

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΟΥΤΣΑΚΗ ΜΑΡΙΑΣ

ΙΑΤΡΟΥ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΤΗΣ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ (hPGH),
ΤΟΥ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΕΙΔΟΥΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-ΕΝΑ (IGF-1)
ΚΑΙ ΤΩΝ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΑΥΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΝΑ (IGFBP-1)
ΚΑΙ ΤΡΙΑ (IGFBP-3) ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ
ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δημήτριος Σπαντίδος, Καθηγητής Ιολογίας Παν/μίου Κρήτης

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μακρυγιαννάκης Αντώνιος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Παν/μίου

Κρήτης Τσατσάνης Χρήστος, Επίκουρος Καθηγητής Κλινικής Χημείας Παν/μίου

Κρήτης

ΙΟΥΝΙΟΣ 2011

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	6
Συνοπτικό βιογραφικό σημείωμα	7
Δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις με βάση τα αποτελέσματα της διδασκαλικής διατριβής	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
Βιβλιογραφία	12
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° : ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗ ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ (hPGH)	13
1) Ιστορική ανασκόπηση - Ανακάλυψη της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH)	13
2) Το σύστημα γονιδίων αυξητικής ορμόνης - προλακτίνης	13
3) Το γονίδιο GH-V	15
4) Η συγκυτιοτροφοβλάστη ως τύπος παραγωγής hPGH	16
5) Αναγνώριση της hPGH ως το μεταγραφικό προϊόν του GH-V γονιδίου	16
6) Δομή hPGH μορίου	17
7) Ρυθμιστικοί μηχανισμοί σύνθεσης hPGH	18
7,1) Σε επίπεδο γονιδίου - γενετική έκφραση hPGH	19
α) Υποφυσιακή καταστολή GH-V	19
β) Διαφοροποίηση κυτταροτροφοβλάστης - Το αποτέλεσμα της συγκυτιοποίησης	19
γ) Μεταγραφικοί παράγοντες και GH-V	20
7,2) Ρύθμιση της hPGH σε επίπεδο κυκλοφορούσας στον ορό πρωτεΐνης σε φυσιολογικές κινήσεις	21
α) Επίδραση ποικίλων συγκεντρώσεων γλυκόζης - Διαπλακουντιακή μεταφορά γλυκόζης	21
β) Κοιλιακή παχυσαρκία - Αυξημένος Δείκτης Μάζας Σώματος	22

γ) Φυλετικός διμορφισμός hPGH	23
δ) Κάπνισμα μητέρας	23
ε) Πρόσδεση σε πρωτεΐνες του πλάσματος	24
8) Μοριακή κινητική – Βιολογικά χαρακτηριστικά hPGH μορίου	25
8,1) Χρόνος ημιζωής	26
8,2) Φυσιολογικές τιμές στον ορό	27
8,3) Επίδραση στο βάρος του πλακούντα	28
8,4) Επίδραση στο βάρος γέννησης	28
8,5) Σχέση hPGH και IGF-1 κατά την κύηση	29
9) Βιολογικές Ιδιότητες - Δράση hPGH	31
10) Βιβλιογραφία 1 ^ο Κεφαλαίου	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΕΙΔΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

ΕΝΑ (IGF-1) ΚΑΙ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΑΥΤΟΥ

ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΝΑ (IGFBP-1) ΚΑΙ ΤΡΙΑ (IGFBP-3)

1) Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας των IGFs	44
2) Συστατικά στοιχεία του IGF άξονα	45
3) Ρύθμιση γενετικής έκφρασης - παραγωγής IGF-1	45
3,1) Μεταβολική ρύθμιση	45
3,2) Ενδοκρινική ρύθμιση	46
3,3) Παρουσία IGFBPs	46
4) IGF-1 και πλακούντας - έκφραση και τοπική δράση	46
5) Ρόλος του IGF-1 στην εμβρυϊκή ανάπτυξη	47
5,1) Επίδραση IGF-1 στο μητρικό μεταβολισμό	48
5,2) Επίδραση IGF-1 στον εμβρυϊκό μεταβολισμό, IGF-1 δράση στον πλακούντα	48
6) Κυκλοφορούσες μορφές IGF-1 στον ορό - Ρόλος του 150 kDa μοριακού συμπλόκου	50
7) Δεσμευτικές του IGF-1 πρωτεΐνες ένα (IGFBP-1) και τρία (IGFBP-3)	51
7,1) Έκφραση IGFBP-1 και IGFBP-3 από τους εμβρυϊκούς ιστούς	51
7,2) Ρύθμιση παραγωγής IGFBP-1 και IGFBP-3	51
7,3) Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των IGFBP-1 και IGFBP-3 και η λειτουργική τους σημασία	52

