφραση του παράγοντα sFlt-1 αυξάνεται στα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα και παράλληλα όπως αναφέρθηκε, παρατηρείται αύξηση του παράγοντα VEGF στα μητρικά κύτταρα του φθαρτού. Επίσης, η έκφραση του sFlt-1 σε αρχέγονα τροφοβλαστικά κύτταρα φαίνεται να αυξάνει σε απάντηση στην έκφραση του VEGF. Υπάρχουν πλέον ισχυρά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι τα αυξημένα επίπεδα του sFlt-1 στον πλακούντα είναι μία από τις κύριες αιτίες της δυσλειτουργίας του αγγειακού του δικτύου μέσω της ανταγωνιστικής δράσης που ασκεί στους παράγοντες VEGF και PlGF. Η αιτία όμως αυτής της αύξησης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Σε ζωικό μοντέλο που αναπτύχθηκε στην ίδια μελέτη, φάνηκε ότι η υπέρ-έκφραση του VEGF αποκλειστικά στο ενδομήτριο επάγει την παραγωγή του sFlt-1 στον πλακούντα και αυξημένα επίπεδα του στη μητρική κυκλοφορία. Η αλληλουχία αυτή των γεγονότων οδήγησε σε αυτόματες αποβολές, διαταραχές του αγγειακού δικτύου στον πλακούντα και εκδήλωση συμπτωμάτων που προσομοιάζουν αυτά της προεκλαμψίας όπως υπέρταση και πρωτεινουρία στη μητέρα. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή υποστηρίζει ότι μία τοπική αύξηση του VEGF στο ενδομήτριο είναι δυνατό να επάγει μία αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης του sFlt-1 στον πλακούντα και να οδηγήσει στην εκδήλωση προεκλαμψίας.

2.2 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ & ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Οι διαταραχές που μπορεί να συμβούν κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης στον πλακούντα είναι πιθανό να οδηγήσουν σε καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης κατά την ενδομήτριο ζωή (IUGR). Υπάρχουν πλέον αρκετά δεδομένα που υποστηρίζουν αυτή τη συσχέτιση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρατήρηση ότι υπάρχει σημαντική μείωση στην πυκνότητα των αγγείων στις λάχνες σε

πλακούντες από IUGR κυήσεις [Chen et al, 2002]. Επίσης, οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι σε αυτή την κατηγορία κυήσεων, τα κύτταρα τόσο στην τροφοβλάστη όσο και στο στρώμα έχουν μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού [Chen et al, 2002]. Άλλες μελέτες έχουν επίσης δείξει μείωση στη συνολική επιφάνεια, τον όγκο αλλά και τον αριθμό των τελικών λαχνών όπως και ελάττωση στον αριθμό των τριχοειδών στο στρώμα του πλακούντα σε IUGR κυήσεις συγκριτικά με φυσιολογικές κυήσεις [Chen et al, 2002]. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να ευθύνονται και για την αυξημένη αντίσταση στη ροή αίματος στην ομφαλική αρτηρία που παρατηρείται στα έμβρυα με περιορισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Αν και οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους οι διαταραχές στην αγγείωση ενέχονται στην εκδήλωση IUGR δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί, μεταβολές στην έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων στον πλακουντιακό ιστό έχουν παρατηρηθεί στην ομάδα αυτή των κυήσεων [Arroyo and Winn, 2008]. Για παράδειγμα, η ανοσοιστοχημική χρώση για τον παράγοντα VEGF-A έχει βρεθεί να είναι μειωμένη σε λάχνες από IUGR πλακούντες ενώ είναι αξιοσημείωτο ότι η χρώση για τον PlGF βρέθηκε να είναι αυξημένη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε αντίφαση με την πλειοψηφία των μελετών που έχουν μετρήσει τη συγκέντρωση του PlGF στη μητρική κυκλοφορία και βρίσκουν μείωση των επιπέδων του στις IUGR κυήσεις [Khaliq et al, 1996]. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζωικά μοντέλα [Regnault et al, 2003]. Μία επίσης ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι σε πειραματικά μοντέλα η αναστολή της έκφρασης του VEGF-A μπορεί να επάγει την εκδήλωση IUGR φαινοτύπου ενώ αντίστοιχα η αναστολή της έκφρασης του PlGF δεν έχει την ίδια επίδραση [Odorisio et al, 2002]. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των δημοσιευμένων μελετών καθιστούν αναγκαία τη διενέργεια μελλοντικών εργασιών στο πεδίο αυτό. Είναι όμως ήδη φανερό ότι η μεταβολή στα επίπεδα των παραγόντων αυτών ενέχεται στην παθοφυσιολογία της ανάπτυξης του αγγειακού δικτύου στον πλακούντα σε κυήσεις με περιορισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Εκτός όπως από τους αγγειογενετικούς παράγοντες, και οι αντί-αγγειογενετικοί παράγοντες που εκφράζονται στον πλακούντα έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι ο παράγοντας sVEGFR-1, τα

επίπεδα έκφρασης του οποίου στον πλακούντα έχουν βρεθεί αυξημένα σε κύσεις με IUGR [Maynard et al, 2003]. Ο τρόπος δράσης του sVEGFR-1 μεσολαβείται από τη σύνδεση του με τους παράγοντες VEGF και PlGF που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των συγκεντρώσεων των ελεύθερων κλασμάτων τους στην κυκλοφορία διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο την αλληλεπίδραση των μορίων αυτών με τους υποδοχείς τους και προκαλώντας δυσλειτουργία στο ενδοθήλιο. Όλα αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχει μία λεπτή ισορροπία μεταξύ παραγόντων που προωθούν και παραγόντων που αναστέλλουν την αγγειογένεση στον πλακούντα σε μία φυσιολογική κύηση. Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής που μπορεί να συμβεί με πολλούς μηχανισμούς, οδηγεί στην εμφάνιση επιπλοκών της κύησης όπως ο περιορισμός της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Μία άλλη παράμετρος που επίσης σχετίζεται με την εκδήλωση IUGR είναι η υποξία. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αναπαραγωγή συνθηκών παροδικής υποξίας στη μητροπλακουντιακή μονάδα μπορεί να προκαλέσουν ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης πιστοποιώντας το σημαντικό ρόλο της ρύθμισης του οξυγόνου [Tanaka et al, 1994]. Μία πιθανή αιτία για την υποξία μπορεί να είναι η αποτυχία σωστής αναδιαμόρφωσης του αγγειακού δικτύου από τη πλευρά της μητέρας, γεγονός που είναι απαραίτητο για την εξέλιξη της κύησης. Όπως και στις κύσεις με προεκλαμψία, έτσι και στις IUGR κύσεις, τα τροφοβλαστικά κύτταρα αποτυγχάνουν να τροποποιήσουν τις σπειροειδείς αρτηρίες σε αγγεία με χαμηλές αντιστάσεις και υψηλές ροές, γεγονός που οδηγεί στο να δημιουργηθούν συνθήκες υποξίας. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η υποξία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων και να οδηγήσει σε ανεπάρκεια του πλακούντα [Khong et al, 1986].

3. ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

3.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Η προεκλαμψία είναι μία νόσος που εμφανίζεται στην κύηση και έχει σημαντικές επιπτώσεις τόσο για τη μητέρα όσο και για το έμβρυο και αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες μητρικής θνησιμότητας. Ο ορισμός της προεκλαμψίας σύμφωνα με τα κατευθυντήριες οδηγίες του American College of Obstetrics and Gynaecology βασίζεται στο συνδυασμό των α) αύξηση της αρτηριακής πίεσης > 140/90 mmHg με πρώτη εμφάνιση μετά την 20^η εβδομάδα κύησης σε γυναίκες χωρίς ιστορικό υπερτασικής νόσου και β) πρωτεινουρίας όπως αυτή ορίζεται με την παρουσία λευκώματος >300mg σε συλλογή ούρων 24ώρου ή την ύπαρξη λευκώματος περισσότερο από δύο σταυρούς (++) σε stick ούρων [ACOG, 2013]. Η προεκλαμψία περαιτέρω μπορεί να διακριθεί σε ήπια, μέτρια και σοβαρή ανάλογα με την ακριβή κλινική εικόνα των σημείων και συμπτωμάτων που έχει η μητέρα. Μία άλλη διάκριση που επίσης συναντάται στη βιβλιογραφία είναι ανάλογη με την εβδομάδα κύησης όπου περατώθηκε ο τοκετός, δηλαδή αν ο τοκετός πραγματοποιήθηκε πριν ή μετά τις 34 εβδομάδες κύησης. Με βάση αυτό το κριτήριο η νόσος διακρίνεται σε πρώιμης και όψιμης μορφής [Kraus and Nicolaidis, 2015]. Η προεκλαμψία αν δεν αναγνωρισθεί και ρυθμιστεί έγκαιρα με φαρμακευτική αγωγή μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση επιπλοκών όπως η εκλαμψία (τονικοκλονικοί σπασμοί) και

συνδρόμου HELLP (αιμολυτική αναιμία, αυξημένα ηπατικά ένζυμα και μειωμένα αιμοπετάλια) με δραματικές συνέπειες για τη μητέρα και το έμβρυο.

Τα όρια της μέτρησης της αρτηριακής πίεσης για την κατηγοριοποίηση της προεκλαμψίας σε ήπια, μέτρια και σοβαρή μορφή είναι [ACOG, 2013].

- ✚ Ήπια – διαστολική πίεση 90–99 mmHg και συστολική πίεση 140–149 mmHg.
- ✚ Μέτρια- διαστολική πίεση 100–109 mmHg και συστολική πίεση 150–159 mmHg
- ✚ Σοβαρή- διαστολική πίεση > 110 mmHg, συστολική πίεση > 160 mmHg.

Πίνακας 1. Κριτήρια σοβαρής προεκλαμψίας [ACOG 2013].

- Συστολική αρτηριακή πίεση ≥ 160 mmHg ή διαστολική αρτηριακή πίεση ≥ 110 mmHg σε δύο διαδοχικές μετρήσεις
- Θρομβοπενία (αριθμός αιμοπεταλίων $< 100.000/\text{microliter}$)
- Διαταραχή της ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας και επιπτώσεις απο το ΚΝΣ
- Οπτικές διαταραχές

3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν διεξάγει σημαντικές μελέτες με αντικείμενο την πρόβλεψη της προεκλαμψίας είτε στο πρώτο είτε στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης με τη δημιουργία προβλέπτικών αλγορίθμων που θα μπορούν να ανγνωρίζουν την ομάδα γυναικών με υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν τη νόσο. Η ομάδα αυτών των εγκύων θα ενταχθεί σε διαφορετικό σύστημα παρακολούθησης κατά την προγεννητική περίοδο και στις γυναίκες αυτές μπορεί να δοθεί ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους ή ασπιρίνη ώστε να μειωθεί η επίπτωση της νόσου [Grandone et al, 2015]. Η κεντρική ιδέα πίσω από τη δημιουργία των προβλεπτικών αυτών βασίζεται στις μελέτες από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Nicolaides ο οποίος πρώτος εισήγαγε την έννοια της ανάστροφης πυραμίδας στον προγεννητικό έλεγχο δηλαδή ότι με τα κατάλληλα προβλεπτικά μοντέλα ήδη από το πρώτο τρίμηνο της κύησης υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης των κυήσεων με αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν κάποια επιπλοκή της κύησης της οποίας τα κλινικά συμπτώματα θα εμφανιστού στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης [Nicolaides et al, 2011].

Προτού εισαχθούν τα μοντέλα αυτά στην κλινική πράξη, η αναγνώριση των γυναικών που έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν προεκλαμψία γινόταν με την καταγραφή ορισμένων παραγόντων κινδύνου για τη νόσο [Poon and Nicolaides, 2014]. Οι παράγοντες αυτοί κινδύνου αφορούν χαρακτηριστικά της μητέρας, το οικογενειακό ιστορικό και το μαιευτικό ιστορικό. Η ευαισθησία της πρόβλεψης μόνο με την καταγραφή αυτών των στοιχείων δεν είναι ικανοποιητική (30-40%) αλλά αποτελεί τη βάση και πρέπει ο ιατρός ή η μαία να συλλεγούν με ιδιαίτερη

προσοχή αυτά τα στοιχεία [Wright et al, 2012]. Αναλυτικά, πρέπει να καταγράφεται ο τόκος, η μέθοδος σύλληψης (αυτόματη/εξωσωματική γονιμοποίηση), η ηλικία, προυπάρχοντα νοσήματα (υπερτασική νόσος, σακχαρώδης διαβήτης, νεφρική νόσος). Επίσης, πρέπει η έγκυος να ερωτάται για το αν υπάρχει θετικό οικογενειακό ιστορικό για προεκλαμψία ή αν είχε η ίδια εκδηλώσει τη νόσο σε προηγούμενη κύηση. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει επιγραμματικά τους παράγοντες κινδύνου για προεκλαμψία.

Πίνακας 2. Παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση προεκλαμψίας.

- ✚ Πρωτοτοκός
- ✚ Πολύδυμη κύηση
- ✚ Ηλικία μητέρας > 40 έτη
- ✚ Εξωσωματική γονιμοποίηση
- ✚ Αυξημένος δείκτης μάζας σώματος
- ✚ Ιστορικό προεκλαμψίας στην προηγούμενη εγκυμοσύνη
- ✚ Προυπάρχουσα υπερτασική/νεφρική νόσος
- ✚ Θρομβοφιλία/Αυτοάνοσα νοσήματα
- ✚ Σακχαρώδης διαβήτης

Οι νεότερες μελέτες προχώρησαν πάνω σε αυτή τη βάση και επεδίωξαν να βελτιώσουν την ευαισθησία πρόβλεψης της προεκλαμψίας με την προσθήκη βιοχημικών ουσιών που παράγονται από τον πλακούντα και ανευρισκόνται στη μητρική κυκλοφορία. Ο βιοχημικός δείκτης που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για το σκοπό αυτό είναι η ορμόνη PAPP-A που ήδη μετράται κατά το χρόνο του υπερηχογραφήματος πρώτου τριμήνου ως μέρος του ελέγχου διαλογής για χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η ορμόνη αυτή παράγεται από τον πλακούντα και έχει παρατηρηθεί ότι είναι μειωμένη σε κυήσεις που μεταγενέστερα θα εκδηλώσουν προεκλαμψία ή/και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης [Poon et al, 2013]. Πιο

πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη σημασία που έχει ο αγγειογενετικός παράγοντας PlGF ως μεμονωμένος δείκτης ή σε συνδυασμό με τον υποδοχέα του sFlt-1 στην πρόβλεψη της προεκλαμψίας. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας PlGF έχει μειωμένα επίπεδα στη μητρική κυκλοφορία σε κυήσεις που έχουν εκδηλώσει ή πρόκειται να εκδηλώσουν προεκλαμψία. Αντιθέτως, ο υποδοχέα sFlt-1 (soluble Fms-like tyrosine kinase receptor-1) κυκλοφορεί σε αυξημένα επίπεδα στο μητρικό πλάσμα όπου δεσμεύει και ακολούθως απενεργοποιεί τον παράγοντα PlGF [Kleinrouweler et al, 2012]. Μελέτες για τις μεταβολές στις συγκεντρώσεις αυτών των βιοχημικών παραμέτρων έχουν πραγματοποιηθεί και στα τρία τρίμηνα της κύησης.

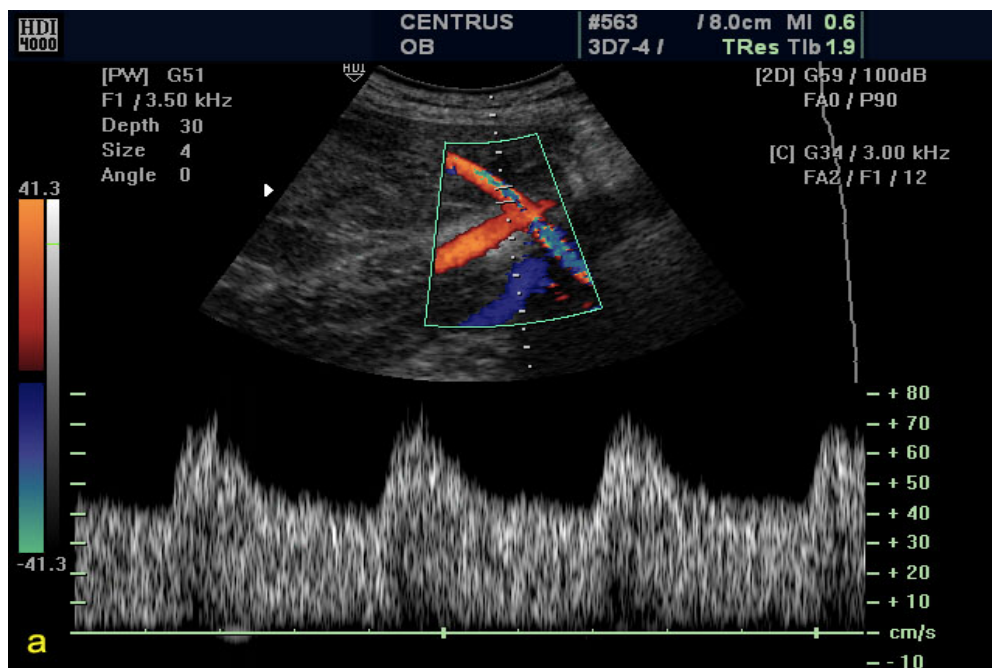
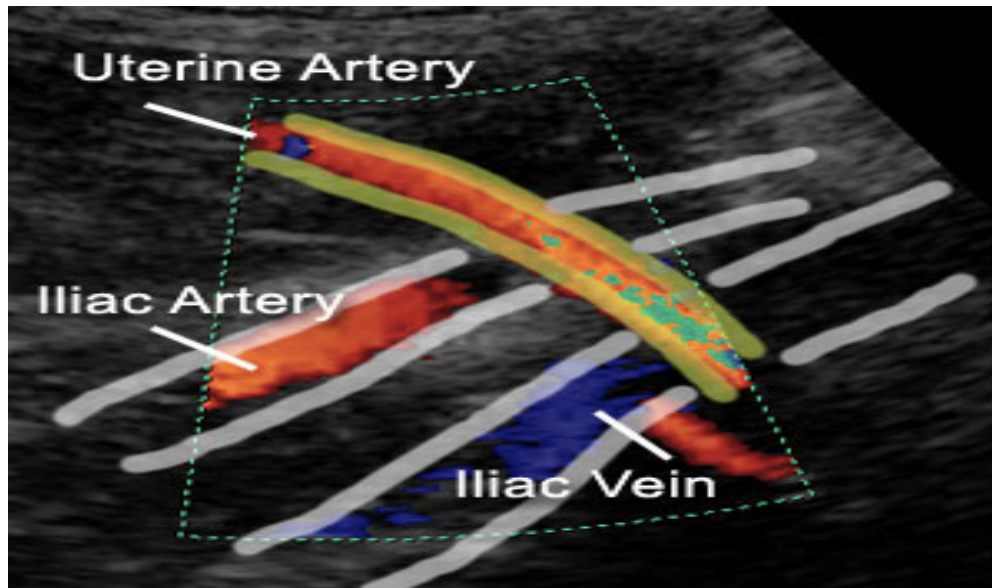
Εκτός όμως από τους δύο αυτούς παράγοντες, πλήθος άλλων βιοχημικών παραμέτρων έχει μελετηθεί σε κυήσεις με προεκλαμψία. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν δείκτες με αγγειογενετική/άντι-αγγειογενετική δράση, φλεγμονώδη/άντι-φλεγμονώδη δράση, ανοσολογικές ιδιότητες ή/και σχετίζονται με το οξειδωτικό stress. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι:

- ✚ Placental protein 13
- ✚ Activin –A
- ✚ Resistin
- ✚ Inhibin-a
- ✚ A-fetoprotein

Η πλειονότητα των μελετών που παρουσιάζουν μοντέλα της προεκλαμψίας, εκτός από το ιστορικό και βιοχημικές παραμέτρους χρησιμοποιούν και το δείκτη παλμικότητας (pulsatility index, PI) των μητριαίων αρτηριών. Το PI υπολογίζεται ως η διαφορά μεταξύ μέγιστης συστολικής ταχύτητας (S) και της τελοδιαστολικής ταχύτητας (D) διαιρούμενη με τη μέση ταχύτητα (Vm) [Khalil and Nicolaides, 2013]. Ο δείκτης παλμικότητας των μητριαίων αρτηριών είναι αυξημένος ήδη από το πρώτο τρίμηνο σε κυήσεις που θα επιπλακούν αργότερα με προεκλαμψία ή/και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Η μέτρηση της ροής στα μητριαία αγγεία με χρήση Doppler μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με διακοιλιακό είτε με διακολπικό υπερηχογράφημα.

Εικόνα 4. Υπερηχογραφική απεικόνιση α) μητριαίας αρτηρίας και β) της Doppler μέτρησης της ροής στο αγγείο αυτό

(https://sonoworld.com/client/fetus/html/doppler/capitulos-html/chapter_04.htm)



4. ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης ορίζεται ως η κατάσταση όπου το έμβρυο αναπτύσσεται κάτω από ένα συγκεκριμένο όριο το οποίο διαφέρει μεταξύ διαφορετικών μελετών και είναι είτε η 5^η είτε η 10^η εκ θέση στη εκάστοτε καμπύλη αναφοράς που χρησιμοποιείται για το εκτιμώμενο βάρος [Figueras and Gratacos, 2014]. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία για να χαρακτηρίσουν ένα έμβρυο το οποίο είναι μικρό είναι είτε SGA (small-for-gestational age) είτε IUGR (intrauterine growth restriction) και η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο αυτών υπό-ομάδων είναι ότι στη δεύτερη υπό-ομάδα συνυπάρχει και παθολογική ροή στα αγγεία του εμβρύου (abnormal Dopplers) [Figueras and Gratacos, 2014]. Επίσης υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην παρακολούθηση, στο χρόνο τοκετού και στο περιγεννητικό αποτέλεσμα μεταξύ των δύο αυτών ομάδων. Μία άλλη κατηγοριοποίηση που συναντάται σε νεότερες μελέτες αφορά τη διάκριση σε ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης πρώιμης και όψιμης έναρξης. Το χρονικό όριο που χρησιμοποιείται για τη διάκριση αυτή διαφέρει μεταξύ διαφορετικών μελετών, συνήθως όμως είναι οι 37 εβδομάδες στον τοκετό [Savchev et al, 2014]. Οι ομάδες αυτές έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά αναφορικά με την κλινική αντιμετώπιση, την ύπαρξη υποκείμενης πλακουντιακής νόσου, τη συσχέτιση με προεκλαμψία καθώς και τα ποσοστά περιγεννητικής θνησιμότητας και νοσηρότητας.

Η αιτιολογία της ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης είναι πολυπαραγοντική

- ✚ Ιδιοσυστασιακά “μικρά” έμβρυα για την ηλικία κύησης (constitutional SGA) που αποτελούν και τη μεγάλη πλειοψηφία
- ✚ Χρωμοσωμικές ανωμαλίας/γενετικά σύνδρομα
- ✚ Περιβαλλοντικοί παράγοντες
- ✚ Λοιμώξεις του εμβρύου
- ✚ Πλακουντιακή ανεπάρκεια
- ✚ Μητρικά νοσήματα (υπερτασική νόσος, νεφρική νόσος, αυτοάνοσα νοσήματα)

Νεότερες μελέτες έχουν αναδείξει τη σημασία που έχει το υπερηχογράφημα ειδικά στο τρίτο τρίμηνο για την έγκαιρη αναγνώριση ενός εμβρύου το οποίο αναπτύσσεται κάτω από την 5^η/10^η εκ θέση. Μία κομβική μελέτη από τους [Lidqvist and Molin, 2005] απέδειξε ότι η προγεννητική διάγνωση ενός SGA εμβρύου μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο για ενδομήτριο θάνατο και πτωχό περιγεννητικό αποτέλεσμα. Η παρατήρηση αυτή έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες [Richardus et al, 2003]. Μία άλλη πολύ σημαντική μελέτη σε αυτό το πεδίο έδειξε ότι η προφυλακτική χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης από το πρώτο

τρίμηνο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 50% την πιθανότητα γέννησης νεογνού με χαμηλό βάρος [Bujold et al, 2010].

4.1 ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε και στην παραπάνω παράγραφο, είναι πολύ σημαντική η έγκαιρη αναγνώριση ενός IUGR/SGA νεογνού. Πρώτο βήμα είναι η σωστή καταγραφή και αναγνώριση παραγόντων κινδύνου που προδιαθέτουν στην εμφάνιση ενός IUGR/SGA νεογνού όπως

- + Ηλικία μητέρας
- + Τόκος
- + Δείκτης μάζας σώματος
- + Κάπνισμα
- + Μέθοδος σύλληψης
- + Διαιτητικοί παράγοντες
- + Ιστορικό ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης /προεκλαμψίας στην προηγούμενη κύηση
- + Μητρικά νοσήματα στην παρούσα κύηση (υπερτασική νόσος, νεφρική νόσος, αυτοάνοσα νοσήματα)

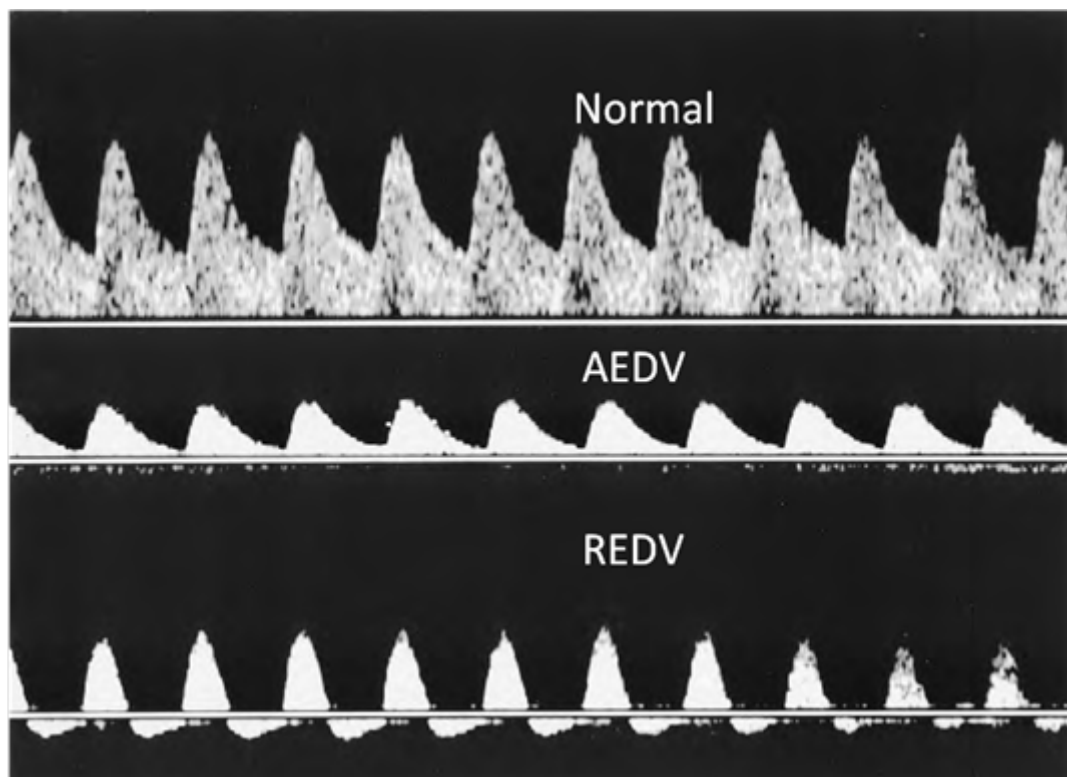
Αρκετές μελέτες έχουν δημοσιευτεί έκτοτε για την έγκαιρη πρόβλεψη ενός SGA νεογνού με βάση δημογραφικά χαρακτηριστικά, βιοχημικές και βιοφυσικές παραμέτρους. Οι Poop et al (2013) συγκέντρωσε στοιχεία από 30.000 κυήσεις που προσήλθαν για το υπερηχογράφημα πρώτου τριμήνου και μετέπειτα δημιούργησε

ένα μοντέλο πρόβλεψης για τη γέννηση ενός SGA νεογνού σε κυήσεις χωρίς συνυπάρχουσα προεκλαμψία [Roos et al, 2011]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, τα μητρικά χαρακτηριστικά μπορούν να προβλεψουν το 34% των παθολογικών κυήσεων με 10% ψευδώς θετικά αποτελέσματα και αυτό το ποσοστό μπορεί να αυξηθεί σε 37% αν προστεθούν οι υπόλοιπες μετρήσεις (αυχενική διαφάνεια, PAPP-A, β-hCG). Μεταγενέστερες μελέτες επεδίωξαν να αυξήσουν την ευαισθησία της μελέτης αυτής προσθέτοντας και άλλους βιοχημικούς δείκτες [Karagiannis et al, 2011].

Η παρακολούθηση των κυήσεων αυτών γίνεται με βάση τις Doppler μετρήσεις της αιματικής ροής σε διάφορα αγγεία του εμβρύου όπως η ομφαλική αρτηρία, η μέση εγκεφαλική αρτηρία και ο φλεβώδης πόρος. Η αιματική ροή στα αγγεία αυτά παρουσιάζει σταδιακά μεταβολές που καθορίζουν το πως πρέπει να γίνει η παρακολούθηση της κύησης και τότε πρέπει να παρθεί η απόφαση για το χρόνο και τρόπο τοκετού. Ένα κομβικό σημείο για την απόφαση τοκετού είναι το πότε το έμβρυο θα παρουσιάσει ανακατανομή κυκλοφορίας δηλαδή θα προσπαθήσει να αυξήσει την αιματική ροή στα πιο σημαντικά όργανα όπως είναι ο εγκέφαλος, το μυοκάρδιο και τα επινεφρίδια. Η ανακατανομή είναι αποτέλεσμα της προσαρμογής του εμβρύου στο περιβάλλον υποξίας και υποθρεψίας που αναπτύσσεται [Alfirevic et al, 2010]. Η μέτρηση της ροής στην ομφαλική αρτηρία είναι πλέον καθιερωμένη εξέταση για να διαγνωστεί ένα IUGR έμβρυο [Εικόνα 5]. Η μέτρηση της αιματικής ροής στην ομφαλική αρτηρία με τη χρήση Doppler αποτελεί οδηγό σημείο για την παρακολούθηση της IUGR κύησης [Figueras et al, 2008].

Νεότερη παράμετρος Doppler παρακολούθησης είναι ο δείκτης CPR (cerebro-placental ratio). Ο λόγος CPR είναι ο λόγος του δείκτη παλμικότητας (PI) της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας με το PI της ομφαλικής αρτηρίας. Ο δείκτης αυτός σε κυήσεις με IUGR δείχνει αύξηση της αντίστασης στον πλακούντα και μείωση στην αγγειακή αντίσταση στον εγκέφαλο του εμβρύου.

Εικόνα 5. Απεικόνιση της αιματικής ροής στην ομφαλική αρτηρία με χρήση Doppler υπερηχογραφίας.



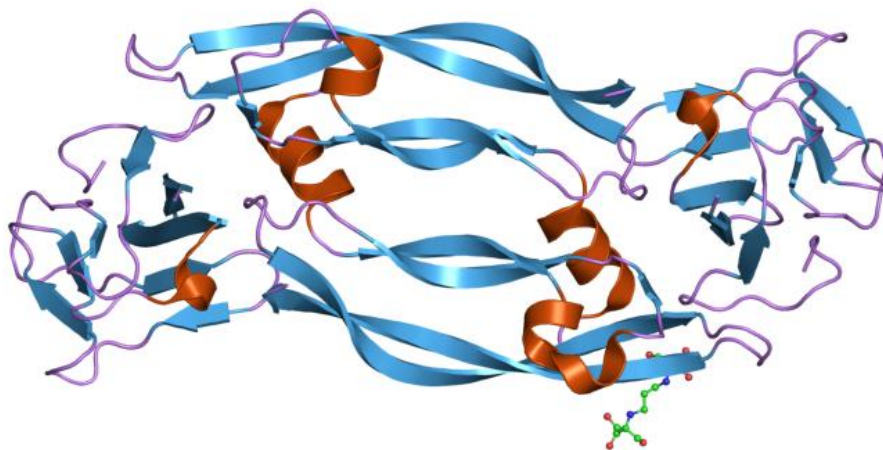
5. PLACENTAL GROWTH FACTOR (PlGF) & sFlt-1

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, ο κυριότερος υποκείμενος μηχανισμός της προεκλαμψίας φαίνεται να είναι η διαταραχή στη διαδικασία της πλακουντοποίησης, δηλαδή η ανεπαρκής διείσδυση του τροφοβλαστικού ιστού στις σπειροειδείς αρτηρίες [Pijnenborg et al, 1991; Plasencia et al, 2007]. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται στη βιβλιογραφία έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την πιθανή προβλεπτική αξία διαφόρων αγγειογενετικών παραγόντων σε επιπλοκές της κύησης οι οποίες σχετίζονται με διαταραχή στην πλακουντοποίηση όπως η προεκλαμψία και η ενδομήτρια καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης. Μεταξύ των παραγόντων που έχουν μελετηθεί, το σύμπλοκο της πρωτεΐνης PlGF και του υποδοχέα του sFlt-1 φαίνεται να μεταβάλλονται σημαντικά σε κυήσεις με επιπλοκές πλακουντιακής αιτιολογίας και συνεπώς μελετάται εκτενώς η προβλεπτική τους αξία είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με δημογραφικά χαρακτηριστικά, βιοφυσικούς παράγοντες και άλλες βιοχημικές παραμέτρους.

Ο παράγοντας PlGF είναι ένας αυξητικός παράγοντας ο οποίος ανήκει στη VEGF οικογένεια που συμμετέχει στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αγγεία και είναι γνωστό ότι δεσμεύεται στον υποδοχέα sflt-1 (fms-like tyrosine kinase receptor). Στη φυσιολογική κύηση, η συγκέντρωση του PlGF στη μητρική κυκλοφορία φαίνεται να αυξάνεται σταδιακά μέχρι περίπου τις 33 εβδομάδες κύησης και να μειώνεται μετά μέχρι τον τοκετό [Levine et al, 2004]. Μελέτη που έχει γίνει σε ανθρώπινο πλακουντιακό ιστό από τελειόμηνες κυήσεις έδειξε ότι η έκφραση του PlGF εντοπίζεται κυρίως στη συγκυτιακή μεμβράνη και στο τοίχωμα των μεγάλων αιμοφόρων αγγείων που βρίσκονται στις λάχνες ενώ η ανοσοιστοχημική χρώση στο μεσέγγυμα ήταν ασθενής και διάσπαρτη [Khaliq et al, 1996]. Επιπλέον, οι συγγραφείς αναφέρουν μέτρια θετική χρώση για τον PlGF σε διακριτά κύτταρα στο χόριο αλλά όχι στο επιθηλιακό στρώμα στο άμνιο [Khaliq et al, 1996]. Οι συγγραφείς στη μελέτη αυτή καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο PlGF μπορεί να ασκεί

παρακρινή δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων στη διαδικασία της αγγειογένεσης στον πλακούντα και παράλληλα να έχει και αυτοκρινή δράση στη λειτουργία της τροφοβλάστης. Σύμφωνα με ερευνητικά δεδομένα που έχουν παρουσιαστεί, ο PlGF συμμετέχει στη χημειοταξία για τα μονοκύτταρα και δρα συνεργικά με τον VEGF αλλά ο ακριβής ρόλος αυτής της κυτοκίνης δεν έχει πλήρως προσδιοριστεί [Odorisio et al, 2002]. Αρχικά οι ερευνητές επεδίωξαν να μελετήσουν τον τρόπο δράσης αυτού του παράγοντα με τη χρήση διαγονιδιακών ζωικών μοντέλων. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις που προέκυψαν, ο PlGF έχει ισχυρή αγγειογενετική δράση τόσο στην εμβρυική περίοδο όσο και στην ενήλικη ζωή. Η υπέρ-έκφραση του παράγοντα αυτού οδηγεί σε σημαντική αύξηση στον αριθμό αλλά και το μέγεθος των αγγείων και ενισχύει τη διαπερατότητα τους [Odorisio et al, 2002].

Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής δομής του παράγοντα PlGF



Αναφορικά με τον παράγοντα PlGF στις κυήσεις με προεκλαμψία, η πλειονότητα των μελετών αφορά το πως μεταβάλλονται τα επίπεδα του στη μητρική κυκλοφορία πριν και μετά την κλινική εκδήλωση της νόσου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έχουν δημοσιευτεί, η προεκλαμψία σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του προαγγειογενετικού παράγοντα PlGF και αρκετές μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι κατά την κλινική φάση της νόσου, η συγκέντρωση του PlGF είναι μειωμένη [Crispi et al, 2006; Ohkuchi et al, 2007]. Αυτή η μείωση στα επίπεδα του PlGF στο μητρικό ορό φαίνεται να προηγείται της κλινικής εκδήλωσης της προεκλαμψίας και παρατηρείται ήδη από το πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της κύησης [Krauss et al, 2004; Tidwell et al, 2001]. Επίσης μελέτες στο δεύτερο τρίμηνο έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός του δείκτη παλμικότητας στις μητριάιες αρτηρίες με τη συγκέντρωση του PlGF στο μητρικό ορό καθώς και του υποδοχέα sFlt-1, που έχει αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες, μπορεί να έχει προβλεπτική αξία σε κυήσεις με προεκλαμψία [Esposito et al, 2007; Stepan et al, 2007]. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η παρατήρηση ότι στις κυήσεις με προεκλαμψία, η μείωση στα επίπεδα του PlGF είναι εμφανής από το πρώτο τρίμηνο, σημαντική αύξηση στα επίπεδα του sFlt-1 έχει καταγραφεί περίπου 5 εβδομάδες πριν την κλινική εκδήλωση της νόσου [Levine et al, 2004].

Μία κομβική case-control μελέτη για τη σημασία που έχει η μέτρηση των επιπέδων του PlGF στη μητρική κυκλοφορία στο πρώτο τρίμηνο για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας πραγματοποιήθηκε το 2008 σε ένα δείγμα 127 παθολογικών κυήσεων (29 περιστατικά πρώιμης προεκλαμψίας και 98 περιστατικά όψιμης προεκλαμψίας) σε σύγκριση με 609 φυσιολογικές κυήσεις [Akolekar et al, 2008]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, τα επίπεδα του PlGF ήταν ελαττωμένα στις κυήσεις με πρώιμη και όψιμη προεκλαμψία σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών κυήσεων ακόμα και μετά τη μετατροπή των τιμών που προέκυψαν σε MoM, δηλαδή την εξομάλυνση τους για μία σειρά παραμέτρων (βάρος μητέρας, κάπνισμα, φυλή, CRL του εμβρύου). Αναλυτικά, η συγκέντρωση του PlGF στις 11-13⁺⁶ εβδομάδες κύησης στις φυσιολογικές κυήσεις, αυξάνεται με το CRL του εμβρύου, δηλαδή την ηλικία κύησης, μειώνεται με το βάρος της μητέρας και είναι υψηλότερο στις καπνίστριες. Συνεπώς, όπως συμβαίνει και με το PAPP-A, η

απόλυτη τιμή της συγκέντρωσης του PIGF πρέπει να εξομαλυνθεί ως προς αυτές τις παραμέτρους προτού γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις παθολογικές κύσεις. Σημαντική είναι επίσης η παρατήρηση ότι υπάρχει μία σημαντική συσχέτιση του PIGF με το βαθμό σοβαρότητας της προεκλαμψίας όπως αυτό ορίζεται από την εβδομάδα κύησης που πραγματοποιήθηκε ο τοκετός και την εκατοστιαία θέση του βάρους γέννησης του εμβρύου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προγενέστερες μελέτες που ανέφεραν ότι τα επίπεδα του PIGF είναι μειωμένα όχι μόνο κατά την κλινική φάση της νόσου αλλά και στο πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της κύησης [Krauss et al, 2004; Crispi et al, 2006]. Στις ίδιες μελέτες, έγινε επιπλέον σύγκριση των συγκεντρώσεων του PIGF σε κύσεις με πρώιμη και σε κύσεις με όψιμη προεκλαμψία και παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του παράγοντα αυτού είναι χαμηλότερες στην πρώιμη προεκλαμψία [Krauss et al, 2004; Crispi et al, 2006]. Αυτό είναι πολύ σημαντικό γιατί είναι η πρώιμη μορφή της νόσου παρά η όψιμη που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για νοσηρότητα και θνητότητα στην περιγεννητική περίοδο [vonDadelszen et al, 2003].

Επιπλέον, οι συγγραφείς παρουσίασαν ένα προβλεπτικό μοντέλο με αρκετά ικανοποιητική απόδοση που περιλαμβάνει τη μέτρηση του PIGF στον ορό της μητέρας, το δείκτη παλμικότητας στις μητριαίες αρτηρίες, δημογραφικά στοιχεία της μητέρας καθώς και στοιχεία από το μαιευτικό ιστορικό. Επίσης, παρατηρήθηκε στην ομάδα των κύσεων με προεκλαμψία μία συσχέτιση μεταξύ του PIGF και του δείκτη παλμικότητας στις μητριαίες αρτηρίες, κάτι που είναι συμβατό με το ρόλο που έχει ο παράγοντας αυτό στην ανάπτυξη του πλακούντα. Η ευαισθησία του προβλεπτικού αυτού μοντέλου αναφέρεται να είναι 90% για την πρώιμη προεκλαμψία (τοκετός πριν τις 34 εβδομάδες κύησης) και 49% για την όψιμη προεκλαμψία (τοκετός μετά τις 34 εβδομάδες κύησης) για ένα ποσοστό 10% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων [Akoletkar et al, 2008]. Η δημιουργία προβλεπτικών μοντέλων και η εφαρμογή τους στην κλινική πράξη αποτελούν πρωτεύοντα στόχο για την εμβρυομητρική ιατρική αφού η έγκαιρη αναγνώριση της ομάδας των γυναικών υψηλού κινδύνου για την εκδήλωση προεκλαμψίας μπορεί να βελτιώσει το περιγεννητικό αποτέλεσμα.

Οι μεταβολές στα επίπεδα του παράγοντα PlGF έχουν επίσης μελετηθεί σε κύσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Ενώ η ενδομήτρια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του εμβρύου όπως και η προεκλαμψία θεωρούνται επιπλοκές της κύησης που οφείλονται στον πλακούντα, υπάρχουν διαφορές στην παθοφυσιολογία των δύο επιπλοκών. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε Doppler μετρήσεις των μητριάων αρτηριών, αυξημένη αντίσταση στην αιματική ροή παρατηρείται κυρίως σε κύσεις που εκδήλωσαν προεκλαμψία και σε πολύ μικρότερο βαθμό σε κύσεις με IUGR νεογνά [Yu et al, 2008]. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν ότι η συγκέντρωση του PlGF στη μητρική κυκλοφορία είναι μειωμένη σε κύσεις που επιπλέκονται με τη γέννηση ενός λιποβαρούς νεογνού χωρίς να συνυπάρχει προεκλαμψία [Erez et al, 2008; Poon et al, 2008]. Αναλυτικά, οι Thadhani et al. (2004) υποστήριξαν ότι τα επίπεδα του PlGF στο μητρικό ορό στη 10η εβδομάδα κύησης σε 40 κύσεις με SGA νεογνά ήταν χαμηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε ένα σύνολο 80 κύσεων που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου [Thadhani et al. 2004]. Η διαφορά βέβαια αυτή έπαψε να είναι στατιστικά σημαντική όταν οι τιμές εξομαλύνθηκαν για διάφορους συμπαράγοντες όπως η φυλή, το κάπνισμα και ο δείκτης μάζας σώματος. Οι Erez et al (2008) έδειξαν ότι η συγκέντρωση του PlGF στις 12 (6-15) εβδομάδες κύησης σε ένα πληθυσμό 145 κύσεων που κατέληξαν στη γέννηση ενός SGA νεογνού ήταν κατά μέσο όρο 15% χαμηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα των κύσεων με νεογνά φυσιολογικού βάρους γέννησης. Στο ίδιο πνεύμα με αυτές τις μελέτες, οι Smith et al (2007) μέτρησαν τα επίπεδα του PlGF στις 10-14 εβδομάδες κύησης σε 333 κύσεις με SGA νεογνά και σε 937 κύσεις με νεογνά φυσιολογικού βάρους γέννησης και παρουσίασαν μία αντίστροφη συσχέτιση ανάμεσα στον παράγοντα αυτό και το ρίσκο για γέννηση SGA νεογνού.

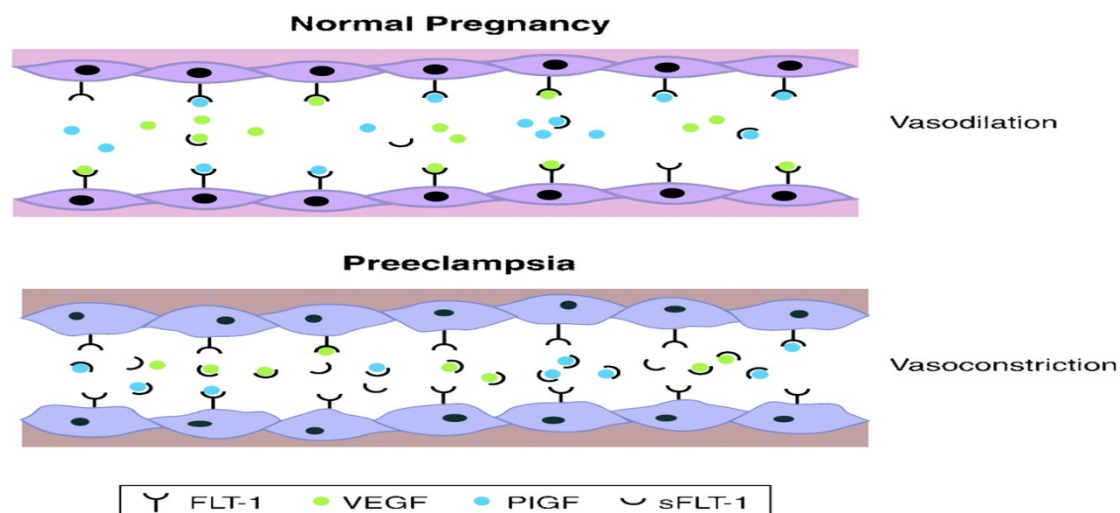
Μία case-control μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγμα 296 κύσεων με SGA νεογνά χωρίς να εκδηλώνεται προεκλαμψία, εξέτασε το πως συσχετίζονται τα επίπεδα του PlGF και του PAPP-A στο μητρικό ορό με το δείκτη παλμικότητας στις μητριάιες αρτηρίες (PI) στο πρώτο τρίμηνο της κύησης [Poon et al, 2008]. Το νεογνό χαρακτηρίζεται ως SGA όταν το βάρος γέννησης είναι κάτω από την 5η εκατοστιαία θέση αφού ληφθούν υπόψη μία σειρά από παράγοντες όπως η ηλικία κύησης στον τοκετό, το φύλο, η εθνικότητα, το βάρος και το ύψος της μητέρας και ο τόκος. Η

ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι τα επίπεδα PIGF και PAPP-A στο μητρικό ορό ήταν μειωμένα στην ομάδα των SGA κυήσεων σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών κυήσεων. Επίσης, οι συγγραφείς παρουσίασαν ένα μοντέλο πρόβλεψης που συνδυάζει παράγοντες από το ιστορικό της μητέρας και τη μέτρηση των βιοχημικών παραμέτρων PIGF και PAPP-A στο μητρικό ορό και έχει δυνατότητα αναγνώρισης του 27% των κυήσεων με SGA νεογνό με 5% ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων [Poop et al, 2008]. Μία μεταγενέστερη αναδρομική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αρκετά μικρότερο όμως δείγμα επίσης συμφωνεί στο ότι ο PIGF μπορεί να αναγνωρίσει προγεννητικά έμβρυα με ενδομήτρια καθυστέρηση στην ανάπτυξη [Benton et al, 2011]. Η άμεση σύγκριση όμως μεταξύ των αποτελεσμάτων από διαφορετικές μελέτες που έχουν δημοσιευτεί δεν είναι πάντα εφικτή γιατί δεν υπάρχει ομοιογένεια στον τρόπο που ορίζεται η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και επιλέγονται τα παθολογικά περιστατικά. Οι Benton et al (2011) μελέτησαν τα επίπεδα του PIGF σε 9 κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και μη φυσιολογική μορφολογία πλακούντα σύμφωνα με κριτήρια που αναφέρονται στη μεθοδολογία της μελέτης, σε 7 κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και φυσιολογική μορφολογία πλακούντα και σε 79 ανεπίπλεκτες μονήρεις κυήσεις. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, θετικό PIGF test βρέθηκε και στις 9 κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης πλακουντιακής αιτιολογίας, σε μία από τις 7 κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και φυσιολογικό πλακούντα και σε 4 από τις 79 κυήσεις που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Αν και όπως προαναφέρθηκε το δείγμα αυτό είναι μικρό για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα, τα αποτελέσματα αυτά μεταφράζονται στο ότι η μέτρηση του PIGF στη μητρική κυκλοφορία μπορεί να διακρίνει την καθυστέρηση στην εμβρυϊκή ανάπτυξη που οφείλεται σε ανεπάρκεια του πλακούντα από ένα έμβρυο που είναι ιδιοσυστασιακά μικρό για τη δεδομένη ηλικία κύησης με 100% ευαισθησία και 86% ειδικότητα.

sFlt-1

Η πλειοψηφία των μελετών που έχουν δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία πιστοποιούν ότι ο υποδοχέας sFlt-1 που εκφράζεται στον πλακούντα και έχει ανταγωνιστική δράση ως προς τους παράγοντες PlGF και VEGF, εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα στις κυήσεις με προεκλαμψία που μειώνονται μετά τον τοκετό (Εικόνα 7) [Maynard et al, 2003]. Σύμφωνα με μία *in vitro* μελέτη, τα αυξημένα επίπεδα sFlt-1 στην προεκλαμψία συσχετίζονται με μειωμένα κυκλοφορούντα επίπεδα των PlGF και VEGF οδηγώντας σε δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, κατάσταση η οποία μπορεί να αντιστραφεί με την εξωγενή χορήγηση PlGF και VEGF [Maynard et al, 2003]. Οι ερευνητές επίσης παρατήρησαν ότι χορήγηση sFlt-1 σε ποντίκια στην περίοδο της κύησης επάγει την εκδήλωση υπέρτασης και πρωτεϊνουρίας που αποτελούν κύρια συμπτώματα της προεκλαμψίας.

Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης του sFlt-1 στις κυήσεις με προεκλαμψία. Στη φυσιολογική κύηση, οι παράγοντες PlGF και VEGF δεσμεύονται στον Flt-1 που βρίσκεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στις κυήσεις με προεκλαμψία, αυξάνονται τα επίπεδα του παράγοντα sFlt-1 που δεσμεύει τους PlGF και VEGF και αναστέλλει τη δέσμευση τους με τον Flt-1 στην επιφάνεια των κυττάρων. (Εικόνα από Davison et al, 2004).



6. ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΕΣ

Οι αγγειοποιητίνες αποτελούν μία οικογένεια αγγειογενετικών παραγόντων που απαρτίζεται από τέσσερα μέλη (Ang-1, Ang-2, Ang-3 και Ang-4) από τα οποία τα πιο άρτια περιγεγραμμένα είναι οι Ang-1 και Ang-2 και οι δύο υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (Tie-1 και Tie-2) [Thurston et al, 2003]. Κατά τη διάρκεια της κύησης, οι αγγειοποιητίνες παράγονται κυρίως από τον πλακούντα και φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και στην αναδιαμόρφωση του αγγειακού δικτύου (Εικόνα 8). Συγκεκριμένα, οι παράγοντες αυτοί δρουν συνεργικά με την οικογένεια του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF και συμμετέχουν κυρίως στα όψιμα στάδια της αγγειογένεσης [Thomas and Augustin, 2009]. Προγενέστερες μελέτες έχουν δείξει ότι η Ang-1 αλλά και η Ang-2 δεσμεύονται με παρόμοια συγγένεια στον υποδοχέα Tie-2, έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα [Maisonpierre et al, 1997]. Εκτός από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι ένας διακριτός πληθυσμός μονοκυττάρων που ονομάζονται TEM (Tie-2 expressing monocytes) καθώς και κάποιες πρόδρομες μορφές αιμοποιητικών κυττάρων επίσης έχουν την ιδιότητα να εκφράζουν τον υποδοχέα Tie-2 [Coffelt et al, 2010]. Ο άλλος υποδοχέας που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία είναι ο υποδοχέας Tie-1 ο οποίος έχει ασθενή δράση κινάσης αλλά ο λειτουργικός του ρόλος δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί [Augustin et al, 2009].