7,4) IGFBPs και ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR)	52
7,5) Βιολογικές Ιδιότητες - Δράσεις IGFBP-1 και IGFBP-3	53
8) Βιβλιογραφία 2 ^{ου} Κεφαλαίου	54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

(IUGR)	60
1) Εισαγωγή	60
2) Ορισμός Ενδομήτριας Υπολειπόμενης Ανάπτυξης (IUGR) και Συναφείς έννοιες	60
3) Παράγοντες κινδύνου για χαμηλό βάρος κατά τη γέννηση	61
4) Καμπύλες Ενδομήτριας Ανάπτυξης - η σημασία της Εκατοστιαίας Θέσης (ΕΘ)	62
5) Κλινική ταξινόμηση IUGR	64
6) Διάγνωση IUGR - Υπολογισμός της Ηλικίας Κύησης (ΗΚ)	65
7) Συνέπειες υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης	65
7,1) Άμεσες συνέπειες	66
7,2) Απώτερες συνέπειες	67
8) Αίτια ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης	68
9) Βιβλιογραφία 3 ^{ου} Κεφαλαίου	69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ (PE)

1) Εισαγωγή	73
2) Ορισμός Προεκλαμψίας (PE)	74
3) Κλινική ταξινόμηση Προεκλαμψίας	74
4) Παράγοντες Κινδύνου για εκδήλωση PE	75
5) Συνέπειες Προεκλαμψίας	77
5,1) Για το έμβρυο	77
5,2) Για τη μητέρα	77
6) Αίτια - Παθογένεια PE	78
6,1) Κλινική προσέγγιση - πιθανά παθογενετικά πρότυπα	78

6,2) Παθογενετικός ρόλος του πλακούντα	79
7) Γονίδια και Προεκλαμψία	80
8) Βιβλιογραφία 4 ^ο Κεφαλαίου	81
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : Εισαγωγή	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : Σκοπός της μελέτης	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : Σχεδιασμός της μελέτης	85
3,1) Επιλογή υπό μελέτη πληθυσμών	85
3,2) Συλλογή υλικού	85
3,3) Διάγνωση ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης	86
3,4) Μοριακή επεξεργασία δειγμάτων	87
3,4,1) Εξαγωγή ολικού RNA από πλακουντιακό ιστό	87
3,4,2) Αντίστροφη μεταγραφή, εφαρμογή qRT-PCR	87
3,5) Στατιστική ανάλυση	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : Αποτελέσματα μελέτης	90
4,1) Δημογραφικά στοιχεία	90
4,2) Έκφραση στον πλακούντα	91
4,3) Ανάλυση συσχέτισης - Πρότυπα γονιδιακής συνέκφρασης	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : Συμπεράσματα, Συζήτηση	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο : Μελλοντικές προοπτικές	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο : Βιβλιογραφία Ειδικού Μέρους	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο : Δημοσιεύσεις, ανακοινώσεις, τιμητικές διακρίσεις με βάση τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής	103
1) Δημοσιεύσεις σε διεθνή peer-review ιατρικά περιοδικά	103
2) Ανακοινώσεις σε συνέδρια	110
3) Τιμητικές διακρίσεις	118

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ξεκίνησε το έτος 2007 και περατώθηκε το έτος 2011 στο Εργαστήριο Ιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ακολούθως υποβλήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης τον Ιούνιο του 2011. Η συλλογή των δειγμάτων που μελετήθηκαν έγινε από έγκυες γυναίκες που παρακολούθηθηκαν στη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης. Η μοριακή επεξεργασία των δειγμάτων και ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης, του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα και των δεσμευτικών αυτού πρωτεϊνών ένα και τρία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιστημονικά υπεύθυνο και επιβλέποντα καθηγητή της παρούσας διδακτορικής διατριβής, Καθηγητή κο Δημήτριο Σπαντίδο (Καθηγητή Ιολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης), καθώς και τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητές κο Μακρυγιαννάκη Αντώνιο (Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας) και κο Τσατσάνη Χρήστο (Επίκουρο Καθηγητή Κλινικής Χημείας), για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν και για την αμέριστη συμπαράστασή τους και επιστημονική καθοδήγηση στο σχεδιασμό, υλοποίηση και ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας.