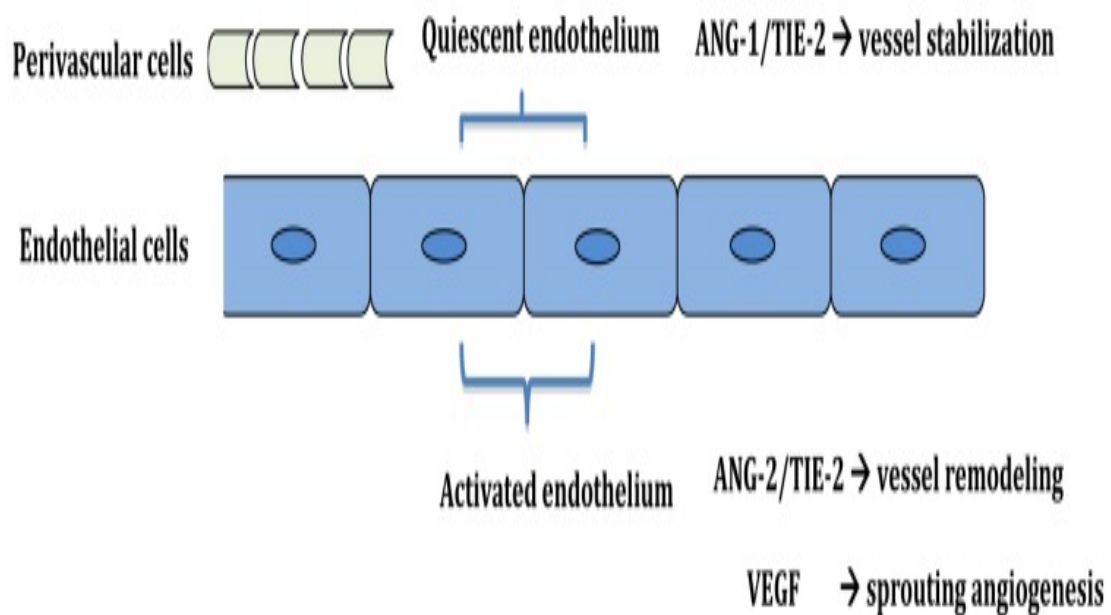
Παρά το γεγονός ότι οι Ang-1 και Ang-2 χαρακτηρίζονται από παρόμοια πρωτεϊνική δομή (η Ang-2 είναι κατά 60% ομόλογη με την Ang-1), οι βιολογικές ιδιότητες των δύο αυτών μορίων διαφέρουν σημαντικά [Maisonpierre et al, 1997]. Η Ang-1 δρα ως παρακρινής αγωνιστής του Tie-2, οδηγεί σε διμερισμό του υποδοχέα και επάγει τη φωσφορυλίωση του σε αρκετά σημεία στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση συγκεκριμένων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως τα μονοπάτια ERK (extracellular signal-regulated kinase) και PI3-kinase/AKT που με τη σειρά τους ενεργοποιούν μία σειρά από σημαντικές βιολογικές διεργασίες σε μοριακό επίπεδο [Khan et al, 2014]. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού AKT οδηγεί στην αναστολή έκφρασης της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων FOXO και μειώνει την έκφραση μίας

σειράς πρωτεϊνών όπως η Ang-2, η ESM1 (endothelial-cellspecific molecule 1) και ο αυξητικός παράγοντας PlGF [Daly et al, 2004]. Λειτουργικά, η Ang-1 έχει ενισχυτικό ρόλο στην αναδιοργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δομική ακεραιότητα των αιμοφόρων αγγείων επιδρώντας στα περί-ενδοθηλιακά κύτταρα. Μία επιπρόσθετη ιδιότητα της Ang-1 είναι η αναστολή της ενεργοποίησης του αγγειακού ενδοθηλιακού φραγμού και της μετακίνησης των λευκοκυττάρων στους ιστούς όπως αυτή επάγεται από παράγοντες φλεγμονής [Thurston et al, 2000]. Αναφορικά με την Ang-2, έχει περιγραφεί σε βασικές γραμμές η δράση της αλλά δεν έχει πλήρως διελευκανθεί ο ρόλος της σε συγκεκριμένες συνθήκες που συσχετίζονται με παθολογική αγγειογένεση όπως η φλεγμονή και η νεοπλασματική νόσος. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η Ang-2 δεσμεύεται στον υποδοχέα Tie-2 αλλά σε πρώτο σκοπό δρα ως ανταγωνιστής της Ang-1. Αναλυτικά, η Ang-2 προκαλεί διάσπαση των συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών και των περι-αγγειακών κυττάρων και συμμετέχει στον κυτταρικό θάνατο και την υποστροφή των αγγείων. Επιπλέον, η Ang-2 καθιστά τα ενδοθηλιακά κύτταρα πιο "ευαίσθητα" στη δράση του VEGF, ένας παράγοντας με σαφώς περιγεγραμμένη αγγειογενετική δράση [Maisonpierre et al, 1997]. Όμως, σε περίπτωση όπου οι συνθήκες που επικρατούν στο μικροπεριβάλλον δεν ευνοούν τη διαδικασία της αγγειογένεσης, η Ang-2 προκαλεί απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και υποστροφή των αγγείων [Maisonpierre et al, 1997].

Νεότερα δεδομένα όμως έρχονται να αμφισβητήσουν την κυρίαρχη μέχρι τώρα θεώρηση για την ανταγωνιστική σχέση μεταξύ των δύο αυτών μορίων. Πρόσφατες μελέτες υποστήριξαν ότι σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης, η Ang-2 έχει τη δυνατότητα να δράσει ως αγωνιστής του υποδοχέα Tie-2 σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων [Daly et al, 2013]. Στην ίδια γραμμή με αυτή την παρατήρηση, σε μία προηγούμενη πειραματική μελέτη, όταν το γονίδιο της Ang-2 αντικαταστήθηκε με cDNA που κωδικοποιούσε την Ang-1 ο φαινότυπος παρέμεινε σε μεγάλο βαθμό ίδιος [Gale et al, 2002]. Συμπερασματικά, η Ang-2 θεωρείται πλέον ότι μπορεί να συμπεριφερθεί είτε ως αγωνιστής είτε ως ανταγωνιστής του υποδοχέα Tie-2 ανάλογα με τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο δρα. Μια πρόσφατη μελέτη επίσης ανέφερε ότι η

Ang-2 ασκεί και δράσεις που δε διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα Tie-2, όπως το να συνδέεται με τις ιντεγκρίνες που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Tie-2 [Felcht et al, 2012]. Επιπλέον, πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η Ang-2 έχει την ικανότητα να τροποποιεί την απαντητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο παράγοντας TNF (tumor necrosis factor)-α και καθιστά αυτά τα κύτταρα πιο ευένδοτα σε μία φλεγμονώδη αντίδραση μέσω ενός αυτοκρινούς μηχανισμού [Fiedler et al, 2006]. Ανεξάρτητα από τον εκτενώς μελετημένο ρόλο της οικογένειας των αγγειοποιητινών στο ενδοθήλιο των αγγείων, οι παράγοντες αυτοί ενέχονται επίσης στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων και στη ρύθμιση της απελευθέρωσης του νιτρικού οξειδίου κατά τη διαδικασία της πλακουντοποίησης.

Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου της οικογένειας των αγγειοποιητινών και του υποδοχέα Tie-2 στην ακεραιότητα και αναδιαμόρφωση του αγγειακού δικτύου [Καρρου et al, 2014].



Στη βιβλιογραφία, η πλειονότητα των μελετών που αφορούν την οικογένεια των αγγειοποιητινών πραγματεύονται το ρόλο που έχουν οι παράγοντες αυτοί σε διάφορους τύπους νεοπλασματικής νόσου. Συγκεκριμένα, μεταβολή στην έκφραση των Ang-1 και Ang-2 έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος μαστού, ο καρκίνος ωθηκών, το μελάνωμα και ο μη μικροκυτταρικός όγκος του πνεύμονα [Karru et al, 2014]. Πολύ ελπιδοφόρα είναι επίσης τα αποτελέσματα για την πιθανή χρήση ειδικών αναστολέων της Ang-2 ως αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες στοχεύοντας τα νεόπλαστα αγγεία του όγκου με στόχο να εμποδίσουν την περαιτέρω ανάπτυξη του [Mazzieri et al, 2011]. Επιπλέον, ο ακριβής ρόλος των αγγειοποιητινών έχει εκτενώς μελετηθεί σε άλλες παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από αναδιαμόρφωση του αγγειακού δικτύου όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και η σήψη.

6.1 ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΗΣΗ

Απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους οι αγγειοποιητίνες ενέχονται στην παθοφυσιολογία επιπλοκών της κύησης είναι η διερεύνηση του ρόλου των παραγόντων αυτών στη φυσιολογική κύηση. Όπως είναι γνωστό, οι Ang-1 και Ang-2 εκφράζονται στον πλακούντα από τα πρώιμα στάδια της κύησης και μετέχουν σε μια σειρά ενδοθηλιακών και μη ενδοθηλιακών διεργασιών που είναι σημαντικές για τη σωστή ανάπτυξη του πλακούντα [Dunk et al, 2000]. Κατά τη διάρκεια της κύησης, η πλακουντιακή έκφραση της Ang-1 φυσιολογικά αυξάνεται ενώ αντίστοιχα η έκφραση της Ang-2 και του υποδοχέα Tie-2 μειώνεται [Geva et al, 2002]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η συγκέντρωση της Ang-2 στον ορό των γυναικών αυξάνεται σημαντικά από τα πρώτα στάδια της κύησης και φτάνει στα υψηλότερα επίπεδα στο τέλος του πρώτου τριμήνου. Στην ίδια μελέτη, οι συγγραφείς έδειξαν ότι σημαντική πηγή των επιπέδων της Ang-2 κατά την κύηση εκτός από τους κύτταροτροφοβλάστες είναι και τα ενδοθηλιακά κύτταρα του

φθαρτού [Woolnough et al, 2012]. Η έκκριση της Ang-2 από τα κύτταρα αυτά γίνεται είτε μέσω της απελευθέρωσης του παράγοντα αυτού από ενδοκυττάρια αποθήκες είτε μέσω νέο-σύνθεσης της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Η σημασία των μορίων αυτών για τη διαδικασία της πλακουντοποίησης υπογραμμίζεται και από το γεγονός ότι τα επίπεδα mRNA της Ang-2 κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης έχει βρεθεί να είναι 400 φορές υψηλότερα από τα επίπεδα mRNA της Ang-1 και 100 φορές υψηλότερα από τα επίπεδα mRNA του VEGF, ενός παράγοντα με αποδεδειγμένα σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση στον πλακούντα [Geva et al, 2002]. Μία πιθανή ερμηνεία για την πιο ισχυρή έκφραση της Ang-2 σε σχέση με τους άλλους δύο παράγοντες είναι η ιδιότητα της να επιτρέπει την αναδιαμόρφωση των αγγείων στον πλακούντα ώστε να μπορούν να εξυπηρετήσουν τις αυξανόμενες μεταβολικές απαιτήσεις του εμβρύου. Επίσης, μία cross-sectional μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 20 φυσιολογικές κυήσεις το διάστημα 8-41 εβδομάδες κύησης επεσήμανε ότι τα επίπεδα της Ang-2 στο στάδιο της μεταγραφής και στο στάδιο της μετάφρασης συσχετίζονται και μειώνονται σταδιακά όσο πλησιάζει το πέρας της εγκυμοσύνης [Geva et al, 2002]. Κατά την κύηση, ο πλακούντας φαίνεται να είναι η κυριότερη πηγή παραγωγής των κυκλοφορούντων συγκεντρώσεων της Ang-2 αφού τα επίπεδα της στον ορό ελαττώνονται τάχιστα μετά τον τοκετό [Hirokoshi et al, 2007].

Μικρός είναι ο αριθμός των δημοσιεύσεων στη βιβλιογραφία που έχουν περιγράψει το μοτίβο εντοπισμού (localization pattern) των αγγειοποιητινών στον πλακούντα στα διάφορα στάδια της κύησης. Οι Seval et al (2008) έδειξαν ότι στον ανθρώπινο πλακούντα σε πολύ πρώιμο στάδιο της κύησης (ήδη από την 4^η εβδομάδα), η πρωτεϊνική έκφραση της Ang-1 εντοπίζεται αποκλειστικά στη συγκυτιοτροφοβλάστη ενώ η πρωτεϊνική έκφραση της Ang-2 εντοπίζεται κυρίως στη συγκυτιοτροφοβλάστη και σε μικρότερο ποσοστό στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα των χοριακών λαχνών [Seval et al, 2008]. Η περιγραφή αυτή είναι σύμφωνη και με μία προγενέστερη μελέτη από άλλη ερευνητική ομάδα που έδειξε ότι η έκφραση mRNA της Ang-2 είναι έκδηλη κυρίως στη συγκυτιοτροφοβλάστη κατά το πρώτο τρίμηνο [Zhang et al, 2001]. Ιστολογικές μελέτες που έχουν γίνει στον ανθρώπινο πλακούντα έδειξαν ότι υψηλά επίπεδα mRNA της Ang-2 εντοπίζονται

επίσης σε περί-αγγειακά κύτταρα και στρωματικά μακροφάγα στις ανώριμες ενδιάμεσες λάχνες κατά το πρώτο και δεύτερο τρίμηνο και στις ώριμες ενδιάμεσες και τελικές λάχνες κατά το τρίτο τρίμηνο [Geva et al, 2002]. Η Ang-1 επίσης εκφράζεται ασθενώς στα ενδοθηλιακά κύτταρα στις ενδιάμεσες λάχνες, παρατήρηση η οποία συνάδει με το ρόλο του παράγοντα αυτού στην ωρίμανση και σταθεροποίηση του αγγειακού δικτύου [Seval et al, 2008]. Μία από τις πρώτες μελέτες που πραγματοποιήθηκε για αυτό το θέμα, δημοσιεύτηκε από τους Dunk et al (2000) και υποστήριξε ότι η Ang-1 καθώς και ο υποδοχέας Tie-2 ανιχνεύονται και στα δύο στρώματα της τροφοβλάστης στον πλακούντα κατά το πρώτο τρίμηνο ενώ η έκφραση της Ang-2 περιορίζεται στην κύτταροτροφοβλάστη [Dunk et al, 2000]. Στην ίδια εργασία, οι συγγραφείς επίσης επισήμαναν ότι τα μόρια Ang-1 και Ang-2 φαίνεται να έχουν ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία των τροφοβλαστικών κυττάρων μέσω διάφορων μηχανισμών και να ενισχύουν την αύξηση και μετακίνηση των κυττάρων αυτών *in vitro* [Dunk et al, 2000]. Συγκεκριμένα, η Ang-1 μπορεί δυνητικά να δρα ως χημειοτακτικός παράγοντας για τα τροφοβλαστικά κύτταρα ενώ η Ang-2 προάγει τη σύνθεση DNA των κυττάρων αυτών και την απελευθέρωση νιτρικού οξειδίου. Σε πλακούντες από τελειόμηνες κήσεις, η έκφραση mRNA της Ang-1 περιορίζεται περί-αγγειακά στις πρωτογενείς λάχνες υποστηρίζοντας την ωρίμανση των αγγείων ενώ η Ang-2 σε όλη την επιφάνεια των τελικών λαχνών και διατηρεί την πλαστικότητα των αγγείων του πλακούντα [Dunk et al, 2000]. Επιπρόσθετα, οι υποδοχείς Tie-2 εκφράζονται στα τροφοβλαστικά κύτταρα και συμμετέχουν στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των κυττάρων αυτών [Dunk et al, 2000]. Η ετερογένεια που παρατηρείται μεταξύ των μελετών από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες είναι πιθανό να οφείλεται στη διαφορετική ηλικία κύησης όπου έγινε η συλλογή του πλακουντιακού ιστού καθώς και σε διαφορές στη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε.

Σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο οι αγγειοποιητίνες επηρεάζουν την ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου προέρχονται και από πειραματικές μελέτες. Σύμφωνα με μία προηγούμενη μελέτη, ποντίκια με μηδενική μετάλλαξη (null mutation) στο γονίδιο που κωδικοποιεί την Ang-1 απεβίωσαν την 12^η ημέρα κύησης και εμφάνισαν σοβαρές αγγειακές διαταραχές με απορρύθμιση της επικοινωνίας μεταξύ ενδοθηλιακών και περί-αγγειακών κυττάρων [Suri et al,

1996]. Σε μία άλλη μελέτη, τα ποντίκια με γενετικά καθορισμένο έλλειμμα στην έκφραση της Ang-2 εκδήλωσαν σοβαρές ανωμαλίες του αγγειακού και λεμφαγγειακού συστήματος και η πλειοψηφία αυτών απεβίωσε σε διάστημα δύο εβδομάδων μετά τη γέννηση [Gale et al, 2002]. Αντιθέτως, μία νεότερη πειραματική εργασία έδειξε ότι η ενίσχυση της έκφρασης του γονιδίου της Ang-2 ενδομήτρια διαταράσσει την προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξαγγείωση υγρού και τη δημιουργία οιδήματος [Geva et al, 2005]. Αναφορικά με τον υποδοχέα Tie-2, ποντίκια στα οποία το αντίστοιχο γονίδιο δεν εκφράζεται εκδηλώνουν σοβαρές βλάβες του καρδιαγγειακού συστήματος που δεν είναι συμβατές με τη ζωή [Sato et al, 1995]. Τέλος, μία μελέτη από τους Wulff et al (2002) περιέγραψε λεπτομερώς την έκφραση των παραγόντων αυτών σε πλακούντες από πρωτεύοντες οργανισμούς και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα μόρια Ang-1 και Tie-2 μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη και σταθεροποίηση των αγγείων στην εμβρυοπλακουντιακή μονάδα ενώ η Ang-2 συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση τους [Wulff et al, 2002].

6.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΗΣΗ

Η πλειοψηφία των μελετών που εξετάζουν το ρόλο των αγγειογενετικών παραγόντων στην εκδήλωση επιπλοκών της κύησης οι οποίες σχετίζονται με ανεπάρκεια του πλακούντα όπως είναι η προεκλαμψία και η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, έχει επικεντρωθεί στην έκφραση των παραγόντων VEGF και PlGF. Πολύ μικρός είναι ο αριθμός των δημοσιεύσεων οι οποίες αφορούν τη συμμετοχή της οικογένειας των αγγειοποιητινών στην ανάπτυξη αυτών των επιπλοκών.

Ο κύριος όγκος των δημοσιευμένων εργασιών που σχετίζονται με αυτό το θέμα αφορούν την έκφραση των παραγόντων αυτών σε κυήσεις με προεκλαμψία. Είναι αξιοσημείωτο ότι τα αποτελέσματα που έχουν παρουσιαστεί είναι αντιφατικά και

αφορούν μικρά δείγματα. Συνοπτικά, οι Zhang et al (2001) εξέτασαν δείγματα πλακουντιακού ιστού από εννέα γυναίκες με προεκλαμψία που συλλέχτηκαν το διάστημα μεταξύ 31ης-40ης εβδομάδας κύησης και παρατήρησαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της Ang-2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου [Zhang et al, 2001]. Αντιθέτως, δύο προηγούμενες μελέτες υποστήριξαν ότι η έκφραση της Ang-2 αυξάνεται στον πλακούντα σε κυήσεις με προεκλαμψία [Han et al, 2012]. Παρόμοια ετερογένεια παρατηρείται και σε αντίστοιχες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο μητρικό ορό είτε στο διάστημα που προηγείται είτε στο διάστημα που έπεται των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου. Σε κυήσεις με εγκατεστημένη νόσο, η πλειονότητα των μελετών συνηγορεί στο ότι τα επίπεδα των Ang-2 και Tie-2 στη μητρική κυκλοφορία είναι χαμηλότερα σε σχέση με τις φυσιολογικές κυήσεις. Στις 11-13 εβδομάδες κύησης, η συγκέντρωση της Ang-2 στο μητρικό ορό έχει αναφερθεί να είναι είτε χαμηλότερη είτε αμετάβλητη σε γυναίκες οι οποίες μετέπειτα εκδήλωσαν προεκλαμψία [Wang et al, 2007; Akolekar et al, 2009]. Μία άλλη δημοσίευση επίσης υποστηρίζει ότι τα επίπεδα της Ang-1 στο μητρικό ορό το πρώτο τρίμηνο είναι ανεβασμένα σε γυναίκες οι οποίες αργότερα εμφάνισαν προεκλαμψία σε συνδυασμό με περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης [Leinonen et al, 2010]. Οι παραπάνω μελέτες θα παρουσιαστούν αναλυτικά στο ειδικό μέρος.

Ακόμα μικρότερος είναι ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών που αφορούν τον ρόλο των αγγειοποιητινών σε κυήσεις με περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης, παρότι αποτελεί συχνή επιπλοκή με συνέπειες για το έμβρυο τόσο κατά την άμεση περιγεννητική περίοδο όσο και μακροπρόθεσμα. Είναι γνωστό ότι ο πλακουντιακός ιστός από κυήσεις από IUGR κυήσεις, χαρακτηρίζεται από διαταραχή στη διαδικασία αναδιοργάνωσης του αγγειακού δικτύου και στο σχηματισμό των τελικών λαχνών. Στις 11-13 εβδομάδες κύησης, οι Wang et al (2007) έδειξαν ότι τα επίπεδα της Ang-2 στο μητρικό ορό είναι μειωμένα σε 13 κυήσεις οι οποίες σε μεταγενέστερο χρόνο εκδήλωσαν καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης σε σύγκριση με 23 φυσιολογικές κυήσεις που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου [Wang et al, 2007]. Πρέπει όμως να παρατηρήσουμε το γεγονός ότι κατά το σχεδιασμό της μελέτης, οι συγγραφείς δεν ορίζουν με σαφήνεια αν τα IUGR περιστατικά που συμπεριέλαβαν στο σχεδιασμό της μελέτης έχουν ιδιοπαθή χαρακτήρα ή

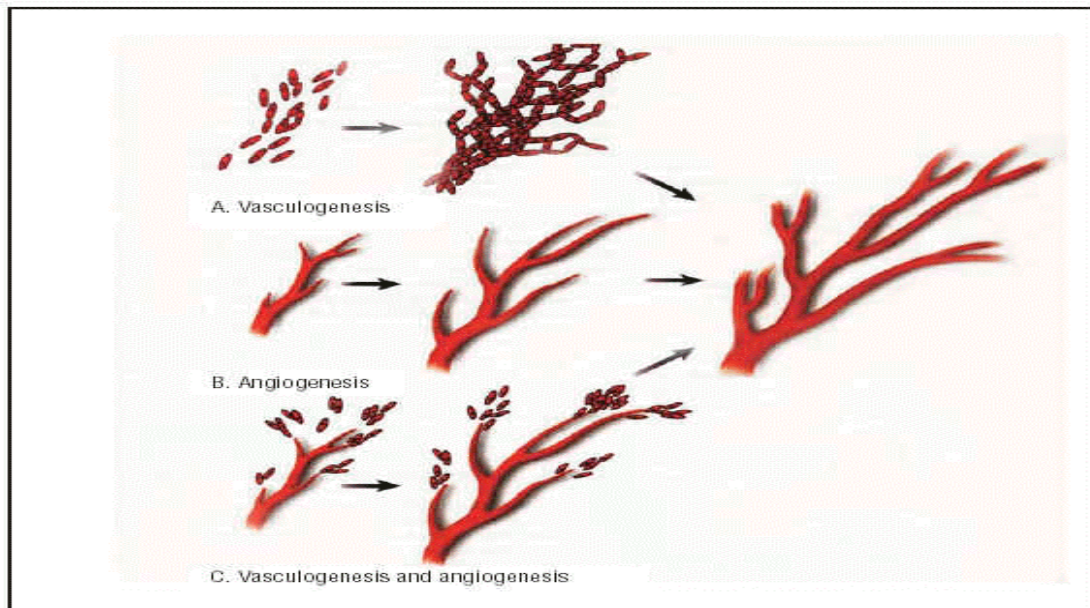
εκδηλώνονται σε έδαφος προεκλαμψίας. Αντιθέτως, μία μελέτη που εξέτασε τα κυκλοφορούντα επίπεδα των παραγόντων Ang-1, Ang-2 και Tie-2 στα διαστήματα 12ης-15ης και 16ης-20ης εβδομάδας κύησης σε 16 γυναίκες με περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης και τα συνέκρινε με τα αντίστοιχα επίπεδα σε 59 ανεπίπλεκτες κύσεις, παρουσίασε αντιφατικά αποτελέσματα [Leinonen et al, 2010]. Συγκεκριμένα, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της Ang-2 στο μητρικό ορό είναι αυξημένα μόνο κατά το διάστημα μεταξύ 16ης-20ης εβδομάδας σε κύσεις που αργότερα εκδήλωσαν ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης [Leinonen et al, 2010]. Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η συμμετοχή των αγγειοποιητινών στην πλακουντοποίηση και πως η μεταβολή στην έκφραση τους προδιαθέτει σε διαταραχές της εμβρυικής ανάπτυξης.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προεκλαμψία επηρεάζει κατά προσέγγιση το 2-7% των κυήσεων και αποτελεί κύρια αιτία μητρικής και περιγεννητικής νοσηρότητας και θνησιμότητας [Steegers et al, 2010]. Είναι πιθανό είτε να εμφανιστεί ως μεμονωμένη επιπλοκή της κύησης είτε σε συνδυασμό με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Όπως παρουσιάστηκε αναλυτικά στο γενικό μέρος, είναι πλέον ερευνητικά αποδεδειγμένο ότι η προεκλαμψία είναι μία νόσος που σχετίζεται με ανεπαρκή πλακουντοποίηση και υποξία του πλακούντα σε συνδυασμό με διαταραχή στην έκφραση και λειτουργία των αγγειογενετικών παραγόντων [Chaiworarongsa et al, 2013]. Συνοπτικά, η φυσιολογική διαδικασία πλακουντοποίησης βασίζεται στην οργάνωση ενός αποτελεσματικού αγγειακού δικτύου το οποίο διαμορφώνεται μέσω δύο διεργασιών: α) η δημιουργία de novo νέων αγγείων (vasculogenesis) και η αναδιαμόρφωση του ήδη υπάρχοντος αγγειακού δικτύου (branching and non-branching angiogenesis) [Maynard and Karumanchi, 2011].

Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση των διεργασιών του de novo σχηματισμού αγγείων (vasculogenesis) και της αναδιοργάνωσης του ήδη εγκατεστημένου αγγειακού δικτύου [Cleaver and Krieg, 1999].



Η οικογένεια των αγγειοποιητινών παίζει σημαντικό ρόλο στα όψιμα κυρίως στάδια της αγγειογένεσης στον πλακούντα [Seval et al, 2008]. Εκτός από τη δράση που έχουν οι αγγειοποιητίνες στον πλακούντα, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι παράγοντες Ang-1 και Ang-2 έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην ωρίμανση και σταθεροποίηση των αγγείων σε διάφορα συστήματα του οργανισμού [Seval et al, 2008]. Και οι δύο αυτοί παράγοντες δεσμεύονται στον ίδιο υποδοχέα Tie-2 αλλά φαίνεται να ασκούν ανταγωνιστικές δράσεις αφού η Ang-1 ενεργοποιεί ενώ η Ang-2 αναστέλλει τον υποδοχέα αυτό [Maisonpierre et al, 1997]. Ο άλλος υποδοχέας που έχει περιγραφεί ονομάζεται Tie-1 και η λειτουργία του δεν είναι σαφώς περιγεγραμμένη [Saharinen et al, 2005]. Ειδικότερα, η Ang-1 ευνοεί τη δομική ακεραιότητα των αγγείων, έχει ρυθμιστική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και αντί-φλεγμονώδεις ιδιότητες [Suri et al, 1998]. Η Ang-2 δρα ως φυσικός ανταγωνιστής της Ang-1 στο ενδοθήλιο και σύμφωνα με τη θεωρία που έχει επικρατήσει, η υπέρ-έκφραση της Ang-2 προκαλεί διαταραχή στη δομή των αγγείων [Maisonpierre et al, 1997]. Παρά το γεγονός ότι το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί κυρίως στους μηχανισμούς με τους οποίους η οικογένεια των αγγειοποιητινών επιδρά στο ενδοθήλιο, τα μόρια αυτά επίσης συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων καθώς και στη ρύθμιση της απελευθέρωσης του νιτρικού οξειδίου κατά την πλακουντοποίηση [Dunk et al, 2000].

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η Ang-1, η Ang-2 αλλά και ο υποδοχέας Tie-2 εκφράζονται στον πλακούντα ήδη από το πρώτο τρίμηνο [Seval et al, 2008]. Στις φυσιολογικές κυήσεις, η πλακουντιακή έκφραση της Ang-1 αυξάνεται ενώ αντίστοιχα η έκφραση των Ang-2 και Tie-2 μειώνεται προοδευτικά όσο η κύηση εξελίσσεται [Geva et al, 2002]. Μελέτες σε knock-out ζωικά μοντέλα επίσης έδειξαν ότι η μη έκφραση των γονιδίων της Ang-1 και του υποδοχέα Tie-2 προκαλεί ενδομήτριο θάνατο ενώ η μη έκφραση της Ang-2 είναι αιτία θνητότητας κατά την περιγεννητική περίοδο ως συνέπεια αγγειακής βλάβης [Suri et al, 1996]. Όμως, σχετικά μικρός είναι ο αριθμός των δημοσιεύσεων που έχουν ως αντικείμενο το ρόλο των αγγειοποιητινών στις κυήσεις με ανεπαρκή πλακουντοποίηση όπως είναι η προεκλαμψία και η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Η πλειοψηφία αυτών των δημοσιεύσεων εξετάζει τα επίπεδα αυτών των παραγόντων στη μητρική κυκλοφορία σε διαφορετικά τρίμηνα της κύησης (Πίνακας 7). Κατά την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, καταγράψαμε μόνο πέντε μελέτες που εξετάζουν την πλακουντιακή έκφραση των αγγειοποιητινών σε κυήσεις με προεκλαμψία σε σχετικά μικρά δείγματα και με αντιφατικά αποτελέσματα [Dunk et al, 2000; Geva et al, 2002; Zhang et al, 2001; Suri et al, 1996; Sung et al, 2011].

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξεταστεί η πλακουντιακή έκφραση των γονιδίων των παραγόντων Ang-1, Ang-2 και Tie-2 σε κυήσεις με προεκλαμψία ως μεμονωμένη νόσο ή σε συνδυασμό με περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης συγκριτικά με φυσιολογικές κυήσεις. Εν συνεχεία, αξιολογήθηκε η συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων αυτών τόσο στις φυσιολογικές όσο και στις παθολογικές κυήσεις.

Πίνακας 7. Συνοπτική παρουσίαση των μελετών που έχουν δημοσιευτεί και εξετάζουν τα επίπεδα των παραγόντων Ang-1, Ang-2 και Tie-2 είτε στον πλακούντα είτε στο μητρικό ορό σε κυήσεις με προεκλαμψία ή/και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης.

Author & year	Specimen	Sample size	Gestational frame in weeks	Pregnancy complication	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Dunk et al. 2000	Placenta	6	28-36	Severe IUGR		NS	
Zhang et al. 2001	Placenta	9	31-40	PE		↓	
Geva et al. 2002	Placenta	5	25-41	Severe PE		NS	
Sung et al. 2011	Placenta	19		PE	NS	NS	NS
Han et al. 2012	Placenta	16	28-41	Severe PE	NS	↑	
Vuorela et al. 1998	Serum	15	14-41	PE	↑	↓	↓
Hirokoshi et al. 2005	Serum	26	25-40	PE		↓	
Nadar et al, 2005	Serum	35	26-40	PE		↓	
Hirokoshi et al. 2007	Serum	30	25-40	PE		↓	
Wang et al 2007	Serum	13	10-13	Severe IUGR		↓	
Gotsch et al. 2008	Serum	112PE + 53SGA	23.4-42.4	PE or SGA			↓
Akolekar et al. 2009	Serum	126	11-13	PE		NS	
Bolin et al. 2009	Serum	19	10-37	PE	↓	↑	
Leiononen et al. 2010	Serum	49 PE + 16 IUGR	12-15 and 16-20	PE or IUGR	NS	↑	NS

Kamal et al. 2011	Serum	68	38+/-2.1	PE	↓	NS	↓
Sung et al. 2011	Serum	19		PE			↓
Han et al. 2012	Serum	16	28-41	Severe PE	NS	↑	

2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Η μελέτη αυτή είναι μία case control μελέτη που συμπεριέλαβε 98 μονήρεις κυήσεις. Στα πλαίσια της μελέτης, έγινε συλλογή πλακουντιακού ιστού από 28 κυήσεις με προεκλαμψία, 30 κυήσεις με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, 30 κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης και 40 φυσιολογικές κυήσεις που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

Η ηλικία κύησης (GA, gestational age) σε ημέρες ορίζεται με βάση την τελευταία έμμηνο ρύση. Σε περιστατικά όπου η περίοδος δεν ήταν σταθερή ή η διαφορά μεταξύ της ηλικίας κύησης με βάση την τελευταία έμμηνο ρύση και το CRL του εμβρύου ήταν μεγαλύτερη από επτά ημέρες, γινόταν διόρθωση της ηλικίας κύησης ως προς το CRL κατά το υπερηχογράφημα στις 11-13 εβδομάδες κύησης. Κατά την ίδια χρονική στιγμή, γινόταν καταγραφή των δημογραφικών στοιχείων της μητέρας, παραμέτρων που αφορούν την κύηση καθώς και το ιατρικό/μαιευτικό ιστορικό της μητέρας. Αναλυτικά, δημιουργήθηκε βάση δεδομένων για την ηλικία, τον τόκο, το προηγούμενο ιατρικό ιστορικό, επιπλοκές που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη, βάρος και ύψος της μητέρας, ηλικία κύησης κατά τον τοκετό, μέθοδος τοκετού καθώς και για το αν η μητέρα ήταν καπνίστρια.

Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κλινικής, πραγματοποιούνταν σε όλες τις κυήσεις υπερηχογράφημα τρίτου τριμήνου που περιελάμβανε εξέταση της βιομετρίας του εμβρύου καθώς και Doppler μετρήσεις ώστε να αξιολογηθεί η αιμοδυναμική κατάσταση του εμβρύου. Όλες οι μετρήσεις τηρούσαν τα κριτήρια που έχουν προσδιοριστεί στις κατευθυντήριες γραμμές της ISUOG (International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology) [Salomon et al, 2011]. Ο υπολογισμός του εκτιμώμενου βάρους (EFW, estimated fetal weight) του εμβρύου γινόταν σύμφωνα με τα εξίσωση Hadlock [Hadlock et al, 1985]. Με τη βοήθεια του έγχρωμου Doppler απεικονιζόταν η ροή στην ομφαλική και μέση εγκεφαλική αρτηρία ώστε να μετρηθεί η δείκτης παλμικότητας στη ροή στα αγγεία αυτά. Στην ομάδα των γυναικών με προεκλαμψία, όσες κυήσεις παρουσίαζαν EFW κάτω από την 5η εκατοστιαία θέση με ή χωρίς διαταραχή των Doppler παρακολουθούνταν

μέχρι τον τοκετό ώστε να καθορισθεί η υπό-ομάδα με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης.

Η συλλογή του πλακουντιακού ιστού γινόταν κατά τον τοκετό σε όλες τις ομάδες των κυήσεων. Μετά την έξοδο του πλακούντα, γινόταν η συλλογή έξι ιστοτεμαχίων από διαφορετικά σημεία του πλακούντα με σκοπό την εξάλειψη του ενδεχομένου τυχόν ετερογένειας των ιστών, από τη μητρική επιφάνεια και με βάθος περίπου 1εκ. Το μέγεθος των ιστοτεμαχίων ήταν κατά προσέγγιση 5χιλ και η διατομή γινόταν με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε δείγμα να περιέχει βασικό φθαρτό αλλά και λάχνες του πλακούντα. Η διατομή των ιστοτεμαχίων δε γινόταν από περιοχές του πλακούντα με έμφρακτα ή αποτιτανώσεις. Στη συνέχεια, προχωρούσαμε στην επεξεργασία τριών ιστοτεμαχίων από κάθε πλακούντα τα οποία ξηπλένονταν προσεκτικά με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με σκοπό την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας πρόσμειξης με μητρικό αίμα. Στη συνέχεια οι ιστοί διατέμονταν και φυλάσσονταν στους -80° C μέχρι την τελική επεξεργασία τους. Η μελέτη έχει εγκριθεί από την επιτροπή Έρευνας και Βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

- **Κριτήρια επιλογής του πληθυσμού της μελέτης**

Τα έμβρυα με βάρος γέννησης μικρότερο ή ίσο από την 5^η εκατοστιαία θέση για τη δεδομένη ηλικία κύησης κατά τον τοκετό, με ή χωρίς διαταραχές στις Doppler μετρήσεις ταξινομούνταν ως IUGR έμβρυα. Για να οριστεί η εκατοστιαία θέση του βάρους του εμβρύου χρησιμοποιήσαμε στην ανάλυση διαγράμματα που προέρχονται από τον Ελληνικό πληθυσμό [Souka et al, 2013]. Διαταραχές στις Doppler μετρήσεις θεωρούνται ο δείκτης παλμικότητας στην ομφαλική αρτηρία πάνω από την 95^η εκατοστιαία θέση ή άλλη ένδειξη αιμοδυναμικής ανακατανομής στο έμβρυο.

Στη παρούσα μελέτη, η διάγνωση για προεκλαμψία τίθεται σύμφωνα με τα κριτήρια που ορίζονται από την International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy [ACOG Practice Bulletin, 2002]. Αναλυτικά, η διάγνωση της προεκλαμψίας τίθεται όταν η συστολική πίεση είναι ≥ 140 mmHg και η διαστολική πίεση είναι ≥ 90 mmHg σε δύο τουλάχιστον διαφορετικές μετρήσεις που απέχουν μεταξύ τους 4 ώρες. Οι μεταβολές αυτές στην αρτηριακή πίεση πρέπει να εκδηλώνονται πρώτη φορά μετά την 20^η εβδομάδα κύησης και να συνοδεύονται από σημαντική πρωτεϊνουρία. Η πρωτεϊνουρία ορίζεται ως ≥ 300 mg πρωτεΐνης σε συλλογή ούρων 24ώρου ή δύο μετρήσεις με πάνω από 2 ++ πρωτεΐνης στη γενική εξέταση ούρων αν δεν είναι δυνατή η συλλογή ούρων 24ώρου. Περιστατικά με προϋπάρχουσα υπέρταση ή εκδήλωση προεκλαμψίας σε έδαφος προϋπάρχουσας υπέρτασης αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Άλλα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη περιλαμβάνουν το διαβήτη τύπου 1 και 2, την προϋπάρχουσα υπέρταση και το σακχαρώδη διαβήτη κύησης. Επίσης, αποκλείστηκαν κατά το σχεδιασμό της μελέτης κυήσεις με χρωμοσωμικές ή/και δομικές ανωμαλίες του εμβρύου καθώς και κυήσεις που κατέληξαν σε ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου. Σε όλες τις κυήσεις, δεν υπήρχαν σημεία λοίμωξης της μητέρας ή του εμβρύου. Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από γυναίκες με φυσιολογική αρτηριακή πίεση που εκπλήρωναν όλα τα προαναφερθέντα κριτήρια για συμμετοχή στη μελέτη, το υπερηχογράφημα τρίτου τριμήνου πρέπει να είναι φυσιολογικό και το βάρος γέννησης των εμβρύων να είναι μέσα στα φυσιολογικά όρια για την ηλικία κύησης που πραγματοποιήθηκε ο τοκετός.

3. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

- **ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA**

Η εκχύλιση RNA από τον πλακουντιακό ιστό σε όλα τα δείγματα και στις τρεις ομάδες κυήσεων έγινε με το αντιδραστήριο TRIzol. Τα δείγματα του πλακουντιακού ιστού διαχωρίστηκαν σε μικρά ιστοτεμάχια και στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν με την προσθήκη 1ml TRIzol. Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη χλωροφορμίου (200 μl) και η φυγοκέντρηση του μείγματος που προέκυψε στις 13,000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο στρώμα που περιείχε το RNA διαχωρίστηκε και τοποθετήθηκε σε ένα ξεχωριστό σωληνάριο Eppendorf για το κάθε δείγμα. Εν συνεχεία, έγινε η προσθήκη 500 μl ισοπροπανολόλης και επανάληψη της φυγοκέντρωσης στις 13,000 rpm για 10 λεπτά. Το ολικό RNA που προέκυψε, ξεπλύθηκε μία φορά με αιθανόλη 75% και διαλυτοποιήθηκε εκ νέου σε 25 μl DEPC-treated water.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA με φωτομέτρηση. Από την απορρόφηση στα 260nm προσδιορίζεται η συγκέντρωση του, ενώ ο λόγος 260nm/280nm δίνει την καθαρότητα του (κατά πόσο υπάρχουν υπολείμματα πρωτεϊνών ή DNA). Λόγοι από 1.8-2.0 θεωρούνται ιδανικοί για το RNA.

- **ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (real-timePCR)**

Η μέθοδος RT-PCR χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA του γονιδίου που μελετάται. Η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Takara RT kit ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ένα (1) μg RNA αναμείχθηκε με H₂O και λίγο (dT) εκκινητών που είχαν προθερμανθεί στους 25⁰C για 5 λεπτά και επωαστεί στους 43⁰C για μία ώρα

παρουσία DNTPs, αντίστροφης μεταγραφάσης και αντιδραστικού διαλύματος που περιείχε $MgCl_2$ (5Mm).

Η real-time PCR πραγματοποιήθηκε με επώαση 0.5 μl cDNA με 8.3 μl H₂O, 1.2 μl primers (εκκινητές) και 10 μl SyBrmastermix διάλυμα σε συνολικό όγκο 20 μl ανά αντίδραση. Οι εκκινητές (mRNA-specific primers) για τους παράγοντες Ang-1, Ang-2 και Tie-2 που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν από προγενέστερες μελέτες [Hou et al, 2008].

Οι ακολουθίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Γονίδιο	Ζεύγος εκκινητών
Ang-1	FP (CAGACTGCAGAGCAGACCAGAA) RP(CTCTAGCTTGTAGGTGGATAATGAATTC)
Ang-2	FP (AAGAGATCAAGGCCTACTGTGACA) RP (TCCTCACGTCGCTGAATAATTG)
Tie-2	FP (CTGTGAAGGGCGAGTTCGA) RP (TGGTAGGAAGGAAGCTTGTTGAC)

Τα δείγματα είχαν υποβληθεί σε 40 ενισχυτικούς κύκλους οι οποίοι συνίστανται από αποσταθεροποίηση στους 95 °C για ένα λεπτό. Η θερμοκρασία αναδιάταξης είχε καθοριστεί στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα για τους εκκινητές που αντιστοιχούν στην Ang-2 και στον υποδοχέα Tie-2 και στους 58 °C για 30 δευτερόλεπτα για τους εκκινητές που αντιστοιχούν στην Ang-1. Η επιμήκυνση της αλυσίδας πραγματοποιήθηκε στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα. Η ποσοτικοποίηση επιτεύχθηκε με τη χρήση συγκεκριμένης καμπύλης για κάθε γονίδιο. Η ομαλοποίηση των επιπέδων μεταγραφής για τους παράγοντες Ang-1, Ang-2 και Tie-2 έγινε με τη χρήση του γονιδίου GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphated hydrogenase) με τη μέθοδο ΔΔCt.

4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Στη στατιστική ανάλυση της μελέτης, εφαρμόστηκε exploratory data analysis για τις περιγραφικές μεταβλητές (descriptive values), ιστογράμματα πιθανοτήτων και το Shapiro–Wilk test για όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Αναγνωρίστηκε σημαντική απόκλιση από την ομαλή κατανομή κατά Gauss για όλους τους πλακουντιακούς παράγοντες.

Η σύγκριση των ομαλά κατανεμημένων συνεχών μεταβλητών έγινε με το unpaired t-test ενώ για τις μη ομαλά κατανεμημένες συνεχείς μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney U test. Το Levene's test χρησιμοποιήθηκε για την εξομάλυνση των διαφορών σε συνδυασμό με το t-test. Το Chi-square test εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών. Εν συνεχεία, έγιναν Post-hoc συγκρίσεις μεταξύ όλων των υπό-ομάδων μετά από διόρθωση Bonferroni για πολλαπλές συγκρίσεις. Η σταθερά του Spearman υπολογίστηκε για όλους τους πιθανούς συνδυασμούς μετά από τροποποίηση για πολλαπλές συγκρίσεις.

Linear regression ανάλυση (ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης) χρησιμοποιήθηκε για να οριστεί η σχέση μεταξύ της έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων με την ηλικία κύηση κατά τον τοκετό. Ακολούθως, έγινε \log_{10} μετατροπή των παραμέτρων που εξετάστηκαν ώστε να δημιουργηθούν Gaussian κατανομές και να μειωθεί η ετεροσκεδαστικότητα. Οι αποστάσεις Cook's distances υπολογίστηκαν για να απομακρυνθούν οι outliers τιμές που επηρέαζαν το στατιστικό μοντέλο. Η Ang-1 παρατηρήθηκε να έχει σημαντική συσχέτιση με την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό. Το επόμενο βήμα ήταν να υπολογιστούν οι \log_{10} transformed Multiples of the Median (MoM) για την Ang-1 (\log_{10} MoM Ang-1) τιμές με την εξίσωση:

$$\text{Log}_{10}\text{MoM Ang-1} = \text{Log}_{10} \text{ measured Ang-1} - \text{Log}_{10} \text{ predicted by the regression equation Ang-1}$$

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από 28 κυήσεις με προεκλαμψία (PE), 30 κυήσεις με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (PE+IUGR) και 40 ανεπίπλεκτες κυήσεις. Τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Δημογραφικά χαρακτηριστικά των γυναικών που απαρτίζουν τον πληθυσμό της μελέτης (α).

	PE	PE+IUGR	Controls	p-value
Περιστατικά	28	30	40	
Ηλικία μητέρας (έτη)	30 (6.1)	30.5 (6.2)	30 (4.2)	0.929 ^c
Ύψος μητέρας (cm)	165 (5.4)	164 (5.6)	162 (6.9)	0.482 ^c
Βάρος μητέρας (kg)	82 (17.6)	79 (16.4)	72 (7.6)	0,05 ^c
Ηλικία κύησης στον τοκετό (ημέρες)	262 (21.6)	237 (27.6)	270 (13.2)	<0.001 ^c
Βάρος γέννησης (gr)	2580 (786)	1465 (627)	3150 (520)	<0.001 ^c
Μέθοδος τοκετού (ΚΤ)	52%	92.9%	29.4%	0.220 ^b
Τόκος (πρωτοτόκος)	72%	73.1%	52.9%	0.002 ^b
Φύλο νεογνού (άρρεν)	49%	53%	48%	0.789 ^b
Κάπνισμα (ναι)	5.6%	6.7%	7.2%	0.768 ^b

a) data presentes as median (SD) or percentage

b) Chi-square test for categorical variables

c) non-parametric Kruskal-Wallis test for continuous variables.

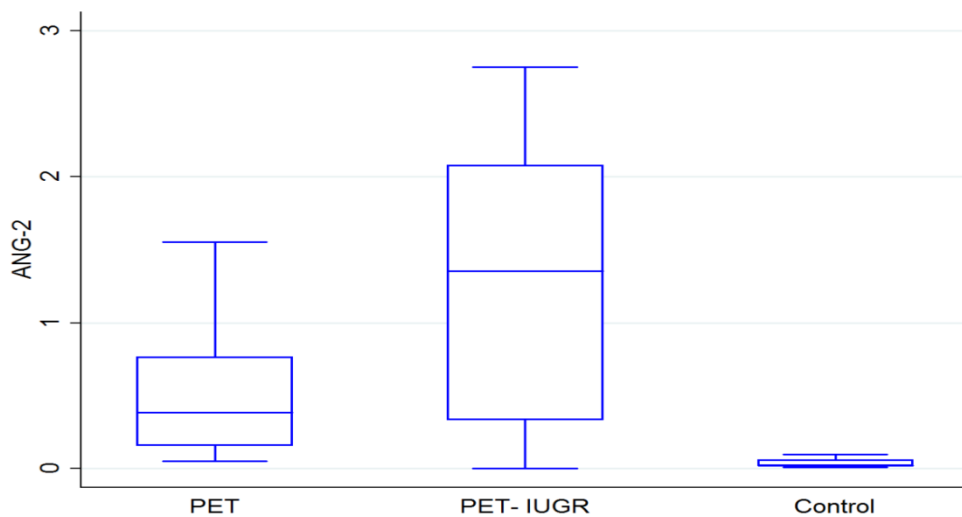
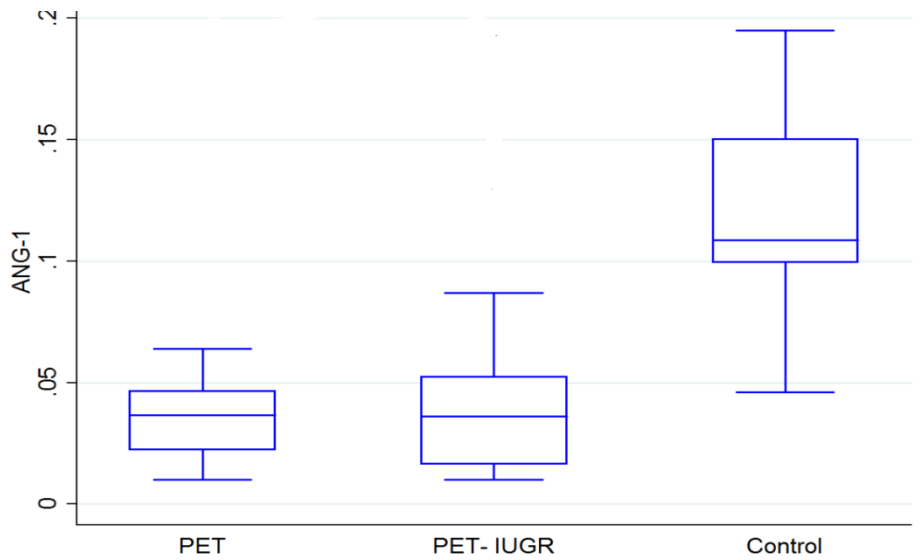
Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς την ηλικία κύησης, το βάρος γέννησης του εμβρύου και του τόκου μεταξύ των τριών υποομάδων [Πίνακας 8]. Συγκεκριμένα, πρέπει να αναφερθεί ένα περιστατικό στην ομάδα PE-IUGR όπου η συλλογή του πλακουντιακού ιστού έγινε στο τέλος του δευτέρου τριμήνου (23.2 εβδομάδες κύησης). Όλα τα άλλα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση αφορούν πλακούντες τρίτου τριμήνου.

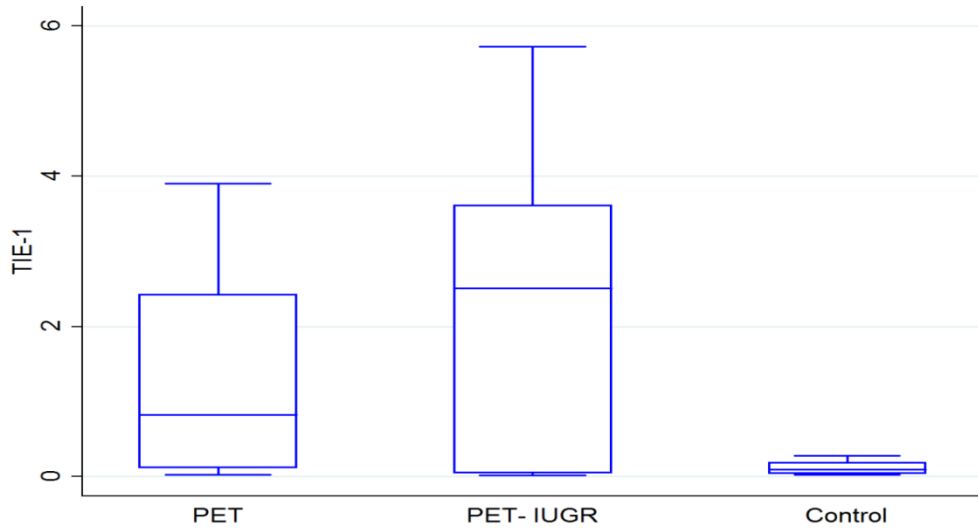
Η exploratory data ανάλυση που έγινε έδειξε ότι όλες οι παράμετροι που εξετάστηκαν, απείχαν σημαντικά από τη κατανομή κατά Gauss (Shapiro–Wilk test, $p < 0.001$ για όλες τις παραμέτρους). Ακολούθως, μη παραμετρικές συγκρίσεις έδειξαν ότι η έκφραση της Ang-1 είναι σημαντικά μειωμένη στις ομάδες PE και PE-IUGR (Πίνακας 9, Εικόνα 10α). Αντιθέτως, τα επίπεδα της Ang-2 και του υποδοχέα Tie-2 ήταν αυξημένα στην ομάδα PE αλλά και στην ομάδα PE-IUGR σε σύγκριση με τις κυήσεις που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου (Πίνακας 9, Εικόνα 10b,c). Posthoc ανάλυση (μη παραμετρικό Mann-Whitney U-test) με διόρθωση Bonferroni έδειξε ότι στις κυήσεις με PE-IUGR παρατηρείται υψηλότερη έκφραση των παραγόντων Ang-2 και Tie-2 σε σύγκριση με τις κυήσεις που εκδήλωσαν μόνο προεκλαμψία (Πίνακας 9, Εικόνα 10b,c).

Πίνακας 9. Univariate συγκρίσεις για τις μεταβλητές που εξετάστηκαν (Ang-1, Ang-2, Tie-2) και στις τρεις ομάδες κυήσεων.

Εξεταζόμενες μεταβλητές	PE group median	PE+ IUGR group median	Control group median	Test (p value)
Ang-1	0.03986	0.04002	0.11554	Mann Whitney (p=0.001)
Ang-2	0.4475	1.7346	0.0242	Mann Whitney (p<0.001)
Tie-2	0.8531	4.5204	0.0932	Mann Whitney (p=0.008)

Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων mRNA στον πλακούντα των παραγόντων Ang-1 (a), Ang-2 (b) και Tie-2 (c) σε φυσιολογικές κυήσεις, σε κυήσεις με προεκλαμψία (PE) και σε κυήσεις με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (PE-IUGR).





Μη παραμετρική ανάλυση των συσχετίσεων μετά από διόρθωση για το family-wise error έδειξε ότι υπάρχει μία θετική συσχέτιση μεταξύ των Ang-2 και Tie-2 στην ομάδα των κύησεων με προεκλαμψία και μάλιστα αυτή η συσχέτιση ήταν πολύ έντονη (Spearman'sRho: 0.8602, $p < 0.0001$). Η ίδια εικόνα παρατηρήθηκε και στην ομάδα κύησεων με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (Spearman'sRho: 0.6342, $p < 0.0001$), αλλά όχι στην ομάδα ελέγχου ($p = 0.6943$). Αναλυτικά, τα αποτελέσματα της μελέτης συσχετίσεων των μορίων αυτών στις διαφορετικές ομάδες παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Επίσης, πραγματοποιήσαμε regression ανάλυση στην ομάδα των φυσιολογικών κύησεων με σκοπό να καθορίσουμε τη σχέση μεταξύ των επιπέδων της Ang-1 και της ηλικίας κύησης κατά τον τοκετό, δηλαδή τη χρονική στιγμή που γίνεται η συλλογή του πλακουντιακού ιστού. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της Ang-1 μειωνόταν σημαντικά όσο αυξανόταν η ηλικία κύησης. Η εξίσωση που περιγράφει αυτή τη συσχέτιση είναι η ακόλουθη:

$$\text{Log}_{10} \text{Ang-1} = 3.799 (p=0.022) - 0.017 \times \text{Gestational age in days} (p=0.007) (R^2 = 0.40, p < 0.001)$$

Για τη λογαριθμική τιμή της Ang-2 δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση με την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό ($p=0.431$). Παρομοίως, για τη λογαριθμική τιμή του Tie-2, δε βρήκαμε σημαντική συσχέτιση με την ηλικία κύησης κατά τον τοκετό ($p=0.893$).