Θα ήθελα ιδιαίτερος να ευχαριστήσω τον κο Σταύρο Σηφάκη, Επιμελητή Α' της Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ, για την πολύτιμη και καθοριστική συνεισφορά του στον επιστημονικό σχεδιασμό και επίβλεψη της μελέτης, στην επιλογή και παρακολούθηση των κυήσεων, καθώς και για την ανεκτίμητη βοήθειά του στην ανακοίνωση και συγγραφή των αποτελεσμάτων. Επίσης, θερμά ευχαριστώ τον κο Απόστολο Ζαραβίνο, μοριακό βιολόγο, για την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού σκέλους της διατριβής και για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Τους ιατρούς της Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής, ιδιαίτερα τον κο Δημήτριο Κουτρουλάκη, για τη συλλογή των δειγμάτων.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ το επιφυλάττω για την οικογένειά μου για την υποστήριξη της στις εύκολες και στις δύσκολες στιγμές αυτής της πορείας, κυρίως δε στη μητέρα μου, η οποία με δίδαξε ότι η επιστήμη έχει αξία μόνο όταν συνοδεύεται από αξιοπρέπεια και ηθική.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΤΗΣ ΙΑΤΡΟΥ ΜΑΡΙΑΣ ΚΟΥΤΣΑΚΗ

ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο
Όνομα πατρός
Όνομα μητρός
Ημερομηνία γέννησης
Τόπος γέννησης
Διεύθυνση μόνιμης κατοικίας

Τηλέφωνα επικοινωνίας:

Οικίας:

Κινητό:

Ηλεκτρονική διεύθυνση (e-mail):

Κουτσάκη Μαρία
Ιωάννης
Ουρανία
16 Μαΐου 1981
Ηράκλειο Κρήτης
Λεωφ. Κνωσσού 25, Τ.Κ. 71306,
Ηράκλειο Κρήτης

2810-223284

6944767425

marikout@yahoo.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

2^ο βάθμια εκπαίδευση

Ιούνιος 1999

Αποφοίτηση από Γενικό Λύκειο με βαθμό απολυτηρίου «Άριστα» (19 και 7/10)

3^ο βάθμια εκπαίδευση

Σεπτέμβριος 1999

Εισαγωγή στο Τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων του Τεχνικού Επαγγελματικού Ιδρύματος Λάρισας (με το σύστημα πανελληνίων εξετάσεων)

Σεπτέμβριος 2000

Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης (με το σύστημα πανελληνίων εξετάσεων, 4^η επιτυχούσα στη γενική κατάταξη της σχολής)

Αύγουστος 2006

Αποφοίτηση (2/8/2006) από Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, με βαθμό πτυχίου « λίαν καλώς, 7,33 »

<p>ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ</p> <p>Δεκέμβριος 2002</p> <p>9/8/2006 - 31/12/2006</p> <p>5/4/2007 - 21/8/2008</p> <p>17/7/2010 - 17/4/2011</p> <p>1/6/2007 - σήμερα</p>	<p>Σεμινάριο Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης και Βασικής Υποστήριξης της ζωής BLS (Basic Life Support, from the European Resuscitation Council)</p> <p>Ενασχόληση στο εργαστήριο Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Παν/μιου Κρήτης Παρακολούθηση – Εκπαίδευση σε :</p> <ul style="list-style-type: none"> • μοριακές τεχνικές (DNA extraction, PCR, τεχνικές ανοσοφθορισμού) • μεθόδους κυτταροκαλλιιεργιών <p>Ειδικότητα Παιδιατρικής στο Γενικό Νοσοκομείο Αγίου Νικολάου, νομός Λασιθίου Κρήτης.</p> <p>Υποχρεωτική Υπηρεσία Υπαίθρου ν.δ. 67/1968 στο ΓΝ-ΚΥ Νεάπολης, νομός Λασιθίου Κρήτης</p> <p>Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας με θέμα «Διερεύνηση της έκφρασης στον πλακούντα των γονιδίων της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH), του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα (IGF1) και των δεσμευτικών αυτού πρωτεϊνών ένα (IGFBP-1) και τρία (IGFBP-3) στην προεκλαμψία και την υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη.»</p>
<p>ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ</p> <p>Συμμετοχή σε 7 επιστημονικά συνέδρια (5 πανελλήνια και 2 παγκόσμια) με προφορική ή/και αναρτημένη παρουσίαση ελεύθερων ανακοινώσεων και ενδιαφερόντων περιστατικών.</p>	
<p>ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ PEER-REVIEW ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ</p> <p>“Decreased placental expression of hPGH, IGF-I and IGFBP-1 in pregnancies complicated by fetal growth restriction” Koutsaki et al, Growth Hormone & IGF Research 2011, vol 21, pages 31 - 36</p>	