Το επόμενο βήμα ήταν να τροποποιήσουμε τις τιμές \log_{10} Ang-1 για την ηλικία κύησης, μετατρέποντας τις σε \log_{10} Multiples of the Median (\log_{10} MoM Ang-1), όπως περιγράψαμε στην παράγραφο της στατιστικής ανάλυσης. Επιπλέον, επαναλάβαμε τις συγκρίσεις αλλά και την ανάλυση των συσχετίσεων με τους άλλους παράγοντες για την παράμετρο \log_{10} MoM Ang-1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, οι τιμές του \log_{10} MoM Ang-1 ήταν σημαντικά ελαττωμένες (unpaired t – test, $p<0.001$) στην ομάδα των κυήσεων με προεκλαμψία (mean = -0.8181) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (mean = -0.0924). Επιπρόσθετα, οι τιμές του \log_{10} MoM Ang-1 ήταν σημαντικά ελαττωμένες (unpaired t–test, $p<0.001$) στην ομάδα κυήσεων με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (mean = -1.2583) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (mean = -0.0924).

Πίνακας 10. Correlational matrix ανάλυση για τις ομάδες PE and PE-IUGR. Οι Spearman's Rho τιμές αναγράφονται με τις αντίστοιχες p-values μέσα στην παρένθεση. Οι p-values που παρουσιάζονται δεν έχουν τροποποιηθεί για πολλαπλές συγκρίσεις και θεωρούνται περιγραφικές. Στις δεύτερες παρενθέσεις, παρουσιάζονται οι τροποποιημένες p-values μετά από διόρθωση Bonferroni (multiple hypothesis testing). Μόνο οι σημαντικές p-values μετά από διόρθωση Bonferroni αναγράφονται.

PE group	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Ang-1	1		
Ang-2	-0.1398 [0.5565]	1	
Tie-2	-0.2165 [0.3591]	0.8602 (<0.001) (<0.001)	1
PE+IUGR group	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Ang-1	1		
Ang-2	0.3458 [0.0452]	1	
Tie-2	0.4448 [0.0084]	0.6342 (<0.001) (<0.001)	1
Control group	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Ang-1	1		
Ang-2	0.2982 [0.2149]	1	
Tie-2	0.3404 [0.1539]	-0.0965 [0.6943]	1

Στις κύησεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, τα επίπεδα έκφρασης των Ang-2 και Tie-2 είναι σημαντικά υψηλότερα στις κύησεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.001$ και $p = 0.002$ αντίστοιχα). Τα επίπεδα έκφρασης της Ang-1 είναι χαμηλότερα στις παθολογικές κύησεις ($p = 0.001$) [Πίνακας 11]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα Ang-1 και του υποδοχέα Tie-2 σε πλακούντες με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης αλλά όχι σε πλακούντες από ανεπίπλεκτες κύησεις.

Πίνακας 11. Univariate συγκρίσεις για τις μεταβλητές που εξετάστηκαν (Ang-1, Ang-2, Tie-2) μεταξύ των IUGR και των φυσιολογικών κύησεων.

Εξεταζόμενες μεταβλητές	IUGR group median	Control group median	Test (p value)
Ang-1	0.0449	0.11554	Mann Whitney ($p = 0.001$)
Ang-2	0.4994	0.0242	Mann Whitney ($p < 0.001$)
Tie-2	0.3214	0.0932	Mann Whitney ($p = 0.002$)

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι στις κυήσεις με προεκλαμψία, η mRNA έκφραση της Ang-1 στον πλακούντα είναι μειωμένη ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση στην έκφραση των μορίων Ang-2 και Tie-2. Οι μεταβολές αυτές είναι πιο έντονες στην ομάδα των κυήσεων με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (Πίνακας 9). Επίσης, η μελέτη αυτή έδειξε ότι υπάρχει μία έντονα θετική συσχέτιση μεταξύ της Ang-2 και του υποδοχέα Tie-2 στις κυήσεις που επιπλέκονται με προεκλαμψία (Πίνακας 10). Ειδικότερα, υψηλότερα επίπεδα της Ang-2 σχετίζονται με αυξημένη έκφραση του Tie-2 στην ομάδα των κυήσεων με προεκλαμψία. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το εύρημα αυτό δεν παρατηρείται στην ομάδα ελέγχου. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική γιατί δείχνει ότι εκτός από τη μεταβολή στα επίπεδα των παραγόντων που μελετήθηκαν, η προεκλαμψία αλλά και η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης διαταράσσουν τη σχέση μεταξύ των αγγειογενετικών παραγόντων και του υποδοχέα τους. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της Ang-1 στον πλακούντα είναι αντιστρόφως ανάλογα με την ηλικία κύησης. Όμως, ακόμα και μετά από εξομάλυνση των τιμών της Ang-1 για την ηλικία κύησης στον τοκετό, η έκφραση του παράγοντα αυτού παραμένει μειωμένη και στις δύο ομάδες παθολογικών κυήσεων που εξετάσαμε. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν και στην ομάδα κυήσεων με περιορισμό της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Προγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι οι αγγειοποιητίνες συμμετέχουν σε μία σειρά βιολογικών διεργασιών κατά τη διαδικασία της πλακουντοποίησης, οι οποίες όμως δε λαμβάνουν χώρα αποκλειστικά στο ενδοθήλιο. Σύμφωνα με δεδομένα από *in situ hybridization* μελέτες, τα μόρια Ang-1 και Tie-2 εκφράζονται στον τροφοβλαστικό ιστό ακόμα και στο πρώτο τρίμηνο της κύησης ενώ η έκφραση mRNA της Ang-2 περιορίζεται κυρίως στην κυτταροτροφοβλάστη αναδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο της οικογένειας των παραγόντων αυτών στη διεύθυνση της τροφοβλάστης στα πρώτα στάδια της κύησης [Wulff et al, 2002]. Σε πλακούντες από τελειόμηνες κυήσεις, η Ang-1 εντοπίζεται στον περί-αγγειακό ιστό των πρωτογενών

λαχνών όπως και αναμένεται από τη συμμετοχή του παράγοντα αυτού στην διαδικασία ωρίμανσης του αγγειακού δικτύου. Η Ang-2 εκφράζεται σε όλη την επιφάνεια των τριτογενών λαχνών και διατηρεί την πλαστικότητα των αγγείων του πλακούντα [Dunk et al, 2000]. Επιπλέον, ο υποδοχέας Tie-2 εκφράζεται στην τροφοβλάστη και συμμετέχει στη ρύθμιση της συμπεριφοράς των τροφοβλαστικών κυττάρων [Dunk et al, 2000].

Μικρός είναι ο αριθμός των δημοσιεύσεων στη βιβλιογραφία που αναφέρονται στην έκφραση των αγγειοποιητινών στον πλακούντα σε κυήσεις με προεκλαμψία. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι αντιφατικά και έχουν πραγματοποιηθεί σε σχετικά μικρά δείγματα (Πίνακας 11). Οι Zhang et al (2001) εξέτασαν εννέα γυναίκες με προεκλαμψία μεταξύ 31^{ης} και 40^{ης} εβδομάδας κύησης και έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA της Ang-2 είναι ελαττωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στην ομάδα ελέγχου [Zhang et al, 2001]. Οι Geva et al (2002) μελέτησαν τα επίπεδα αυτών των αγγειογενετικών παραγόντων σε όλη τη διάρκεια της κύησης και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η πλακουντιακή έκφραση των Ang-1 και Ang-2 δε μεταβάλλεται στις κυήσεις με παθολογία του πλακούντα αλλά πρέπει να αναφέρουμε ότι το πληθυσμιακό δείγμα της μελέτης συμπεριελάμβανε μόνο πέντε περιστατικά με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης στο τρίτο τρίμηνο [Geva et al, 2002]. Οι Sung et al (2011) αναφέρουν ότι δε βρήκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των Ang-1 και Tie-2 σε δείγματα πλακουντιακού ιστού που συνέλλεξαν από δεκαεννέα κυήσεις με προεκλαμψία [Sung et al, 2011]. Επιπρόσθετα, οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στα επίπεδα mRNA της Ang-2 μεταξύ προεκλαμπτικών και φυσιολογικών κυήσεων αλλά σε κυτταροτροφοβλάστες σε ορισμένες εστιακές περιοχές στο βασικό πέταλο και σε λίγες λάχνες εντοπίστηκε μετρίως αυξημένη έκφραση της Ang-2 στις κυήσεις με προεκλαμψία [Sung et al, 2011].

Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση της Ang-2 είναι σημαντικά αυξημένη σε πλακουντιακό ιστό προερχόμενο από κυήσεις με σοβαρή προεκλαμψία, όπως αυτή ορίζεται από τα κριτήρια του ACOG που ακολουθήσαμε και στη δική μας ανάλυση [Han et al, 2012]. Επίσης, τα επίπεδα της Ang-1 δε μεταβάλλονταν στον πλακούντα σε κυήσεις με σοβαρή προεκλαμψία και μη σημαντική συσχέτιση

παρατηρήθηκε μεταξύ των παραγόντων Ang-1 και Ang-2 σε όλο το πληθυσμιακό δείγμα της μελέτης. Όμως, η μελέτη αυτή είχε μικρό πληθυσμιακό δείγμα και το ποσοστό των κυήσεων με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης που περιλαμβάνεται μέσα στην ομάδα των κυήσεων με προεκλαμψία δεν προσδιορίζεται. Παρομοίως, τα στοιχεία από την παρούσα μελέτη υποστηρίζουν ότι υπάρχει αύξηση στην έκφραση της Ang-2 στην ομάδα των κυήσεων με προεκλαμψία με ή χωρίς συνυπάρχουσα καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Τα αποτελέσματα μας επίσης δείχνουν ότι η έκφραση της Ang-2 είναι ακόμα πιο έντονη στην ομάδα των κυήσεων όπου συνυπάρχουν οι δύο αυτές καταστάσεις (προεκλαμψία-περιορισμός της εμβρυικής ανάπτυξης) αναδεικνύοντας μία άμεση συσχέτιση των επιπέδων αυτού του αγγειογενετικού παράγοντα με τη σοβαρότητα της νόσου. Επίσης, παρατηρήσαμε μειωμένη έκφραση της Ang-1 στις κυήσεις που εκδηλώνεται προεκλαμψία, μία μεταβολή που δεν καταγράφεται στη μελέτη των Han et al (2012). Η ανάλυση μας επιπλέον έδειξε ότι υπάρχει μία ασθενής συσχέτιση μεταξύ των παραγόντων Ang-1 και Ang-2 στην ομάδα των κυήσεων με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης ενώ δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη συσχέτιση στις κυήσεις με προεκλαμψία ή στην ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της μελέτης των Han et al (2012). Η συγκριτική ανάλυση των τιμών των μεταβλητών που μετρήσαμε, αποκάλυψε επίσης μία θετική συσχέτιση μεταξύ της Ang-2 και του υποδοχέα Tie-2 στις δύο ομάδες παθολογικών κυήσεων (PE&PE-IUGR groups) η οποία δεν απαντάται στην ομάδα ελέγχου. Η παρατήρηση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης αφού αποτελεί μία πρώτη ένδειξη για το ότι στις κυήσεις με προεκλαμψία δεν υπάρχει μόνο μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των αγγειοποιητινών αλλά αλλάζει και ο τρόπος που ρυθμίζεται η συσχέτιση των Ang-1 και Ang-2 με τον κοινό υποδοχέα τους.

Πίνακας 11. Δημοσιευμένες μελέτες οι οποίες έχουν εξετάσει τα επίπεδα των παραγόντων Ang-1, Ang-2 και Tie-2 σε πλακούντες από κυήσεις με προεκλαμψία ή με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης.

Συγγραφείς	Έτος	Πλυθισμός	Ηλικία Κύησης	Επιπλοκή	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Dunk et al.	2000	6	28-36	IUGR		NS	
Zhang et al.	2001	9	31-40	PE		↓	
Geva et al.	2002	5	25-41	PE		NS	
Sung et al.	2011	19		PE	NS	NS	NS
Han et al.	2012	16	28-41	PE	NS	↑	
Kappou et al.	2014	28	34-39	PE	↓	↑	↑
		30		PE + IUGR			

PE, preeclampsia, IUGR, intrauterine growth restriction, NS, not significant

Παρόμοια ετερογένεια παρατηρείται και μεταξύ των μελετών που έχουν εξετάσει τα επίπεδα των αγγειοποιητινών στη μητρική κυκλοφορία γυναικών με προεκλαμψία πριν και μετά την κλινική εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου [Πίνακας 7]. Σε κυήσεις στις οποίες έχει ήδη εκδηλωθεί η νόσος, η πλειοψηφία των μελετών αναφέρουν χαμηλές συγκεντρώσεις της Ang-2 [Vuorela et al, 1998; Hirokoshi et al, 2005; Nadar et al, 2005; Hirokoshi et al, 2007], και του υποδοχέα Tie-2 [Vuorela et al, 1998; Gotsch et al, 2008] στη μητρική κυκλοφορία σε σχέση με τις ανεπίπλεκτες κυήσεις. Αναλυτικά, οι Hirokoshi et al (2005) έδειξαν ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης της Ang-2 στο μητρικό ορό σε 26 γυναίκες με προεκλαμψία στις 25-40 εβδομάδες κύησης ήταν 4.5 ng/ml σε σύγκριση με 18.9 ng/ml στην ομάδα των φυσιολογικών κυήσεων με αντίστοιχη ηλικία κύησης και 2.1 ng/ml σε μη έγκυες

γυναίκες. Παρομοίως, οι Nadar et al (2005) έδειξαν ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης της Ang-2 στο μητρικό ορό σε 35 γυναίκες με προεκλαμψία στις 26-40 εβδομάδες κύησης ήταν 9 ng/ml σε σύγκριση με 20 ng/ml στην ομάδα των φυσιολογικών κυήσεων με αντίστοιχη ηλικία κύησης και 6 ng/ml σε μη έγκυες γυναίκες.

Αντιθέτως, μία πιο πρόσφατη μελέτη υποστήριξε ότι τα επίπεδα της Ang-2 στη μητρική κυκλοφορία είναι αυξημένα στο διάστημα μεταξύ 16^{ης} και 20^{ης} εβδομάδας κύησης σε γυναίκες που εκδήλωσαν προεκλαμψία [Leinonen et al, 2010]. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την άποψη ότι η υπεροχή των αντί-αγγειογενετικών παραγόντων σχετίζεται με την εκδήλωση προεκλαμψίας. Επίσης, στην ίδια μελέτη οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι τα επίπεδα της Ang-2 έχουν συσχέτιση και με το βαθμό σοβαρότητας της νόσου. Παρομοίως, στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε πιο έντονη πλακουντιακή έκφραση της Ang-2 στην ομάδα των περιστατικών με προεκλαμψία και περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης, συνδυασμός που αποτελεί διακριτή μορφή της προεκλαμψίας. Ενδιαφέρον είναι επίσης ότι μία πρόσφατη επιμήκης μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα της Ang-2 είναι αυξημένα και τα επίπεδα της Ang-1 είναι μειωμένα στο μητρικό ορό σε όλη τη διάρκεια της κύησης και ότι ο λόγος Ang-1/Ang-2 στο διάστημα μεταξύ 25^{ης} και 28^{ης} εβδομάδας κύησης μπορεί να έχει προβλεπτική αξία για την πιθανότητα εκδήλωσης προεκλαμψίας [Bolin et al, 2009]. Κατά το πρώτο τρίμηνο, η συγκέντρωση της Ang-2 στο μητρικό ορό έχει αναφερθεί να είναι είτε χαμηλή [Wang et al, 2007] είτε αμετάβλητη [Akolakar et al, 2009] σε γυναίκες που μετέπειτα εμφάνισαν προεκλαμψία. Παρομοίως αντιφατικά αποτελέσματα έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία για τις συγκεντρώσεις των παραγόντων Ang-1 και Tie-2 στο μητρικό ορό στις κυήσεις με προεκλαμψία [Πίνακας 7].

Η κυρίαρχη θεώρηση που υπήρχε στη βιβλιογραφία για το ρόλο της Ang-2 ήταν ότι δρα ως ανταγωνιστή της ανάπτυξης του αγγειακού δικτύου κατά την εμβρυική ανάπτυξη και η δράση αυτή διαμεσολαβείται από τη σύνδεση στον υποδοχέα Tie-2 [Maisonpierre et al, 1997]. Αντιθέτως, η Ang-1 προάγει τη δομική ακεραιότητα των αγγείων με το να ευνοεί τη συγκέντρωση στηρικτικών κυττάρων στα νεοδημιουργηθέντα αγγεία και διατηρώντας τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων

[vanHinsbergh et al, 2002; Wysolmerski et al, 1990]. Η Ang-1 έχει επίσης αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες συμμετέχοντας στη ρύθμιση της μείωσης της έκφρασης μορίων κυτταρικής προσκόλλησης [Sheldon et al, 1993]. Από την άλλη πλευρά, η ενίσχυση της έκφρασης της Ang-2 σχετίζεται με διαταραχή στην οξυγόνωση των ιστών και επίσης ευθύνεται για διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ενδοθηλίου, ιδιότητα που ασκείται με το να επάγει την ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα [Parikh et al, 2006; Fiedler et al, 2006]. Άλλος πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου η Ang-2 διαταράσσει τη διαδικασία ωρίμανσης του αγγειακού δικτύου είναι η σύνδεση του μορίου αυτού με την αλυσίδα μυοσίνηςMLC-p (phosphorylated myosin light chain) η οποία προκαλεί σύσπαση στο ενδοθήλιο και διαφυγή μεταξύ των αγγείων [Parikh et al, 2006; Roviezzo et al, 2005].

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή περιγράφει το πώς μεταβάλλεται η έκφραση των αγγειοποιητινών στον πλακούντα σε κυήσεις με προεκλαμψία σε ένα δείγμα σαφώς μεγαλύτερο συγκριτικά με προηγούμενες μελέτες στη βιβλιογραφία και με υπό-ομάδες που έχουν καθοριστεί με αυστηρά κριτήρια. Ο σχεδιασμός της μελέτης που ακολουθήθηκε δεν μας επιτρέπει να ορίσουμε αν η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης των παραγόντων Ang-1, Ang-2 και Tie-2 είναι επακόλουθο της ανεπαρκούς πλακουντοποίησης που χαρακτηρίζει τις κυήσεις με προεκλαμψία ή προηγείται αυτής. Επίσης, η αλλαγή στην έκφραση της οικογένειας των αγγειοποιητινών μπορεί να είναι μέρος της προσαρμογής που γίνεται στις συνθήκες υποξίας του πλακούντα, γεγονός που περιλαμβάνει και μεταβολές σε άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες. Μελλοντικές μελέτες απαιτούνται ώστε να εξεταστεί η πιθανή αξία των αγγειοποιητινών ως βιοδείκτες για την πρόβλεψη της προεκλαμψίας. Η συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων των Ang-1, Ang-2 και του υποδοχέα Tie-2 και των διακριτών μορφών της προεκλαμψίας μπορεί να έχει κλινική σημασία αν αναπαράγονται και στο μητρικό ορό. Όπως αναφέρθηκε, προηγούμενες μελέτες έχουν ήδη περιγράψει τη συσχέτιση των λόγων Ang-1/Ang-2 και sFlt-1/Ang-2 στο μητρικό ορό με την εμφάνιση προεκλαμψίας [Hirokoski et al, 2007; Bolin et al, 2009].

Μεταβολές στο προφίλ της πλακουντιακής έκφρασης των αγγειοποιητινών και του υποδοχέα τους παρατηρήθηκαν και στην ομάδα των κυήσεων με περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης των Ang-2 και Tie-2 είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα επίπεδα έκφρασης της Ang-1 καταγράφηκε να είναι χαμηλότερα στις παθολογικές κυήσεις. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του παράγοντα Ang-1 και του υποδοχέα Tie-2 σε πλακούντες με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης αλλά όχι σε πλακούντες από ανεπίπλεκτες κυήσεις. Οι Dunk et al (2000) μελέτησαν την πλακουντιακή έκφραση της Ang-2 σε ένα περιορισμένο δείγμα (6 IUGR κυήσεις) στο διάστημα μεταξύ 28ης-36ης εβδομάδας κύησης και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών κυήσεων. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο μητρικό ορό σε δείγμα 44 γυναικών κατά το διάστημα μεταξύ 10-13ης εβδομάδας κύησης, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα της Ang-2 ήταν χαμηλότερα στις κυήσεις που μετέπειτα εκδήλωσαν περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης [Wang et al, 2007].

Περίληπτικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η πλακουντιακή έκφραση της Ang-1 είναι μειωμένη στις κυήσεις με προεκλαμψία ενώ η πλακουντιακή έκφραση των Ang-2 και Tie-2 είναι αυξημένη στις κυήσεις με προεκλαμψία. Οι μεταβολές αυτές είναι πιο έντονες στις κυήσεις οι οποίες επιπλέκονται και με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης καταδεικνύοντας ότι υπάρχει πιο σοβαρή διαταραχή της αγγειογένεσης στις κυήσεις αυτές. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν σε κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. Η μελέτη αυτή δυνητικά θα συμβάλει στην κατανόηση της ισορροπίας που δημιουργείται μεταξύ αγγειογενετικών και αντί-αγγειογενετικών παραγόντων στην προεκλαμψία και στον περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου κατά την ενδομήτριο ζωή. Ο σχεδιασμός που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνος με τα κριτήρια μιας μελέτης case-control που επιτρέπει μεν την περιγραφή των μεταβολών που πραγματοποιούνται στις παθολογικές κυήσεις αλλά όχι την αποσαφήνιση της αιτιολογικής σειράς των γεγονότων. Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μπορεί να αποτελέσουν το έναυσμα για μεγαλύτερες μελέτες

που θα έχουν ως σκοπό τη διερεύνηση του προγνωστικού ρόλου των Ang-1 και Ang-2 στις σοβαρές αυτές επιπλοκές της κύησης.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ACOG Committee on Practice Bulletins--Obstetrics. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *ObstetGynecol.* 2002;99(1):159-67.
2. ACOG; Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122:1122-31
3. Akolekar R, Zaragoza E, Poon LC, Pepes S, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of preeclampsia. *Ultrasound ObstetGynecol.* 2008;32(6):732-9.
4. Akolekar R, Casagrandi D, Skyfta E, Ahmed AA, Nicolaides KH. Maternal serum angiopoietin-2 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *PrenatDiagn.* 2009;29(9):847-51.
5. Alfirevic Z, Stampalija T, Gyte GM. Fetal and umbilical Doppler ultrasound in high-risk pregnancies. *CochraneDatabaseSystRev.* 2010 Jan 20;(1):CD007529.
6. Arroyo JA, Winn VD. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta. *Semin Perinatol.* 2008;32(3):172-7.
7. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):165-77.
8. Benton SJ, Hu Y, Xie F, Kupfer K, Lee SW, Magee LA, von Dadelszen P. Can placental growth factor in maternal circulation identify fetuses with placental intrauterine growth restriction? *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206(2):163.e1-7
9. Baschat AA, Gembruch U. The cerebroplacental Doppler ratio revisited. *Ultrasound ObstetGynecol.* 2003;21(2):124-7.
10. Bolin M, Wiberg-Itzel E, Wikström AK, Goop M, Larsson A, Olovsson M, Akerud H. Angiopoietin-1/angiopoietin-2 ratio for prediction of preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2009;22(8):891-5.
11. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol.* 1967;93:569-79.
12. Bujold E, Effendi M, Girard M, Gouin K, Forest JC, Couturier B, Giguère Y. Reproducibility of first trimester three-dimensional placental measurements in the evaluation of early placental insufficiency. *J ObstetGynaecol Can.* 2009;31(12):1144-8

13. Chafetz I, Kuhnreich I, Sammar M, Tal Y, Gibor Y, Meiri H, Cuckle H, Wolf M. First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.*2007;197(1):35.e1-7.
14. Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, Kusanovic JP, Soto E, Lam J, Dong Z, Than NG, Yeo L, Hernandez-Andrade E, Conde-Agudelo A, Hassan SS. Maternal plasma concentrations of angiogenic/antiangiogenic factors in the third trimester of pregnancy to identify the patient at risk for stillbirth at or near term and severe late preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.*2013;208(4):287.e1-287.e15.
15. Chen CP, Bajoria R, Aplin JD. Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Am J Obstet Gynecol.*2002;187(3):764-9.
16. Cleaver O, Krieg P. Molecular mechanisms of vascular development. En: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart Development*. 1st ed. San Diego: Academic Press Publications, 1999;p. 221-52.
17. Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, De Palma M, Patel S, Urbich C, Biswas SK, Murdoch C, Plate KH, Reiss Y, Lewis CE. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *CancerRes.* 2010;70(13):5270-80.
18. Cox B, Sharma P, Evangelou AI, Whiteley K, Ignatchenko V, Ignatchenko A, Baczyk D, Czikk M, Kingdom J, Rossant J, Gramolini AO, Adamson SL, Kislinger T. Translational analysis of mouse and human placental protein and mRNA reveals distinct molecular pathologies in human preeclampsia.*Mol Cell Proteomics.*2011;10(12):M111.012526.
19. Crispi F, Domínguez C, Llurba E, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction.*Am J ObstetGynecol.* 2006;195(1):201-7.
20. Crovetto F, Crispi F, Scazzocchio E, Mercade I, Meler E, Figueras F, Gratacos E. First-trimester screening for early and late small-for-gestational-age neonates using maternal serum biochemistry, blood pressure and uterine artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(1):34-40.
21. Crovetto F, Triunfo S, Crispi F, Rodriguez-Sureda V, Dominguez C, Figueras F, Gratacos E. Differential performance of first trimester screening in predicting small for gestational age neonates or fetal growth restriction.*Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016 Mar 16.

22. Cruz-Lemini M, Crispi F, Van Mieghem T, Pedraza D, Cruz-Martínez R, Acosta-Rojas R, Figueras F, Parra-Cordero M, Deprest J, Gratacós E. Risk of perinatal death in early-onset intrauterine growth restriction according to gestational age and cardiovascular Doppler indices: a multicenter study. *Fetal Diagn Ther.* 2012;32(1-2):116-22.
23. Daly C, Wong V, Burova E, Wei Y, Zabski S, Griffiths J, Lai KM, Lin HC, Ioffe E, Yancopoulos GD, Rudge JS. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev.* 2004;18(9):1060-71.
24. Daly C, Eichten A, Castanaro C, Pasnikowski E, Adler A, Lalani AS, Papadopoulos N, Kyle AH, Minchinton AI, Yancopoulos GD, Thurston G. Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer Res.* 2013;73(1):108-18.
25. Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R, Luft FC. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(9):2440-8.
26. Demicheva E, Crispi F. Long-term follow-up of intrauterine growth restriction: cardiovascular disorders. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(2):143-53.
27. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009;33:130-7.
28. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol.* 2000;156:2185–2199
29. Erez O, Romero R, Espinoza J, Fu W, Todem D, Kusanovic JP, Gotsch F, Edwin S, Nien JK, Chaiworapongsa T, Mittal P, Mazaki-Tovi S, Than NG, Gomez R, Hassan SS. The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(5):279-8
30. Espinoza J, Romero R, Nien JK, Gomez R, Kusanovic JP, Gonçalves LF, Medina L, Edwin S, Hassan S, Carstens M, Gonzalez R. Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(4):326.e1-13.

31. Fan X, Rai A, Kambham N, Sung JF, Singh N, Pettitt M, Dhal S, Agrawal R, Sutton RE, Druzin ML, Gambhir SS, Ambati BK, Cross JC, Nayak NR. Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *J Clin Invest.*2014;124(11):4941-52.
32. Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos EK, Kutschera S, Bartels S, Appak S, Besemfelder E, Terhardt D, Chavakis E, Wieland T, Klein C, Thomas M, Uemura A, Goerdt S, Augustin HG. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest.* 2012;122(6):1991-2005.
33. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzenrath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *NatMed.* 2006 ;12(2):235-9.
34. Figueras F, Eixarch E, Gratacos E, Gardosi J. Predictiveness of antenatal umbilical artery Doppler for adverse pregnancy outcome in small-for-gestational-age babies according to customised birthweight centiles: population-based study. *BJOG.* 2008;115(5):590-4.
35. Figueras F, Gratacós E. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol. *Fetal DiagnTher.* 2014;36(2):86-98.
36. Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.*2015;213(4 Suppl):S115-22.
37. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *DevCell.* 2002;3(3):411-23.
38. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J ClinEndocrinolMetab.* 2002;87:4213–4224.
39. Geva E, Ginzinger DG, Moore DH, II, Ursell PC, Jaffe RB. In utero angiopoietin-2 gene delivery remodels placental blood vessel phenotype: A murine model for studying placental angiogenesis. *Mol Hum Reprod.*2005;11:253–260.

40. Ghosh GS, Gudmundsson S. Uterine and umbilical artery Doppler are comparable in predicting perinatal outcome of growth-restricted fetuses. *BJOG*.2009;116(3):424-30.
41. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Dombrowski M, Erez O, Than NG, Mazaki-Tovi S, Mittal P, Espinoza J, Hassan SS. Preeclampsia and small-for-gestational age are associated with decreased concentrations of a factor involved in angiogenesis: soluble Tie-2. *J Matern Fetal Neonatal Med*.2008;21(6):389-402.
42. Grandone E¹, Villani M, Tiscia GL. Aspirin and heparin in pregnancy. *Expert Opin Pharmacother*. 2015;16(12):1793-803.
43. Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements--a prospective study. *Am J Obstet Gynecol*.1985;151(3):333-7.
44. Han SY, Jun JK, Lee CH, Park JS, Syn HC. Angiopoietin-2: a promising indicator for the occurrence of severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*.2012;31(1):189-99.
45. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, Masuyama H, Hiramatsu Y, Makino H. Increase of serum angiopoietin-2 during pregnancy is suppressed in women with preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2005;18(9 Pt 1):1181-8
46. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, Masuyama H, Hiramatsu Y, Makino H. Elevated serum sFlt-1/Ang-2 ratio in women with preeclampsia. *Nephron ClinPract*. 2007;106:c43-c50.
47. Hou HA, Chou WC, Lin LI, Tang JL, Tseng MH, Huang CF, Yao M, Chen CY, Tsay W, Tien HF. Expression of angiopoietins and vascular endothelial growth factors and their clinical significance in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008, 32: 904-912.
48. Jardim LL, Rios DR, Perucci LO, de Sousa LP, Gomes KB, Dusse LM. Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia? *Clin Chim Acta*. 2015;447:34-8.
49. Joshi VV. Handbook of placental pathology. New York , Igaku-Shoin, 1994.
50. Kamal M, El-Khayat W. Do serum angiopoietin-1, angiopoietin-2, and their receptor Tie-2 and 4G/5G variant of PAI-1 gene have a role in the pathogenesis of preeclampsia? *J Investig Med*. 2011;59(7):1147-50.
51. Kappou D, Sifakis S, Konstantinidou A, Papantoniou N, Spandidos DA. Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy (Review). *Exp Ther Med*. 2015;9(4):1091-1096.

52. Karagiannis G, Akolekar R, Sarquis R, Wright D, Nicolaides KH. Prediction of small-for-gestation neonates from biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Fetal Diagn Ther.* 2011;29:148-54.
53. Khaliq A, Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Whittle MJ, Weich H, Ahmed A. Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors.* 1996;13(3-4):243-50
54. Khan AA, Sandhya VK, Singh P, Parthasarathy D, Kumar A, Advani J, Gattu R, Ranjit DV, Vaidyanathan R, Mathur PP, Prasad TS, Mac Gabhann F, Pandey A, Raju R, Gowda H. Signaling Network Map of Endothelial TEK Tyrosine Kinase. *J Signal Transduct.* 2014;2014:173026.
55. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.* 1986;93(10):1049-59.
56. Kleinrouweler CE¹, Wiegerinck MM, Ris-Stalpers C, Bossuyt PM, van der Post JA, von Dadelszen P, Mol BW, Pajkrt E; EBM CONNECT Collaboration. Accuracy of circulating placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in the prediction of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2012 Jun;119(7):778-87.
57. Krauss T, Pauer HU, Augustin HG. Prospective analysis of placenta growth factor (PlGF) concentrations in the plasma of women with normal pregnancy and pregnancies complicated by preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2004;23(1):101-11.
58. Kraus M¹, Nicolaides K. Identifying risks for early onset pre-eclampsia. *Womens Health (Lond).* 2015 Jan;11(1):15-7.
59. Leinonen E, Wathén KA, Alfthan H, Ylikorkala O, Andersson S, Stenman UH, Vuorela P. Maternal serum angiopoietin-1 and -2 and tie-2 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(1):126-33.
60. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350(7):672-83
61. Levine TA, Grunau RE, McAuliffe FM, Pinnamaneni R, Foran A, Alderdice FA. Early childhood neurodevelopment after intrauterine growth restriction: a systematic review. *Pediatrics.* 2015;135(1):126-41.

62. Lindqvist PG, Molin J. Does antenatal identification of small-for-gestational age fetuses significantly improve their outcome? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005;25(3):258-64.
63. Liu H, Li Y, Zhang J, Rao M, Liang H, Liu G. The defect of both angiogenesis and lymphangiogenesis is involved in preeclampsia. *Placenta.* 2015;36(3):279-86.
64. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the pathophysiological implications and clinical role of angiogenic factors in pregnancy. *Fetal Diagn Ther.* 2015;37(2):81-92.
65. Lobmaier SM, Figueras F, Mercade I, Perello M, Peguero A, Croveto F, Ortiz JU, Crispi F, Gratacós E. Angiogenic factors vs Doppler surveillance in the prediction of adverse outcome among late-pregnancy small-for-gestational-age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(5):533-40.
66. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007;5:6.
67. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277(5322):55-60.
68. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111(5):649-58.
69. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2011;31(1):33-46
70. Mazziere R, Pucci F, Moi D, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell.* 2011;19:512–526.
71. Nadar SK, Karalis I, Al Yemini E, Blann AD, Lip GY. Plasma markers of angiogenesis in pregnancy induced hypertension. *Thromb Haemost.* 2005;94(5):1071-6.
72. NICE Guidelines (CG107). Hypertension in pregnancy: diagnosis and management. Last updated January 2011.
73. Nicolaides KH. Turning the pyramid of prenatal care. *Fetal Diagn Ther.* 2011;29(3):183-96.

74. Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L, Failla CM, Zambruno G. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci.*2002;115(Pt 12):2559-67.
75. Ohkuchi A, Hirashima C, Matsubara S, Suzuki H, Takahashi K, Arai F, Watanabe T, Kario K, Suzuki M. Alterations in placental growth factor levels before and after the onset of preeclampsia are more pronounced in women with early onset severe preeclampsia. *HypertensRes.* 2007;30(2):151-9.
76. Oros D, Figueras F, Cruz-Martinez R, Meler E, Munmany M, Gratacos E. Longitudinal changes in uterine, umbilical and fetal cerebral Doppler indices in late-onset small-for-gestational-age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(2):191-5.
77. Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA, Sukhatme VP. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoSMed.* 2006;3(3):e46.
78. Phipps E, Prasanna D, Brima W, Jim B. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(6):1102-13.
79. Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA, Rees A, Tiltman A, Vercruyse L, van Assche A. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. *Br J ObstetGynaecol.* 1991;98(7):648-55.
80. Plasencia W, Maiz N, Bonino S, Kaihura C, Nicolaides KH. Uterine artery Doppler at 11 + 0 to 13 + 6 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *UltrasoundObstetGynecol.* 2007;30(5):742-9
81. Poon LC, Zaragoza E, Akolekar R, Anagnostopoulos E, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor (PIGF) in small for gestational age pregnancy at 11(+0) to 13(+6) weeks of gestation. *PrenatDiagn.*2008;28(12):1110-5.
82. Poon LC, Maiz N, Valencia C, Plasencia W, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia. *UltrasoundObstetGynecol.* 2009;33(1):23-33.
83. Poon LC, Karagiannis G, Staboulidou I, Shafiei A, Nicolaides KH. Reference range of birth weight with gestation and first-trimester prediction of small-for-gestation neonates. *PrenatDiagn.* 2011;31(1):58-65
84. Poon LC¹, Syngelaki A, Akolekar R, Lai J, Nicolaides KH. Combined screening for preeclampsia and small for gestational age at 11-13 weeks. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(1):16-27.

85. Poon LC, Nicolaides KH. First-trimester maternal factors and biomarker screening for preeclampsia. *Prenat Diagn.* 2014;34:618-27
86. Red-Horse K, Kapidzic M, Zhou Y, Feng KT, Singh H, Fisher SJ. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation. *Development.* 2005;132(18):4097-106.
87. Regnault TR, de Vrijer B, Galan HL, Davidsen ML, Trembler KA, Battaglia FC, Wilkening RB, Anthony RV. The relationship between transplacental O₂ diffusion and placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J Physiol.* 2003;550(Pt 2):641-56.
88. Richardus JH, Graafmans WC, Verloove-Vanhorick SP, Mackenbach JP; EuroNatal International Audit Panel; EuroNatal Working Group. Differences in perinatal mortality and suboptimal care between 10 European regions: results of an international audit. *BJOG.* 2003;110(2):97-105.
89. Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM. Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(4):908-14.
90. Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancaleone V, Cirino G, Papapetropoulos A. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J PharmacolExpTher.* 2005;314(2):738-44.
91. Saharinen P, Kerkelä K, Ekman N, Marron M, Brindle N, Lee GM, Augustin H, Koh GY, Alitalo K. Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *J Cell Biol.* 2005;169(2):239-43.
92. Salomon LJ, Alfirevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, Kalache K, Leung KY, Malinger G, Munoz H, Prefumo F, Toi A, Lee W; ISUOG Clinical Standards Committee. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(1):116-26.
93. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995;376:70-74.
94. Savchev S, Figueras F, Cruz-Martinez R, Illa M, Botet F, Gratacos E. Estimated weight centile as a predictor of perinatal outcome in small-for-gestational-age pregnancies with normal fetal and maternal Doppler indices. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39(3):299-303.

95. Savchev S, Figueras F, Sanz-Cortes M, Cruz-Lemini M, Triunfo S, Botet F, Gratacos E. Evaluation of an optimal gestational age cut-off for the definition of early- and late-onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(2):99-105.
96. Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta.* 2008;29:809–815.
97. Sferruzzi-Perri AN, Camm EJ. The Programming Power of the Placenta. *Front Physiol.* 2016;7:33.
98. Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S, Shasby DM (1993) Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol* 265: L606–L612.
99. Smith GC, Crossley JA, Aitken DA, Jenkins N, Lyall F, Cameron AD, Connor JM, Dobbie R. Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstet Gynecol.* 2007;109(6):1316-24.
100. Souka AP, Papastefanou I, Pilalis A, Michalitsi V, Panagopoulos P, Kassinou D. Performance of the ultrasound examination in the early and late third trimester for the prediction of birth weight deviations. *Prenat Diagn.* 2013;33(10):915-20.
101. Spencer K, Cowans NJ, Chefetz I, Tal J, Meiri H. First-trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29:128-34.
102. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2010;376(9741):631-44.
103. Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Hypertension.* 2007;49(4):818-24.
104. Sung JF, Fan X, Dhal S, Dwyer BK, Jafari A, El-Sayed YY, Druzin ML, Nayak NR. Decreased circulating soluble Tie2 levels in preeclampsia may result from inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):E1148-52.
105. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996;87:1171–1180.

106. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*.1998;282(5388):468-71.
107. Tanaka M, Natori M, Ishimoto H, Miyazaki T, Kobayashi T, Nozawa S. Experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague-Dawley rats. *Am J Obstet Gynecol*.1994;171(5):1231-4.
108. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, Ecker J, Karumanchi SA. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*.2004;89(2):770-5.
109. Thomas M, Augustin HG. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009;12(2):125-37.
110. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*. 2000;6(4):460-3.
111. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):61-8.
112. Tidwell SC, Ho HN, Chiu WH, Torry RJ, Torry DS. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184(6):1267-72.
113. vanHinsbergh VW, van NieuwAmerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat*. 2002;200(6):549-60.
114. Verkauskiene R, Figueras F, Deghmoun S, Chevenne D, Gardosi J, Levy-Marchal M. Birth weight and long-term metabolic outcomes: does the definition of smallness matter? *Horm Res*.2008;70(5):309-15.
115. vonDadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):143-8.
116. Vuorela P, Matikainen MT, Kuusela P, Ylikorkala O, Alitalo K, Halmesmaki E. Endothelial tie receptor antigen in maternal and cord blood of healthy and preeclamptic subjects. *Obstet Gynecol*.1998;92(2):179-83.
117. Wang Y, Tasevski V, Wallace EM, Gallery ED, Morris JM. Reduced maternal serum concentrations of angiopoietin-2 in the first trimester precede intrauterine growth restriction associated with placental insufficiency. *BJOG*. 2007;114(11):1427-31.

118. Wright D, Akolekar R, Syngelaki A, Poon LC, Nicolaides KH. A competing risks model in early screening for preeclampsia. *Fetal Diagn Ther.* 2012;32:171-8.
119. Woolnough C, Wang Y, Kan CY, Morris JM, Tasevski V, Ashton AW. Source of angiopoietin-2 in the sera of women during pregnancy. *Microvasc Res.* 2012;84(3):367-74.
120. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: Expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod.* 2002;66:802–812.
121. Wysolmerski RB, Lagunoff D. Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl AcadSci U S A.* 1990;87(1):16-20.
122. Yu CK, Khouri O, Onwudiwe N, Spiliopoulos Y, Nicolaides KH; Fetal Medicine Foundation Second-Trimester Screening Group. Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler imaging: relationship to gestational age at delivery and small-for-gestational age. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31(3):310-3
123. Zhang EG, Smith SK, Baker PN, Charnock-Jones DS. The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Mol Med.* 2001;7:624–635.
124. Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol.* 2002;160(4):1405-23
125. Khalil A¹, Nicolaides KH. How to record uterine artery Doppler in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013 Oct;42(4):478-9.

Role of the angiopoietin/Tie system in pregnancy (Review)

D. KAPPOU¹, S. SIFAKIS², A. KONSTANTINIDOU³, N. PAPANTONIOU⁴ and D.A. SPANDIDOS⁵

¹First Department of Obstetrics and Gynecology, University of Athens, Athens;

²Department of Obstetrics and Gynecology, University of Crete Medical School, Heraklion, Crete;

³First Department of Pathology, University of Athens Medical School, ⁴Third Department of Obstetrics and Gynecology, University of Athens, Athens; ⁵Laboratory of Clinical Virology, University of Crete Medical School, Heraklion, Crete, Greece

Received January 13, 2015; Accepted February 9, 2015

DOI: 10.3892/etm.2015.2280

Abstract. Angiopoietin-1 and -2 are endogenous ligands for the vascular endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie-2. The angiopoietin/Tie system plays a critical role in the regulation of endothelial cell survival and vascular maturation and stability. Apart from its well-established role in vascular morphogenesis, emerging data support the involvement of angiopoietins in inflammation and various malignancies. Previous studies have underlined the significance of several angiogenic factors in normal placental development. In addition, angiogenic imbalance is observed in pregnancy complications related to impaired placentation, such as preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR). However, there is only limited information available on the role of the angiopoietin/Tie system in the establishment of a competent fetomaternal vascular system. In this review, we present the current knowledge regarding the role of angiopoietins in normal pregnancy and pregnancy complications.

Contents

1. Introduction
2. The angiopoietin/Tie-2 system
3. The role of angiopoietins in normal pregnancy
4. Angiopoietins in pregnancy complications
5. Conclusion

1. Introduction

Successful placentation is dependent on the establishment of a competent vascular network formed by two processes: vasculo-

genesis, which involves the *de novo* formation of vessels from endothelial progenitor cells and branching and non-branching angiogenesis, which is the remodeling of the pre-existing vessels (1). The imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors can lead to impaired placentation, causing major pregnancy complications, such as preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR), which can lead to poor obstetric outcomes (2,3). The role of various angiogenic factors in the pathophysiology of these conditions in pregnancy has been investigated (4). In recent years, in the field of angiogenesis research, studies have focused on the serum levels and placental expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF) and its receptors in normal and pathological pregnancies (5,6). However, there is only limited information available regarding the role of the angiopoietin/Tie signaling system in gestation, that is a second vascular endothelium-specific receptor tyrosine kinase pathway apart from the VEGF system (7). Since there is emerging evidence of the involvement of angiopoietins in pathologies characterized by vascular remodeling (8-10), such as sepsis, diabetic retinopathy and various malignancies, it would be of interest to explore the significance of these factors in the establishment of a competent fetomaternal vascular system that is essential for proper placental function and fetal growth.

In this review, we present current evidence of the function of angiopoietins and provide a detailed description of available data on the role of the angiopoietin/Tie pathway in normal placental development and fetal growth, as well as in pregnancy complications related to defective placentation, such as PE and IUGR.

2. The angiopoietin/Tie system

The angiopoietin system includes four ligands (Ang-1, Ang-2, Ang-3 and Ang-4), of which the most well characterized are Ang-1 and Ang-2, and two corresponding tyrosine kinase receptors (Tie-1 and Tie-2) (11,12). During pregnancy, angiopoietins are mainly produced by the placenta and seem to play a critical role in endothelial cell survival and the remodeling of vessels (Fig. 1). In particular, these factors seem to act complementary to the VEGF system and contribute to the later stages of angiogenesis (12). Both Ang-1 and Ang-2 bind to Tie-2, an endothelial cell-specific tyrosine kinase receptor with similar affinity (13,14). Although Ang-1 and Ang-2 share a similar

Correspondence to: Dr Stavros Sifakis, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Crete Medical School, P.O. Box 2208, 71003 Heraklion, Crete, Greece
E-mail: stavros.sifakis@yahoo.com

Key words: angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin/Tie system, intrauterine growth restriction, placenta, preeclampsia, pregnancy, vascular endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie-2

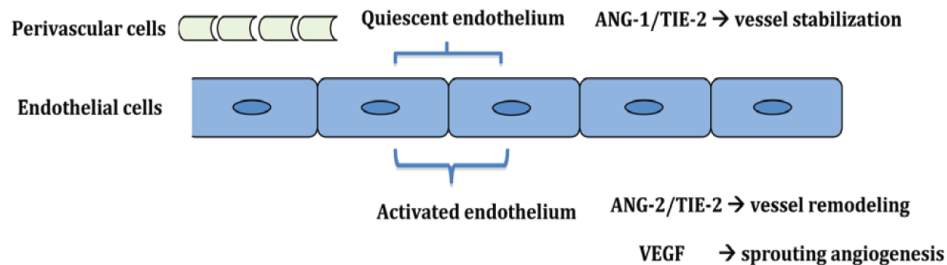


Figure 1. Role of the angiopoietin/Tie system in vessel remodeling and stabilization.

protein structure (Ang-2 is 60% homologous to Ang-1), their biological activities differ significantly (13). Ang-1 acts as a paracrine agonist to Tie-2, leads to receptor dimerization and induces its phosphorylation on several cytoplasmic residues to activate downstream signaling pathways, including the phosphoinositide 3 (PI3)-kinase/Akt and extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathways (15). The activation of the Akt pathway leads to the inhibition of FOXO transcription factors and downregulates the expression of Ang-2, endothelial cell-specific molecule 1 (ESM1) and PIGF (16). Apart from endothelial cells, previous studies have indicated that a distinct population of monocytes, known as Tie-2 expressing monocytes (TEM) and early hematopoietic cells also express the Tie-2 receptor (17,18). The other known Tie receptor (Tie-1; tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains) seems to have weak kinase activity and its functional role has not yet been fully elucidated (19). Ang-1 promotes the reorganization of endothelial cells and the structural integrity of blood vessels by recruiting and interacting with peri-endothelial cells (14,19). An additional role of Ang-1 is to inhibit the activation of the vascular endothelial barrier and reduce the leakage and leucocyte migration into tissues induced by inflammatory agents (20). Despite the fact that the basic functioning of the pathway has been explored, there is no consistency as to the role of Ang-2 in certain conditions of pathological vascular remodeling, such as cancer and inflammation. Several lines of evidence suggest that Ang-2 binds to Tie-2, but primarily acts as an antagonist of Ang-1 signaling. In particular, Ang-2 disrupts the connections between the endothelium and perivascular cells and promotes cell death and vascular regression. In addition, Ang-2 renders endothelial cells more accessible to VEGF that promotes neovascularization (13,19,21). However, in the case of insufficient angiogenic stimuli, Ang-2 causes endothelial cell apoptosis and vessel regression (13).

Challenging this predominant view of the antagonistic Ang-1/Ang-2 concept, there are data suggesting that with longer exposure or at higher concentrations, Ang-2 acts as a Tie-2 agonist in cultured endothelial cells (22,23). In support of this view, in a previous study, when the Ang-2 gene was replaced with a cDNA encoding Ang-1 in Ang-2-deficient mice, the phenotype was partly rescued (24). Therefore, Ang-2 is currently considered as a context-dependent agonist or an antagonist of Tie-2. A recent study also stated that Ang-2 induced Tie-2-independent signaling by binding to integrins on

endothelial cells that expressed low levels of Tie-2 and induced the phosphorylation of integrin adaptor protein, FAK, resulting in RAC1 activation (25). Furthermore, cellular experiments have demonstrated that Ang-2 modulates the responsiveness of endothelial cells to pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and sensitizes these cells to an inflammatory response through an autocrine mechanism (26). Independently from their well-described role in the vascular endothelium, angiopoietins are also involved in the migration and proliferation of trophoblasts and the regulation of nitric oxide release during placentation (27).

Research interest has mainly been focused on the involvement of angiopoietins in various malignancies (28). In particular, the altered expression of Ang-1 and Ang-2 has been observed in several types of cancer, including ovarian and breast cancer, gastric carcinoma, melanoma and non-small cell lung cancer (28-30). In addition, recent studies producing encouraging results have suggested the potential use of specific Ang-2 inhibitors as anti-angiogenic agents to target the tumor vasculature, impairing its development and growth (31,32). There is also accumulating evidence indicating that serum Ang-2 may also be a useful tool as a candidate prognostic biomarker for patients with certain types of cancer, such as colorectal cancer and melanoma (33,34). The exact role of angiopoietins has also been broadly examined in other pathological conditions characterized by extensive vascular remodeling, such as diabetic retinopathy and sepsis (8,10).

3. The role of angiopoietins in normal pregnancy

The first step towards the understanding of the mechanisms through which angiopoietins contribute to the development of pathological conditions in pregnancy is to explore the role of these molecules in normal pregnancy. Ang-1 and Ang-2 are both expressed in the placenta from the very early stages of pregnancy and they mediate a number of endothelial and non-endothelial effects that are thought to be pivotal for proper placental development (27,35,36). Throughout gestation, the placental expression of Ang-1 normally increases, whereas that of Ang-2 and Tie-2 decreases (35,36). The same trend has been demonstrated for the serum levels of these factors (37). The significance of these molecules in early placentation is also highlighted by the fact that the mRNA expression of Ang-2 during the first trimester was found to be 400-fold higher than Ang-1 mRNA expression and 100-fold higher than

VEGF mRNA expression, a factor which has an established role in placental angiogenesis (35). A possible explanation for the predominance of Ang-2 mRNA expression over that of the two angiogenic factors is that Ang-2 likely permits the fetal blood vessels to undergo remodeling and restructures the placenta vasculature to meet the increased oxygen and metabolic demands of the growing fetus. In addition, a previous cross-sectional study on 20 normal pregnancies at 8-41 weeks reported that the placental and protein expression of Ang-2 highly correlated and that they both markedly decreased toward term (35). During pregnancy, the placenta is most probably the main source of circulating Ang-2 as Ang-2 serum levels decrease rapidly following delivery (38).

A few previous *in situ*-hybridization studies have described the localization pattern of angiopoietins in the placenta in different stages of pregnancy. Seval *et al* (2008) demonstrated that in the very early human placenta (as early as the 4th week), Ang-1 protein was localized only in the syncytiotrophoblast, while Ang-2 was localized primarily in the syncytiotrophoblast, and to a lesser extent in the cytotrophoblastic layers of the placental villi (39). This is consistent with a previous report by Zhang *et al* (2001), who demonstrated that Ang-2 mRNA expression was readily detected in the syncytiotrophoblast in first trimester placenta (36). In the human placenta, high levels of Ang-2 mRNA expression have also been observed in perivascular cells and stromal macrophages in immature intermediate villi during the first and second trimester and in mature intermediate and terminal villi during the third trimester (35). Ang-1 is also weakly expressed in endothelial cells within intermediate villi, which is consistent with its role in promoting vascular maturation and stabilization (39). In a previous study, Dunk *et al* (2000) demonstrated that Ang-1 and Tie-2 were detected in the trophoblast bilayer of a first-trimester placenta, whereas Ang-2 mRNA was restricted to the cytotrophoblast (27). In the same study, Ang-1 and Ang-2 were shown to be implicated in the regulation of trophoblast behavior through different mechanisms and to promote the growth and migration of trophoblasts *in vitro* (27). In particular, Ang-1 acts as a potent chemotactic factor for trophoblasts, whereas Ang-2 enhances trophoblast DNA synthesis and triggers nitric oxide release (27). In term placentas, Ang-1 mRNA expression is restricted to the perivascular tissues of the primary stem villi, supporting its role in vessel maturation. Ang-2 is expressed throughout the term villous core and maintains the plasticity of placental vessels (27). In addition, Tie-2 receptors are also expressed in trophoblasts and participate in the regulation of trophoblast behavior (27). The inconsistency observed between different studies may be due to the different gestational age at placental tissue sampling and the different methodologies used.

Experimental studies have also shed further light on the key role of angiopoietins in fetal viability and wellness. In a previous study, mice with null mutations in the Ang-1 gene died at day 12.5 of pregnancy and showed severe vascular abnormalities characterized by disturbance in endothelial/pericyte interactions (40). In another study, mice genetically deficient for Ang-2 showed complex lymphatic and vascular defects and the majority of the mice died two weeks post-natally (24). In turn, Geva *et al* (2005) used a novel murine model system and showed that *in utero* Ang-2 gene delivery impaired endothelial cell adhesiveness, leading to vascular leakiness with

perivascular edema (41). Mice null for Tie-2 have been shown to exhibit severe vascular damage and cardiac abnormalities that cause embryonic lethality at approximately embryonic day 10.5 (42). A previous study by Wulff *et al* (2002) provided a detailed description of the spatial and temporal expression of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in the primate placenta and indicated that Ang-1/Tie-2 may support feto-placental vascular development and stabilization, whereas Ang-2/Tie-2 may remodel the maternal vasculature (43).

4. Angiopoietins in pregnancy complications

The majority of published studies on the role of angiogenic factors in the development of pregnancy disorders related to impaired placentation, such as PE and IUGR have focused on the expression profiles of VEGF, PlGF and its receptors. However, few studies have examined the expression pattern of angiopoietins in the above-mentioned pregnancy disorders.

PE affects approximately 2-7% of all pregnancies and is a major cause of maternal and perinatal morbidity and mortality (44). Although the pathogenesis of this condition is multifactorial, there is robust evidence indicating that PE is associated with impaired placentation and placental hypoxia related to an imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors (4,45). Previous studies that have examined the placental expression of angiopoietins in pregnancies complicated by PE have presented conflicting results and have used rather small sample sizes (Table I). Zhang *et al* (2001) examined the placental tissue samples from nine women with PE at 31-40 weeks of pregnancy and demonstrated lower levels of Ang-2 mRNA expression compared to the control group (36). A similar study by Geva *et al* (2002) demonstrated that the placental Ang-1 and Tie-2 mRNA expression was not altered in five cases of PE with IUGR in the third trimester, whereas there was an increase in Ang-2 mRNA expression that did not reach statistical significance (35). In addition, Sung *et al* (2011) revealed no marked changes in the placental expression of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in placental samples from 19 preeclamptic pregnancies (46). In a recent study, the expression of Ang-2 was significantly increased in placentas obtained from pregnancies complicated by severe PE, whereas no change was observed for Ang-1 levels (47). In addition, no significant association was observed between Ang-1 and Ang-2 in the whole study group. However, the aforementioned study used a small study sample and the proportion of IUGR fetuses among the PE group was not reported. Similarly, a recent study by our group demonstrated an increase in the expression of Ang-2 in the PE and PE-IUGR group consisting of 58 pregnant women compared to the control group (48). To the best of our knowledge, this is the largest sample size in similar studies reported thus far. Our data also indicated that Ang-2 expression was even higher in the PE-IUGR group, suggesting a direct association of this angiogenic factor with the severity of the disease. Additionally, we detected the decreased expression of Ang-1 in PE, a trend that was not observed in the study by Han *et al* (47). Our analysis revealed a weak association between Ang-1 and Ang-2 in the PE-IUGR group and no significant correlation was observed between these parameters in the control and the PE group, in accordance with the study by Han *et al*. These findings are in line with those of earlier reports that support

Table I. List of studies that examined the levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in placental specimens from pregnancies complicated by PE and IUGR.

Authors/(Refs.)	Year	Sample size	Gestational frame in weeks	Pregnancy complication	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Dunk <i>et al</i> (27)	2000	6	28-36	Severe IUGR		NS	
Zhang <i>et al</i> (36)	2001	9	31-40	PE		↓	
Geva <i>et al</i> (35)	2002	5	25-41	Severe PE		NS	
Sung <i>et al</i> (46)	2011	19		PE	NS	NS	NS
Han <i>et al</i> (47)	2012	16	28-41	Severe PE	NS	↑	
Kappou <i>et al</i> (48)	2014	28 PE + 30 PE/IUGR	34-39	PE PE + IUGR	↓	↑	↑

PE, preeclampsia; IUGR, intrauterine growth restriction; NS, not significant; The upward arrows indicate the upregulated expression and the downward arrows indicate the downregulated expression of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in the indicated studies.

an excess of circulating levels of anti-angiogenic factors even before the clinical manifestation of PE (2,49). It is notable that Zhang *et al* (2001) examined how the oxygen tension in the placenta can influence the levels of angiotensin expression and demonstrated that the Ang-1 mRNA level was not significantly altered by reduced oxygen, while a reduction in oxygen tension significantly increased the levels of Ang-2 mRNA through the activation of hypoxia-inducible factor-1 α , leading to vessel instability and remodeling (36). This is important, as placenta hypoxia is an established factor of PE pathogenesis. Consistently, data from a study on bovine models demonstrated that hypoxia upregulated the expression of Ang-2, but not Ang-1 mRNA expression (50).

The same inconsistency is also apparent in studies that have examined the maternal circulation levels of angiotensins in pregnancies complicated by PE before or after the clinical manifestation of the disease. In cases with established PE, the majority of studies have reported lower circulating concentrations of Ang-2 (38,51,52) and Tie-2 (46,51,53) compared to the unaffected controls. However, Leinonen *et al* demonstrated that circulating maternal Ang-2 concentrations were elevated in the early midtrimester (16-20 weeks of gestation) in women that subsequently developed PE (37). These findings support the hypothesis that an excess of anti-angiogenic factors may be a predisposing factor for PE and may be apparent before the clinical onset of the disease. Moreover, the authors stated that the levels of Ang-2 were associated with the severity of the disease. Similarly, our recently published data demonstrated a higher placental expression of Ang-2 in pregnancies complicated by PE and IUGR, which is a distinct and more severe form of PE (48). A recent longitudinal study demonstrated the upregulation of Ang-2 levels and decreased Ang-1 levels in maternal serum in the whole gestational frame; in addition it was shown that the Ang-1/Ang-2 ratio at 25-28 gestational weeks may have predictive value for women who later developed PE (54). This is a very promising finding, as there is evidence supporting the ability of other angiogenic factors, such as PlGF to identify pathological pregnancy outcomes, such as IUGR and PE before clinical diagnosis with adequate sensitivity (55,56). At 11-13 weeks of gestation, the maternal serum

concentration of Ang-2 has been reported to be either lower (57) or not altered in women who subsequently develop PE (58). Akolekar *et al* concomitantly examined the first trimester maternal serum levels of Ang-2 in pregnancies with gestational hypertension and found no significant changes compared to the control group (58). A recent study assessed Ang-1, Ang-2 and the Ang-1/Ang-2 ratio levels in the first trimester of pregnancy and the association with adverse pregnancy outcomes (small for gestational age, pre-term birth, PE, miscarriage after 10 weeks of gestation, and stillbirth) (59). According to the findings of the former study, low Ang-2 levels and a high Ang-1/Ang-2 ratio were related to an increased risk for most adverse pregnancy outcomes, but did not improve the prediction given by maternal and clinical factors alone (58). In support of this finding, first trimester maternal serum levels of Ang-1 were found to be elevated in women with PE and concomitant IUGR (37). As regards the studies on Tie-2 in maternal serum, it should be clarified that the measurable part is the circulating soluble Tie-2 receptor (sTie-2) fragment that is cleaved constitutively from the extracellular domain of membrane-bound Tie-2, binds both to Ang-1 and Ang-2 and inhibits angiotensin-mediated Tie-2 activation. Moreover, data have suggested the existence of a novel metalloproteinase-dependent mechanism through which release of sTie-2 is induced by VEGF in endothelial cells and leads to a decrease in active receptors on the cell surface (60). As VEGF and Ang act through distinct tyrosine kinase receptors, this mechanism suggests that VEGF is involved in the regulation of Ang function indirectly through the proteolytic shedding of Tie-2.

The role of angiotensins has only scarcely been investigated in pregnancies with fetal growth restriction, a condition that complicates 4-7% of live births in developed countries and is related to a spectrum of perinatal complications, including fetal morbidity and mortality. Placental insufficiency related to defective placental angiogenesis often represents the underlying cause of IUGR (61). In particular, placentas from pregnancies complicated IUGR are characterized by defective vascular transformation and terminal villus formation (3). At 11-13 weeks of gestation, Wang *et al* demonstrated that Ang-2 maternal serum levels were reduced in 13 women who subsequently developed

IUGR compared to 23 unaffected controls (57). However, in that study, it was not defined whether IUGR was related to PE or could be classified as idiopathic. This is in contrast to the study by Leinonen *et al* that examined the circulating levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 at 12-15 or 16-20 gestational weeks in 16 women with subsequent isolated IUGR compared to 59 healthy women served as controls (37). In that study, maternal serum Ang-2 concentrations were higher in women with subsequent IUGR only at 16-20 gestational weeks. Further studies are required to elucidate whether the involvement of these factors is a primary mechanism leading to the abnormal placental development or whether the altered expression of these angiogenic growth factors reflects other, as yet unidentified mechanisms. The altered placental expression of the angiopoietin/Tie-2 system has been observed in pregnancies complicated by placenta accreta and in women with recurrent abortion (62,63); however, these conditions are not within the scope of this review article.

Conclusion

There is emerging evidence indicating that the angiopoietin/Tie-2 signaling system is essential for the proper reorganization of the placental vascular system even from the very first stages of pregnancy. In recent years, an increasing number of studies in the field of cancer research have not only highlighted the important role of angiopoietins in tumor progression, but have also attempted to implicate them as factors in the prognostic and therapeutic field (28,30,64,65). However, available information on the function of angiopoietins during pregnancy is still limited, as the main interest has been focused on the VEGF and PlGF systems. In addition, the majority of published studies are case-control studies that describe the observed alterations in the levels of angiopoietins in pathological pregnancies, but do not elucidate the aetiopathogenesis and the underlying mechanisms. Additional studies with sufficient sample sizes and strict criteria for the recruitment of study populations are required in order to draw a final conclusion as to the alteration profile of angiopoietins in pregnancies complicated by PE and/or IUGR. Moreover, the prognostic value of these factors as biomarkers for particular pathological conditions during pregnancy should also be investigated in prospective studies.

References

1. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ and Holash J: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000.
2. Maynard SE and Karumanchi SA: Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol* 31: 33-46, 2011.
3. Gourvas V, Dalpa E, Konstantinidou A, Vrachnis N, Spandidos DA and Sifakis S: Angiogenic factors in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction (review). *Mol Med Rep* 6: 23-27, 2012.
4. Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, *et al*: Maternal plasma concentrations of angiogenic/antiangiogenic factors in the third trimester of pregnancy to identify the patient at risk for stillbirth at or near term and severe late preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 208: 287.e1-287.e15, 2013.
5. Gómez-Arriaga PI, Herráiz I, López-Jiménez EA, Escribano D, Denk B and Galindo A: Uterine artery Doppler and sFlt-1/PlGF ratio: Prognostic value in early-onset pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 43: 525-532, 2014.
6. Andraweera PH, Dekker GA and Roberts CT: The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Hum Reprod Update* 18: 436-457, 2012.
7. Charnock-Jones DS: Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature. *J Anat* 200: 607-615, 2002.
8. Park SW, Yun JH, Kim JH, Kim KW, Cho CH and Kim JH: Angiopoietin 2 induces pericyte apoptosis via $\alpha 3\beta 1$ integrin signaling in diabetic retinopathy. *Diabetes* 63: 3057-3068, 2014.
9. Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P and Alitalo K: VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends Mol Med* 17: 347-362, 2011.
10. Mussap M, Cibecchini F, Noto A and Fanos V: In search of biomarkers for diagnosing and managing neonatal sepsis: The role of angiopoietins. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26 (Suppl 2): 24-26, 2013.
11. Thurston G: Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 314: 61-68, 2003.
12. Thomas M and Augustin HG: The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12: 125-137, 2009.
13. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, *et al*: Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60, 1997.
14. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, *et al*: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169, 1996.
15. Khan AA, Sandhya VK, Singh P, *et al*: Signalling network map of endothelial TIE2 tyrosine kinase. *J Signal Transduct* 2014: 173026, 2014.
16. Daly C, Wong V, Burova E, *et al*: Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev* 18: 1060-1071, 2004.
17. Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, *et al*: Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res* 70: 5270-5280, 2010.
18. Yuan HT, Venkatesha S, Chan B, Deutsch U, Mammoto T, Sukhatme VP, Woolf AS and Karumanchi SA: Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival. *FASEB J* 21: 3171-3183, 2007.
19. Augustin HG, Koh GY, Thurston G and Alitalo K: Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 165-177, 2009.
20. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM and Yancopoulos GD: Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6: 460-463, 2000.
21. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y and Augustin HG: The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 118: 771-780, 2005.
22. Daly C, Eichten A, Castanaro C, *et al*: Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer Res* 73: 108-118, 2013.
23. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD and Stewart DJ: Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 49: 659-670, 2001.
24. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH and Jackson D: Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3: 411-423, 2002.
25. Felcht M, Luck R, Schering A, *et al*: Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest* 122: 1991-2005, 2012.
26. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, *et al*: Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12: 235-239, 2006.
27. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B and Ahmed A: Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 156: 2185-2199, 2000.
28. Shim WS, Ho IA and Wong PE: Angiopoietin: A TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 5: 655-665, 2007.
29. Brunckhorst MK, Xu Y, Lu R and Yu Q: Angiopoietins promote ovarian cancer progression by establishing a pro-cancer microenvironment. *Am J Pathol* 184: 2285-2296, 2014.

30. Huang H, Bhat A, Woodnutt G and Lappe R: Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer* 10: 575-585, 2010.
31. Biel NM and Siemann DW: Targeting the Angiopoietin-2/Tie-2 axis in conjunction with VEGF signal interference. *Cancer Lett*: Oct 12, 2014 (Epub ahead of print).
32. Mazzieri R, Pucci F, Moi D, *et al.*: Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* 19: 512-526, 2011.
33. Goede V, Coutelle O, Neuneier J, *et al.*: Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *Br J Cancer* 103: 1407-1414, 2010.
34. Helfrich I, Edler L, Sucker A, *et al.*: Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 15: 1384-1392, 2009.
35. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A and Jaffe RB: Human placental vascular development: Vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4213-4224, 2002.
36. Zhang EG, Smith SK, Baker PN and Charnock-Jones DS: The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placenta. *Mol Med* 7: 624-635, 2001.
37. Leinonen E, Wathén KA, Alfthan H, Ylikorkala O, Andersson S, Stenman UH and Vuorela P: Maternal serum angiopoietin-1 and -2 and tie-2 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 126-133, 2010.
38. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, Masuyama H, Hiramatsu Y and Makino H: Elevated serum sFlt-1/Ang-2 ratio in women with preeclampsia. *Nephron Clin Pract* 106: c43-c50, 2007.
39. Seval Y, Sati L, Celik-Ozenci C, Taskin O and Demir R: The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta* 29: 809-815, 2008.
40. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180, 1996.
41. Geva E, Ginzinger DG, Moore DH II, Ursell PC and Jaffe RB: In utero angiopoietin-2 gene delivery remodels placental blood vessel phenotype: A murine model for studying placental angiogenesis. *Mol Hum Reprod* 11: 253-260, 2005.
42. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W and Qin Y: Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376: 70-74, 1995.
43. Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ and Fraser HM: Hemochorial placentation in the primate: Expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 66: 802-812, 2002.
44. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ and Pijnenborg R: Pre-eclampsia. *Lancet* 376: 631-644, 2010.
45. Kleinrouweler CE, Wiegerinck MM, Ris-Stalpers C, Bossuyt PM, van der Post JA, von Dadelszen P, Mol BW and Pajkrt E; EBM CONNECT Collaboration: Accuracy of circulating placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in the prediction of pre-eclampsia: A systematic review and meta-analysis. *BJOG* 119: 778-787, 2012.
46. Sung JF, Fan X, Dhal S, Dwyer BK, Jafari A, El-Sayed YY, Druzin ML and Nayak NR: Decreased circulating soluble Tie2 levels in preeclampsia may result from inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 96: E1148-E1152, 2011.
47. Han SY, Jun JK, Lee CH, Park JS and Syn HC: Angiopoietin-2: A promising indicator for the occurrence of severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 31: 189-199, 2012.
48. Kappou D, Sifakis S, Androutsopoulos V, Konstantinidou A, Spandidos DA and Papanitou N: Placental mRNA expression of angiopoietins (Ang)-1, Ang-2 and their receptor Tie-2 is altered in pregnancies complicated by preeclampsia. *Placenta* 35: 718-723, 2014.
49. Szpera-Gozdziewicz A and Breborowicz GH: Endothelial dysfunction in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Front Biosci (Landmark Ed)* 19: 734-746, 2014.
50. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M and Honda Y: Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 274: 15732-15739, 1999.
51. Vuorela P, Matikainen MT, Kuusela P, Ylikorkala O, Alitalo K and Halmesmaki E: Endothelial tie receptor antigen in maternal and cord blood of healthy and preeclamptic subjects. *Obstet Gynecol* 92: 179-183, 1998.
52. Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, Masuyama H, Hiramatsu Y and Makino H: Increase of serum angiopoietin-2 during pregnancy is suppressed in women with preeclampsia. *Am J Hypertens* 18: 1181-1188, 2005.
53. Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, *et al.*: Preeclampsia and small-for-gestational age are associated with decreased concentrations of a factor involved in angiogenesis: Soluble Tie-2. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21: 389-402, 2008.
54. Bolin M, Wiberg-Itzel E, Wikström AK, Goop M, Larsson A, Olovsson M and Akerud H: Angiopoietin-1/angiopoietin-2 ratio for prediction of preeclampsia. *Am J Hypertens* 22: 891-895, 2009.
55. Schoofs K, Grittner U, Engels T, Pape J, Denk B, Henrich W and Verloren S: The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PIGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *J Perinat Med* 42: 61-68, 2014.
56. Vrachnis N, Kalampokas E, Sifakis S, Vitoratos N, Kalampokas T, Botsis D and Iliodromiti Z: Placental growth factor (PIGF): A key to optimizing fetal growth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26: 995-1002, 2013.
57. Wang Y, Tasevski V, Wallace EM, Gallery ED and Morris JM: Reduced maternal serum concentrations of angiopoietin-2 in the first trimester precede intrauterine growth restriction associated with placental insufficiency. *BJOG* 114: 1427-1431, 2007.
58. Akolekar R, Casagrandi D, Skyfta E, Ahmed AA and Nicolaides KH: Maternal serum angiopoietin-2 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat Diagn* 29: 847-851, 2009.
59. Schneuer FJ, Roberts CL, Ashton AW, Guilbert C, Tasevski V, Morris JM and Nassar N: Angiopoietin 1 and 2 serum concentrations in first trimester of pregnancy as biomarkers of adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 210: 345 e1-e9, 2014.
60. Findley CM, Cudmore MJ, Ahmed A and Kontos CD: VEGF induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/Akt dependent pathway to modulate Tie2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2619-2626, 2007.
61. Regnault TR, Galan HL, Parker TA and Anthony RV: Placental development in normal and compromised pregnancies- a review. *Placenta* 23 (Suppl A): S119-S129, 2002.
62. Tseng JJ, Hsu SL, Ho ES, Hsieh YT, Wen MC and Chou MM: Differential expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie receptors in placentas from pregnancies complicated by placenta accreta. *Am J Obstet Gynecol* 194: 564-571, 2006.
63. Vuorela P, Carpén O, Tulppala M and Halmesmaki E: VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 6: 276-282, 2000.
64. Hall M, Gourley C, McNeish I, Lederermann J, Gore M, Jayson G, Perren T, Rustin G and Kaye S: Targeted anti-vascular therapies for ovarian cancer: current evidence. *Br J Cancer* 108: 250-258, 2013.
65. Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG and Benjamin LE: Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. *Cancer Res* 73: 1649-1657, 2013.



Placental mRNA expression of angiopoietins (Ang)-1, Ang-2 and their receptor Tie-2 is altered in pregnancies complicated by preeclampsia



D. Kappou^{a, b, *}, S. Sifakis^b, V. Androutsopoulos^c, A. Konstantinidou^d, D.A. Spandidos^c, N. Papantoniou^a

^a 1st Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Athens Medical School, Alexandra Hospital, Athens, Greece

^b Department of Obstetrics & Gynecology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

^c Department of Clinical Virology, University of Crete, Medical School, Heraklion, Greece

^d 1st Department of Pathology, University of Athens, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 2 July 2014

Keywords:
Angiopoietin-1
Angiopoietin-2
Angiogenesis
Placenta
Preeclampsia
Tie-2

ABSTRACT

Objective: To investigate the placental expression of angiopoietin (Ang)-1, Ang-2 and their receptor, Tie-2, in preeclampsia (PE) with or without intrauterine growth restriction (IUGR).

Methods: Case-control study including placentas from 28 PE pregnancies, 30 PE-IUGR pregnancies and 40 controls. The expression status of the genes was evaluated by quantitative real-time PCR.

Results: In both PE and PE-IUGR groups, compared to the control group, there was significantly higher expression of Ang-2 ($p < 0.001$) and Tie-2 ($p = 0.008$) and lower expression of Ang-1 ($p = 0.001$). The magnitude of the difference was similar for Ang-1 for both groups, whereas the magnitude of the differences was higher for Ang-2 and Tie-2 in PE-IUGR group compared to controls. Ang-2 and Tie-2 were correlated in both PE ($r = 0.8602$, $p < 0.001$) and PE-IUGR ($r = 0.6342$, $p < 0.001$) groups. In PE-IUGR group, Ang-1 was associated to Ang-2 ($r = 0.3458$, $p = 0.0452$) and Tie-2 ($r = 0.4448$, $p = 0.0084$). \log_{10} Ang-1 but not Ang-2 was gestational age dependent ($R^2 = 0.40$, $p < 0.001$). After conversion in Multiples of the Median (MoM) \log_{10} MoM Ang-1 was reduced in the PE group (mean = -0.8181 , $p < 0.001$) and the PE-IUGR group (mean = -1.2583 , $p < 0.001$) compared to control group (mean = -0.0924).

Discussion: We have demonstrated increased placental expression of Ang-2 and Tie-2 along with lower expression levels of Ang-1 in pregnancies with PE and PE-IUGR.

Conclusion: The angiopoietin axis seems to be disrupted in PE pregnancies. Whether the results of this study represent the angiogenic imbalance observed in PE pregnancies or they are part of the pathophysiology of this condition has to be further investigated.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Preeclampsia (PE) affects approximately 2–7% of all pregnancies and is a major cause of maternal and perinatal morbidity and mortality [1]. There is robust evidence that PE is associated with impaired placentation and placental hypoxia followed by an

angiogenic imbalance [2–4]. Successful placentation is dependent on the establishment of a competent vascular network formed by two processes: vasculogenesis, which involves the de novo formation of vessels and branching and non-branching angiogenesis, which is the remodeling of the existing vascular network [5,6].

Angiopoietin (Ang)-1 and Ang-2 are angiogenic growth factors that play a crucial role in the later stages of placental angiogenesis [7,8]. In addition, numerous reports implicate Ang-1 and Ang-2 in regulating the maturation and stabilization of vessels in different systems [6,8]. Both factors bind to the tyrosine phosphorylation of Tunica interna endothelial cell-kinase-2 (Tie-2) receptor on endothelial cells, which is activated by Ang-1 and blocked by Ang-2 [9,10]. The other known Tie receptor (Tie-1) is considered an orphan receptor [11]. Ang-1 promotes the structural integrity of blood vessels by recruiting and interacting with peri-endothelial

Abbreviations: Ang-1, angiopoietin-1; Ang-2, angiopoietin-2; CRL, crown-rump length; EFW, estimated fetal weight; GA, gestational age; UA-PI, umbilical artery pulsatility index; SUOG, International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology; IUGR, intrauterine growth restriction; MCA, middle cerebral artery; MoM, multiples of the median; PE, preeclampsia; PI, pulsatility index; Tie-2, Tunica interna endothelial cell-kinase-2 receptor; UA, umbilical artery.

* Corresponding author. 1st Department of Obstetrics and Gynaecology, Alexandra Hospital, Athens University Medical School, 80 Vasilissis Sofias Avenue, 11528 Athens, Greece. Tel.: +30 6985800945.

E-mail address: d.kappou@yahoo.com (D. Kappou).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.07.001>
0143-4004/© 2014 Published by Elsevier Ltd.

cells, exhibits anti-inflammatory properties and stimulates endothelial cell migration [12,13]. Ang-2 acts as the natural antagonist of Ang-1 on the endothelium, and overexpression of Ang-2 leads to disruption of vessel structure [9]. Independently from their well-described role in the vascular endothelium, angiopoietins are also involved in trophoblast migration, proliferation and regulation of nitric oxide release during placentation [14].

Animal and human studies have shown that Ang-1, Ang-2 and Tie-2 are expressed in placenta even from the first trimester [7,15]. In normal pregnancies, placental expression of Ang-1 increases, whereas that of Ang-2 and Tie-2 decreases as the pregnancy advances [16,17]. In knockout models, mice deficient for the Ang-1 or Tie-2 genes die in utero, and those deficient for the Ang-2 gene die soon after birth due to vascular defects [18–20]. However, little is known about the role of angiopoietins in pregnancies with impaired placentation, such as PE and fetal growth restriction (IUGR). The majority of published studies examined the maternal serum levels of these factors in different trimesters (Table 1). To the best of our knowledge, only five studies have examined the placental expression of angiopoietins in PE pregnancies with rather small sample sizes and contradictory results [14,16,17,21,22].

Our aim was to investigate the placental expression of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 genes in pregnancies complicated by PE with or without IUGR and in normotensive controls. Additionally, we examined the association between these factors in normal and preeclamptic pregnancies.

2. Methods

This is a case control study of 98 singleton pregnancies. The study population comprised of placentas obtained from 28 women with PE, 30 women with PE and IUGR (PE-IUGR) and 40 women with normotensive singleton pregnancies.

The gestational age (GA) in days was defined by the last menstrual period. In cases where the dates were uncertain or the difference between the menstrual dates and the CRL-derived dates was more than seven days, GA was corrected by CRL at 11–13 weeks of pregnancy. Demographic data, maternal and pregnancy characteristics and medical history were recorded from our maternity computerized records. In detail, age, parity, previous medical history, pregnancy-associated complications, medication, weight, height, gestation age at delivery, mode of delivery and smoking status were retrieved for our analysis.

According to local protocols, an ultrasound examination for fetal biometry and Doppler studies was carried out in the third trimester. All measurements were obtained according to International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG) guidelines [32]. Estimated fetal weight (EFW) was calculated by the Hadlock formula [33]. Color Doppler was used to map the umbilical artery (UA) and the middle cerebral artery (MCA). Preeclamptic women in whom the fetal EFW was below the 5th centile with or without Doppler abnormalities were followed-up until delivery to obtain the PE-IUGR cohort.

Placental samples were collected at delivery from both groups. The biopsy specimens were taken immediately after the extraction of the placenta from the uterus, six basal plate biopsy specimens of the maternal–fetal interface, approximately 5 mm² in size, were randomly excised from each placenta in a way that each sample contained the decidua basalis and villous placenta. Areas involving calcification or infarcts were avoided. The tissue specimens were immediately frozen at –80 °C and stored until processing.

The Research and Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion, Crete, Greece, approved the study, and written informed consent was obtained from all participants.

Table 1
Previous studies that examined the levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in placenta and maternal serum in pregnancies complicated with preeclampsia and/or intrauterine growth restriction.

Author & year	Specimen	Sample size	Gestational frame in weeks	Pregnancy complication	Ang-1	Ang-2	Tie-2
Dunk et al., 2000 [14]	Placenta	6	28–36	Severe IUGR		NS	
Zhang et al., 2001 [17]	Placenta	9	31–40	PE		↓	
Geva et al., 2002 [16]	Placenta	5	25–41	Severe PE		NS	
Sung et al., 2011 [22]	Placenta	19		PE	NS	NS	NS
Han et al., 2012 [21]	Placenta	16	28–41	Severe PE	NS	↑	
Vuorela et al., 1998 [23]	Serum	15	14–41	PE	↑	↓	↓
Hirokoshi et al., 2005 [24]	Serum	26	25–40	PE		↓	
Hirokoshi et al., 2007 [25]	Serum	30	25–40	PE		↓	
Wang et al., 2007 [26]	Serum	13	10–13	Severe IUGR		↓	
Gotsch et al., 2008 [27]	Serum	112 PE + 53 SGA	23.4–42.4	PE or SGA			↓
Akolekar et al., 2009 [28]	Serum	126	11–13	PE		NS	
Bolin et al., 2009 [29]	Serum	19	10–37	PE	↓	↑	
Leinonen et al., 2010 [30]	Serum	49 PE + 16 IUGR	12–15 and 16–20	PE or IUGR	NS	↑ at 16–20	NS
Kamal et al., 2011 [31]	Serum	68	38 ± 2.1	PE	↓	NS	↓
Sung et al., 2011 [22]	Serum	19		PE			↓
Han et al., 2012 [21]	Serum	16	28–41	Severe PE	NS	↑	
Present study	Placenta	28 PE + 30 PE/IUGR	34–39	PE PE-IUGR	↓	↑	↑

PE: preeclampsia; IUGR: intrauterine growth restriction; SGA: small for gestational age; NS: non statistical.

2.1. Outcome measures and definitions

Fetuses with a birth weight equal or less than the 5th percentile for gestation at delivery, with or without Doppler abnormalities were classified as IUGR. We applied birth weight reference ranges derived from the Greek population [34]. Doppler abnormalities were considered umbilical artery pulsatility index (UA-PI) >95th centile, or fetal hemodynamic redistribution.

The definition of PE was that of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy [35]. A systolic blood pressure of 140 mmHg or more and a diastolic blood pressure of 90 mmHg or more on at least two occasions 4 h apart, developing after 20 weeks of gestation together with significant proteinuria in previously normotensive women, was the PE definition that we used. Significant proteinuria is defined by 300 mg or more in 24 h or two readings of at least ++ on dipstick analysis of midstream or catheter urine specimens if no 24 h collection is available. Cases with essential hypertension and superimposed PE were excluded.

Other exclusion criteria were pre-existing diabetes type I and II, pre-existing hypertension and gestational diabetes mellitus. We also excluded pregnancies with chromosomally and/or structurally abnormal fetuses and pregnancies resulting in intra-uterine death. In all pregnancies, there were no signs of maternal or fetal infection. Control group included normotensive women that fulfilled the above-mentioned criteria with a normal third trimester ultrasound scan and fetuses with appropriate birth weight for their gestational age at delivery.

2.2. RNA extraction

Total RNA was extracted using TRIzol as described previously [36,37]. Placental tissues were cut into small sections and homogenized in the presence of 1 ml TRIzol. Following the addition of chloroform (200 µl) the resulting mixture was centrifuged at 13,000 rpm for 15 min. The interphase layer containing the RNA was removed and placed in a separate Eppendorf tube for each sample. 500 µl of isopropanol were added and the samples were centrifuged further for 10 min at 13,000 rpm. The resulting pellet containing the RNA was washed once with 75% ethanol and resuspended in 25 µl of DEPC-treated water.

2.3. Reverse transcription and real-time PCR

Reverse transcription was carried out using a Takara RT kit according to the manufacturer's instructions. 1 µg of RNA was mixed with H₂O and oligo(dT) primers, pre-heated at 25 °C for 5 min and incubated at 43 °C for 1 h in the presence of DNTPs, reverse transcriptase and reaction buffer containing MgCl₂ (5 mM).

Real-time PCR was carried out by incubation of 0.5 µl of cDNA with 8.3 µl of H₂O, 1.2 µl primers and 10 µl SyBr master mix in a total volume of 20 µl per reaction. mRNA-specific primers for Ang-1, Ang-2 and Tie-2 were obtained from previous studies [38]. Their sequences were as follows:

Ang-1 FP (CAGACTGCAGAGCAGACCAGAA)
 RP (CTCTAGCTGTAGTGGATAATGAATTC)
 Ang-2 FP (AAGAGATCAAGGCCTACTGTGACA)
 RP (TCCTCACGTCGCTGAATAATTG)
 Tie-2 FP (CTGTGAAGGGCGAGTTCGA)
 RP (TGTTAGGAAGGAAGCTGTGTGAC)

The samples were subjected to 40 cycles of amplification with denaturation at 95 °C for 1 min. Annealing temperature was standardized at 60 °C for 30 s for Ang-2 and Tie-2 primers and at 58 °C for 30 s for Ang-1 primers. Chain elongation was carried out at 72 °C for 30 s. Quantification was achieved by the use of a standard curve for each gene. Normalization of Ang-1, Ang-2 or Tie-2 transcripts was performed against the housekeeping gene GAPDH by the $\Delta\Delta Ct$ method.

2.4. Data management and statistical analysis

We applied exploratory data analysis in terms of descriptive values, probability density histograms and the Shapiro–Wilk test for all the examined parameters. We identified significant deviation from the Gaussian normal distribution for all placental factors. Normally distributed continuous parameters were compared by an unpaired *t*-test, whereas the Mann–Whitney *U*-test was used for non-normally distributed continuous variables. Levene's test for equality of variances was used in combination with the *t*-test. The Chi-square test was applied to compare categorical variables. Post-hoc comparisons between all groups were used, after Bonferroni correction for multiple testing. Spearman's Rho was calculated for all possible pairs after adjustment for multiple testing.

Linear regression analysis was used to define the association between angiogenic factor expression and gestational age at delivery. Log₁₀-transformation of the examined variables was applied to obtain Gaussian distributions and reduce heteroscedasticity. Cook's distances were computed to remove influential outliers that affected regression modeling. Ang-1 had a significant association with GA at delivery. Thus, we obtained log₁₀ transformed Multiples of the Median (MoM) for Ang-1 (log₁₀ MoM Ang-1) by the equation:

Log₁₀ MoM Ang-1 = Log₁₀ measured Ang-1 – Log₁₀ predicted by the regression equation Ang-1.

Table 2

Characteristics of the study sample.^a

	PE	PE-IUGR	Controls	<i>p</i> -value
Cases (n)	28	30	40	
Maternal age in years	30 (6.1)	30.5 (6.2)	30 (4.2)	0.929 ^c
Maternal height in cm	165 (5.4)	164 (5.6)	162 (6.9)	0.482 ^c
Maternal weight in Kg	82 (17.6)	79 (16.4)	72 (7.6)	0.05 ^c
Gestational age at delivery in days	262 (21.6)	237 (27.6)	270 (13.2)	<0.001 ^c
Birth weight in gr	2580 (786)	1465 (627)	3150 (520)	<0.001 ^c
Mode of delivery (Caesarean section)	52%	92.9%	29.4%	0.220 ^b
Parity (Nulliparous)	72%	73.1%	52.9%	0.002 ^b
Child gender (Male)	49%	53%	48%	0.789 ^b
Smoking status (Smokers)	5.6%	6.7%	7.2%	0.768 ^b

^a data presented as median (SD) or percentage.

^b Chi-square test for categorical variables.

^c non-parametric Kruskal–Wallis test for continuous variables.

3. Results

Our study sample included 28 pregnancies with PE, 30 pregnancies with PE-IUGR and 40 normotensive controls. The demographic patient characteristics are presented in Table 2. As expected, there were significant differences between GA, birth weight and parity between the three subgroups (Table 2). Especially for GA in the PE–IUGR group we had a case of a late second trimester placenta which was the minimum GA (23.2 weeks). All other cases were third trimester placentas. In our exploratory data analysis, we found that the examined parameters significantly deviated from the Gaussian distribution (Shapiro–Wilk test, $p < 0.001$ for all parameters). Non-parametric comparisons revealed that Ang-1 expression was significantly decreased in the PE and PE-IUGR group (Table 3, Fig. 1a). Ang-2 and Tie-2 levels were higher in the PE group and the PE-IUGR group compared to the control group (Table 3, Fig. 1b, c). Post-hoc analysis (non-parametric Mann–Whitney *U*-test) with Bonferroni correction showed that the PE-IUGR group had a significantly higher expression of Ang-2 and Tie-2 compared to the PE group (Table 3, Fig. 1b, c). Non-parametric correlation analysis after correction for the family-wise error, demonstrated a positive association between Ang-2 and Tie-2 in the PE group and this association was robust (Spearman's Rho: 0.8602, $p < 0.0001$). The same trend was found in the PE-IUGR group (Spearman's Rho: 0.6342, $p < 0.0001$), but not in the control group ($p = 0.6943$). The results of the correlational analysis are summarized in Table 4. Furthermore, we carried out regression analysis in the control group to define the association between Ang-1 and GA at delivery; hence, at the time of placental sample collection. We found that Ang-1 expression was significantly reduced with increasing GA. The equation that describes this association is the following:

Log₁₀ Ang-1 = 3.799 ($p = 0.022$) – 0.017 × GA in days ($p = 0.007$) ($R^2 = 0.40$, $p < 0.001$)

For Log₁₀ Ang-2 no significant relation with GA at delivery was observed ($p = 0.431$). Similarly for log₁₀Tie –2, we found no significant relation with GA at delivery ($p = 0.893$).

Table 3

Univariate comparisons for the examined variables in the PE, the PE-IUGR, and the control group.

Examined variables	PE group median	PE-IUGR group median	Control group median	Test (<i>p</i> value)
Ang-1	0.03986	0.04002	0.11554	Mann Whitney ($p = 0.001$)
Ang-2	0.4475	1.7346	0.0242	Mann Whitney ($p < 0.001$)
Tie-2	0.8531	4.5204	0.0932	Mann Whitney ($p = 0.008$)

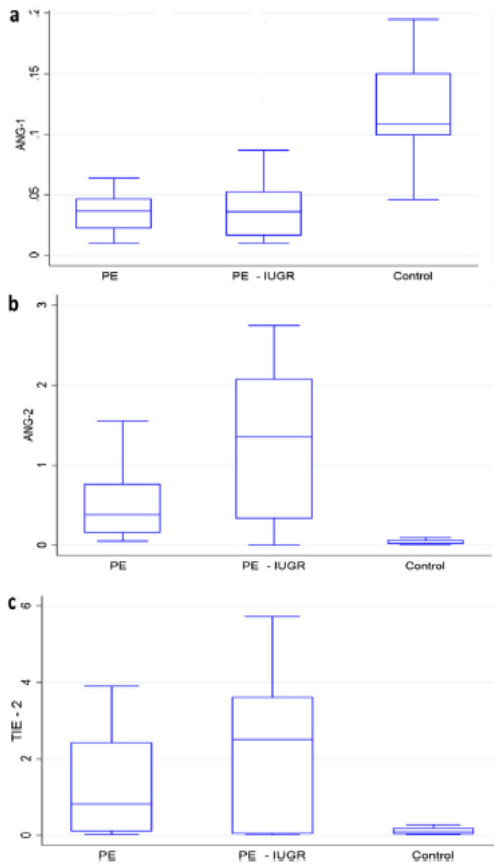


Fig. 1. Placenta mRNA expression levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in normal controls, pregnancies with preeclampsia (PE) and pregnancies with preeclampsia and fetal growth restriction (PE-IUGR) (a, b, and c, correspondingly).

Table 4
Correlational matrix for the PE and the PE-IUGR groups. Spearman's Rho values are displayed with the respective *p*-values in the parentheses. The presented *p*-values are not adjusted for multiple comparisons to control for family-wise error and they are considered descriptive. Whenever a second parenthesis is presented is the adjusted *p*-value after Bonferroni correction for multiple hypothesis testing. Only the significant *p*-values after Bonferroni correction are presented.

	Ang-1	Ang-2	Tie-2
<i>PE group</i>			
Ang-1	1		
Ang-2	-0.1398 [0.5565]	1	
Tie-2	-0.2165 [0.3591]	0.8602 (<i><0.001</i>) (<i><0.001</i>)	1
<i>PE-IUGR group</i>			
Ang-1	1		
Ang-2	0.3458 [0.0452]	1	
Tie-2	0.4448 [0.0084]	0.6342 (<i><0.001</i>) (<i><0.001</i>)	1
<i>Control group</i>			
Ang-1	1		
Ang-2	0.2982 [0.2149]	1	
Tie-2	0.3404 [0.1539]	-0.0965 [0.6943]	1

Thus, we adjusted \log_{10} Ang-1 for GA, by converting \log_{10} Ang-1 to \log_{10} Multiples of the Median (\log_{10} MoM Ang-1), as described in the statistical analysis section. Subsequently, we repeated the comparisons and the correlational analysis for the \log_{10} MoM Ang-1. We found that \log_{10} MoM Ang-1 was significantly reduced (unpaired *t* – test, *p* < 0.001) in the PE group (mean = -0.8181) compared to control group (mean = -0.0924). Additionally, \log_{10} MoM Ang-1 was significantly lower (unpaired *t*–test, *p* < 0.001) in the PE-IUGR group (mean = -1.2583) compared to control group (mean = -0.0924).

4. Discussion

Our findings demonstrate that in preeclamptic pregnancies, placental mRNA expression of Ang-1 was decreased, whereas there was an increase in the expression of Ang-2 and Tie-2. These alterations were more prominent in PE-IUGR subgroup (Table 3). Additionally, we detected a strong positive association between Ang-2 and Tie-2 in pregnancies that developed PE (Table 4). Specifically, higher levels of Ang-2 are related with increased expression of Tie-2 in preeclamptic women. Correlational analysis did not reveal the same trend in the normotensive group. Thus, PE and fetal growth restriction disrupt the relation between the examined angiogenic factors and their receptor. Furthermore, we found that Ang-1 was inversely related to GA. However, we demonstrated decreased Ang-1 expression in both PE and PE-IUGR group even after adjustment for GA at delivery.

Previous studies showed that angiopoietins mediate a number of endothelial and non-endothelial effects during placentation. In situ hybridization studies demonstrated that Ang-1 and Tie-2 are detected in the trophoblast bilayer of a first-trimester placenta, whereas Ang-2 mRNA is restricted to cytotrophoblast, indicating the pivotal role of these angiogenic factors in trophoblast invasion from the early stages of pregnancy [39]. In term placentas, Ang-1 mRNA expression is restricted to the perivascular tissues of the primary stem villi supporting its role in vessel maturation. Ang-2 is expressed throughout the term villous core and maintains the plasticity of placental vessels [14]. In addition, Tie-2 receptors are also expressed in trophoblasts and participate in the regulation of trophoblast behavior [14].

Few studies have examined the placental expression of angiopoietins in pregnancies complicated by PE with conflicting results and rather small samples (Table 1). Zhang et al. (2001) examined nine women with PE at 31 to 40 weeks of pregnancy and demonstrated lower levels of Ang-2 mRNA expression compared to the control group [17]. Geva et al. (2002) studied the levels of angiogenic factors throughout pregnancy and concluded that placental Ang-2 and Ang-1 mRNA expression was not altered in five cases of PE with IUGR in third trimester [16]. Sung et al. (2011) showed no marked changes in Ang-1 and Tie-2 mRNA levels in placental samples from nineteen preeclamptic subjects [22]. In addition, there was no significant change in total Ang-2 mRNA levels between preeclamptic and control samples; however, cytotrophoblasts in some focal areas in the basal plate and a few villi showed moderately increased Ang-2 expression in PE cases [22]. In a recent study, the expression of Ang-2 was significantly increased in placentas obtained from pregnancies with severe preeclampsia, according to the definition by the ACOG that we also used [21]. Ang-1 levels were not altered in the placentas from severe preeclamptic women and no significant association was observed between Ang-1 and Ang-2 in the whole study group. However, this study had a small study sample and the proportion of IUGR fetuses among the PE group was not reported. Similarly, we found an increase in the expression of Ang-2 in the PE and PE-IUGR group compared to the control group. Our data also show that Ang-2 expression was even

higher in the PE–IUGR group, suggesting a direct association of this angiogenic factor with the severity of the disease. Additionally, we detected decreased expression of Ang-1 in PE, a trend that was not found in the study by Han et al. Our analysis showed a weak association between Ang-1 and Ang-2 in the PE–IUGR group and no significant correlation was observed between these parameters in the control and the PE group, in accordance with the study by Han et al. [21]. Correlational analysis also revealed a positive association between Ang-2 and Tie-2 in the PE and PE–IUGR groups that is not evident in the control group. This observation needs further investigation as it shows that in preeclamptic pregnancies there is not only alteration in the expression levels of angiopoietins but there is also deregulation in the way that Ang-1 and Ang-2 are correlated to their common receptor.

Similar heterogeneity exists among studies that examined the maternal circulation levels of angiopoietins in preeclamptic pregnancies before or after the clinical manifestation of the disease (Table 1). In cases with established PE, the majority of studies report lower circulating concentrations of Ang-2 [23–25] and Tie-2 [23,27] compared to unaffected controls. However, a recent study demonstrated that circulating maternal Ang-2 concentrations were elevated at 16–20 weeks in women that developed PE [30]. These findings support the hypothesis that an excess of anti-angiogenic factors is related to PE. Moreover, authors stated that the levels of Ang-2 are associated with the severity of the disease. Similarly, we found higher placental expression of Ang-2 in PE complicated by IUGR, which is a distinct form of PE. In a recent longitudinal study, authors demonstrated upregulation of Ang-2 levels and decreased Ang-1 levels in maternal serum in the whole gestational frame and also, they showed that the Ang-1/Ang-2 ratio at 25 and 28 gestational weeks could have predictive value for women who later developed PE [29]. In first trimester, maternal serum concentration of Ang-2 has been reported to be either lower [26] or unaffected [28] in women who subsequently develop PE. There is also controversy in the literature about the maternal concentrations of Ang-1 and Tie-2 in preeclamptic pregnancies (Table 1).

Ang-2 was originally described as a naturally occurring disruptor of embryonic vascular development mediated by Tie-2 [9]. By contrast, Ang-1 promotes the structural integrity of blood vessels by recruiting pericytes to nascent blood vessels and preserving cell–cell contacts [40,41]. Ang-1 also plays an anti-inflammatory role by signaling the downregulation of surface-adhesion molecules [42]. Up-regulation of Ang-2 expression is also related to impaired oxygenation and Ang-2 has a causative role in disrupting the endothelial architecture by inducing endothelial inflammatory cell response [43,44]. Another possible mechanism of Ang-2 in disturbing the vascular maturation is mediated by its linkage to phosphorylated myosin light chain (MLC-p), which caused contraction in the microvascular endothelium and vascular leak [43,45].

Our findings describe the expression status of angiopoietins in placentas from preeclamptic pregnancies in a much larger sample size compared to previous studies with strictly defined subgroups. The design of our study does not allow us to define if the altered levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 represent a response to abnormal placentation or its cause. Also, these events may be a component of an adaptation to placental hypoxia that incorporates other angiogenic factors as well. Further studies are required to examine the potential value of angiopoietins as biomarkers for the prediction of PE. The regulation of these factors at the post-transcriptional level has been suggested by analog studies of maternal serum [16]. The association that we observe between the levels of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 and the distinct forms of PE may have clinical significance if replicated in maternal serum. Interestingly, earlier studies have

correlated the Ang-1/Ang-2 ratio and sFlt-1/Ang-2 ratio in maternal serum with development of PE [25,29].

Overall, our findings demonstrate lower placental expression of Ang-1 and increased expression of Ang-2 and Tie-2 in preeclamptic pregnancies. These changes are more significant in pregnancies further complicated with IUGR indicating a more severe angiogenic disruption in these cases. This study may provide additional insight into the disrupted balance between angiogenic and anti-angiogenic factors in PE. The case–control design of this study allows us to describe the observed alterations in the levels of angiopoietins in pathological pregnancies rather than elucidate the causation. Evidence provided from this study may serve as a stimulus for larger studies that will investigate the prognostic role of Ang-1 and Ang-2 in distinct forms of PE.

Conflict of interest

All authors report no conflict of interest.

References

- [1] Steegers EA, van Daelen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010;376:631–44.
- [2] Kleinrouweler CE, Wiegand MM, Ris-Stalpers C, Bossuyt PM, van der Post JA, van Daelen P, et al. EBM CONNECT Collaboration. Accuracy of circulating placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in the prediction of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2012;119:778–87.
- [3] Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, Kusanovic JP, Soto E, Lam J, et al. Maternal plasma concentrations of angiogenic/antiangiogenic factors in the third trimester of pregnancy to identify the patient at risk for stillbirth at or near term and severe late preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2013;208:287.e1–287.e15.
- [4] Gourvas V, Dalpa E, Konstantinidou A, Vrachnis N, Spandidos DA, Sifakis S. Angiogenic factors in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction (review). *Mol Med Rep* 2012;6:23–7.
- [5] Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol* 2011;31:33–46.
- [6] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242–8.
- [7] Seval Y, Sati I, Celik-Ozenci C, Taskin O, Demir R. The distribution of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and their receptors tie-1 and tie-2 in the very early human placenta. *Placenta* 2008;29:809–15.
- [8] Thurston G. Role of angiopoietins and tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:61–8.
- [9] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60.
- [10] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161–9.
- [11] Saharinen P, Kerkela K, Ekman N, Marron M, Brindle N, Lee GM, et al. Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie2 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *J Cell Biol* 2005;169:239–43.
- [12] Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998;282:468–71.
- [13] Witzensbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 1998;273:18514–21.
- [14] Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol* 2000;156:2185–99.
- [15] Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C, Lavy Y, Yagel S. Tie-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodelling. *Mol Hum Reprod* 2000;6:81–7.
- [16] Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, Moore DH, Byrne A, Jaffe RB. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4213–24.
- [17] Zhang EG, Smith SK, Baker PN, Charnock-Jones DS. The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae. *Mol Med* 2001;7:624–35.
- [18] Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171–80.

- [19] Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376:70–4.
- [20] Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 2002;3:411–23.
- [21] Han SY, Jun JK, Lee CH, Park JS, Syn HC. Angiopoietin-2: a promising indicator for the occurrence of severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2012;31:189–99.
- [22] Sung JF, Fan X, Dhal S, Dwyer BK, Jafari A, El-Sayed YY, et al. Decreased circulating soluble Tie2 levels in preeclampsia may result from inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1148–52.
- [23] Vuorela P, Matikainen MT, Kuusela P, Ylikorkala O, Aitalo K, Halmesmaki E. Endothelial tie receptor antigen in maternal and cord blood of healthy and preeclamptic subjects. *Obstet Gynecol* 1998;92:179–83.
- [24] Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, et al. Increase of serum angiopoietin-2 during pregnancy is suppressed in women with preeclampsia. *Am J Hypertens* 2005;18:1181–8.
- [25] Hirokoshi K, Maeshima Y, Kobayashi K, Matsuura E, Sugiyama H, Yamasaki Y, et al. Elevated serum sFlt-1/Ang-2 ratio in women with preeclampsia. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c43–50.
- [26] Wang Y, Tasevski V, Wallace EM, Gallery ED, Morris JM. Reduced maternal serum concentrations of angiopoietin-2 in the first trimester precede intrauterine growth restriction associated with placental insufficiency. *BJOG* 2007;114:1427–31.
- [27] Gotsch F, Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Dombrowski M, Erez O, et al. Preeclampsia and small-for-gestational age are associated with decreased concentrations of a factor involved in angiogenesis: soluble Tie-2. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:389–402.
- [28] Akolekar R, Casagrandi D, Slyfta E, Ahmed AA, Nicolaidis KH. Maternal serum angiopoietin-2 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Prenat Diagn* 2009;29:847–51.
- [29] Bolin M, Wiberg-Itzel E, Wikström AK, Goop M, Larsson A, Olovsson M, et al. Angiopoietin-1/angiopoietin-2 ratio for prediction of preeclampsia. *Am J Hypertens* 2009;22:891–5.
- [30] Leinonen E, Wathén KA, Alfthan H, Ylikorkala O, Andersson S, Stenman UH, et al. Maternal serum angiopoietin-1 and -2 and tie-2 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:126–33.
- [31] Kamal M, El-Khayat W. Do serum angiopoietin-1, angiopoietin-2, and their receptor Tie-2 and 4G/5G variant of PAI-1 gene have a role in the pathogenesis of preeclampsia? *J Investig Med* 2011;59:1147–50.
- [32] Salomon LJ, Alfrevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen SL, et al. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011;37:116–26.
- [33] Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurement— a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1985;151:333–7.
- [34] Souka AP, Papastefanou I, Pilaia A, Michalitsi V, Panagopoulos P, Kassanos D. Performance of the ultrasound examination in the early and late third trimester for the prediction of birth weight deviations. *Prenat Diagn* 2013;33:915–20.
- [35] ACOG Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 2002;99:159–67.
- [36] Androutsopoulos VP, Spandidos DA. The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and p53/p21 upregulation. *J Nutr Biochem* 2013;24:496–504.
- [37] Gourvas V, Sifakis S, Dalpa E, Soultzis N, Koukoura O, Spandidos DA. Reduced placental prolyl hydroxylase 3 mRNA expression in pregnancies affected by fetal growth restriction. *BJOG* 2010;117:1635–42.
- [38] Hou HA, Chou WC, Lin LI, Tang JL, Tseng MH, Huang CF, et al. Expression of angiopoietins and vascular endothelial growth factors and their clinical significance in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2008;32:904–12.
- [39] Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM. Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 2002;66:802–12.
- [40] van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat* 2002;200:549–60.
- [41] Wysolmerski RB, Lagunoff D. Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:16–20.
- [42] Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S, Shasby DM. Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol* 1993;265:606–12.
- [43] Parikh SM, Mamamoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA, et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med* 2006;3:e46.
- [44] Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006;12:235–9.
- [45] Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancialeone V, Cirino G, et al. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:7.

9. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Κάππου Δ**, Ανδρουτσόπουλος Β, Κωνσταντινίδου Α, Σπαντίδος Δ, Παπαντωνίου Ν, Σηφάκης Σ. Μελέτη της έκφρασης του αγγειογενετικού παράγοντα PlGF και του υποδοχέα του sFlt-1 σε πλακούντες κυήσεων με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Ιωάννινα, 2-4 Μαΐου 2014
- **Κάππου Δ**, Ανδρουτσόπουλος Β, Κωνσταντινίδου Α, Σπαντίδος Δ, Παπαντωνίου Ν, Σηφάκης Σ. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Ang-1, Ang-2 και του υποδοχέα τους TIE-2 σε πλακούντες κυήσεων με ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης. 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, Ιωάννινα, 2-4 Μαΐου 2014
- **Κάππου Δ**, Ανδρουτσόπουλος Β, Παπαντωνίου Ν, Κωνσταντινίδου Α, Κουτρουλάκης Δ, Σπαντίδος Δ, Σηφάκης Σ. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων Ang-1, Ang-2 και του υποδοχέα τους TIE-2 σε πλακούντες κυήσεων με προεκλαμψία. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής. Αθήνα 1-3 Νοεμβρίου 2013 [Προφορική ανακοίνωση]. **ΒΡΑΒΕΙΟ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗΣ**
- **Καρρου D**, Androutsopoulos V, Papantoniou N, Konstantinidou A, Koutroulakis D, Spandidos D.A, & Sifakis S. (2013, January). The expression of angiopoietins (Ang-1 & Ang-2) and their receptor TIE-1 in placentas from pregnancies complicated with preeclampsia. In INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (Vol. 32, pp. S83-S83).
- **Καρρου D**, Androutsopoulos V, Papantoniou N, Konstantinidou A, Koutroulakis D, Spandidos D.A, & Sifakis S. (2013, January). Placental expression of PlGF and sFlt-1 in pregnancies complicated with preeclampsia with or without fetal growth restriction. In INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (Vol. 32, pp. S83-S83).

- **Kappou D**, Papantoniou N, Androutsopoulos V, Konstantinidou A, Matalliotaki, C, Spandidos D. A,& Sifakis S. (2014, January). Placental mRNA expression of angiopoietin (Ang)-1 and Ang-2, and their receptor Tie-2 is altered in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. In INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE (Vol. 34, pp. S111-S111).