<p>ΒΡΑΒΕΥΣΕΙΣ ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ</p> <p>11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής & Γυναικολογίας (28-31 Μαΐου 2009)</p>	<p>Η πρωτότυπη εργασία «Μελέτη της έκφρασης στον πλακούντα των γονιδίων της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH), του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα (IGF-1) και των δεσμευτικών του πρωτεϊνών 1(IGFBP-1) και 3 (IGFBP-3) σε κυήσεις με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη » επελέγη προς βράβευση, μεταξύ 500 ελεύθερων ανακοινώσεων από την Ελλάδα και το εξωτερικό, λαμβάνοντας το 2^ο βραβείο του συνεδρίου και αντίστοιχο χρηματικό έπαθλο 2000 ευρώ.</p>
<p>ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ</p> <p>Παρακολούθηση πανελληνίων, πανευρωπαϊκών και παγκόσμιων συνεδρίων (περίπου 50 συνολικά) και επιστημονικών εκδηλώσεων.</p>	
<p>ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ</p>	<p><u>ΑΓΓΛΙΚΑ</u> (επίπεδο: First Certificate in English, from the University of Cambridge, βαθμός διπλώματος “A”)</p> <p><u>ΓΑΛΛΙΚΑ</u> (επίπεδο: DELF 1st degre, ενότητες A1-A4 DELF 2nd degre, ενότητες A5-A6)</p> <p><u>English for Communication and Professional Purposes</u> (Προχωρημένα Ιατρικά Αγγλικά, κατ’ επιλογήν μάθημα Ιατρικής Σχολής Πανεπ/μιου Κρήτης)</p>
<p>ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ</p>	<p>Ανύπαντρη</p>

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1) ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Maria Koutsaki, Stavros Sifakis, Apostolos Zaravinos, Dimitrios Koutroulakis, Ourania Koukoura, Demetrios A. Spandidos, Decreased placental expression of hPGH, IGF-I and IGFBP-1 in pregnancies complicated by fetal growth restriction, GH and IGF Research 2011, vol 21, pp 31-36.

2) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 8th World Congress in Fetal Medicine, 28 June - 2 July 2009. Poster presentation : “Placental mRNA expression of human Placental Growth Hormone (hPGH), Insulin-like Growth Factor-1 (IgF-1) and IgF-binding proteins -1 and -3 in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction”. M koutsaki, A Zaravinos, S Sifakis, D Koutroulakis, DA Spandidos.
- 15th World Congress on Advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine. October 7-9, 2010. Poster presentation : “Decreased hPGH and IGF-1 expression levels in IUGR-associated placentas”. M koutsaki, A Zaravinos, S Sifakis, D Koutroulakis, DA Spandidos.

3) ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2009, Προφορική παρουσίαση με θέμα : “Μελέτη της έκφρασης στον πλακούντα των γονιδίων της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH), του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα-1 (IgF-1) και των δεσμευτικών του πρωτεϊνών 1 (IgFBP-1) και 3 (IgFBP-3) σε κύσεις με ενδομήτρια υπολειπομένη ανάπτυξη”, Μ. Κουτσάκη, Σ. Σηφάκης, Α. Ζαραβίνος, Δ. Κουτρουλάκης, Ο. Κούκουρα, Δ. Σπαντίδος

(ΒΡΑΒΕΙΟ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΚΑΛΥΤΕΡΗΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗΣ)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη αποτελεί σύνθετο βιολογικό φαινόμενο που υπόκειται σε αυστηρή χωρική και χρονική ρύθμιση. Κυρίαρχο ρόλο στη διαδικασία κατέχει η διαθεσιμότητα γλυκόζης, θρεπτικών ουσιών και δομικών μορίων στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, η οποία είναι άρρικτα συνδεδεμένη με την παρουσία-λειτουργία του πλακούντα. Ο τελευταίος αποτελεί τον ιστό που, αν και ανατομικά διαχωρίζει το μητρικό από το εμβρυϊκό διαμέρισμα, επιτρέπει την στενή μεταξύ τους λειτουργική αλληλεξάρτηση. Ο αμφίδρομος χαρακτήρας και το μέγεθος της δυναμικότητας της σχέσης αυτής αναδεικνύεται από την επιστημονικά πλέον τεκμηριωμένη θετική συσχέτιση - συνμεταβολή της πλακουντιακής μάζας και του βάρους του εμβρύου καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (1). Κατ' αρχάς, στον πλακούντα πραγματοποιείται η ζωτικής σημασίας ανταλλαγή αερίων, γλυκόζης και θρεπτικών ουσιών (2,3). Παράλληλα, ο πλακούντας επιδεικνύει έντονη παραγωγική δραστηριότητα, εκκρίνοντας ποικιλία νευροενδοκρινικών πεπτιδίων, στεροειδών ορμονών και σηματοδοτικών μορίων (4), ενώ διαθέτει και ανοσορυθμιστικές ικανότητες (5).

Κατά τους τρεις πρώτους μήνες της κύησης οι χοριακές λάχνες πολλαπλασιάζονται ταχέως, προσφέροντας έτσι μια εκτεταμένη επιφάνεια επαφής με το μητρικό αίμα, προς ανταλλαγή αερίων, παροχή θρεπτικών ουσιών και δομικών μορίων μεταξύ της μητρικής και εμβρυϊκής κυκλοφορίας. Στις απολήξεις κάθε χοριακής λάχνης εντοπίζεται μια κυτταρική στοιβάδα γνωστή με το όνομα κυτταροτροφοβλάστη. Τα μονοπύρρηνα αυτά κύτταρα έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης σε κυτταρικά συγκύτια τα οποία καλύπτουν την κορυφαία επιφάνεια των ελεύθερων χοριακών λαχνών (floating villi), σχηματίζοντας τη στοιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης (6). Η συγκυτιοτροφοβλάστη έρχεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα που φτάνει στα μεσολάχνια διαστήματα μέσω των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας. Η διαδικασία αυτή της διαφοροποίησης της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη έχει περιγραφεί και *in vitro*, σε καλλιέργειες κυτταροβλαστών (7-9). Η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελεί την βασική ανατομική-λειτουργική-εκκριτική μονάδα του πλακούντα.

Η ανάπτυξη του πλακούντα ρυθμίζεται εξίσου από γενετικούς και επιγενετικούς μηχανισμούς. Αν και στα πρώιμα στάδια της κύησης καθοριστική είναι η επάρκεια ορμονών στο ενδομήτριο προκειμένου να εμφυτευθεί επιτυχώς η βλαστοκύστη, η επακόλουθη ανάπτυξη και διατήρηση του πλακούντα εξαρτάται κυρίως από την επαρκή παρουσία αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, πεπτίδια που παράγονται τοπικά και δρουν μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών. Από την πληθώρα των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται, κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να κατέχει ο ορμονικός άξονας της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (human Placental

Growth Hormone, hPGH) και του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1) (10). Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα γλυκόζης και θρεπτικών ουσιών στο αναπτυσσόμενο έμβryo και ουσιαστικά προσαρμόζουν το μεταβολισμό της μητέρας στην κύηση (11,12).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Sands J, Dobbing J. Continuing growth and development of the third trimester human placenta. *Placenta* 1985;6:13-22
- 2) H. Bartels. Placental gas exchange. *Proc R Soc Med.* 1966 June; 59(6): 503-508
- 3) W Hay William, Jr. Placental Transport of Nutrients to the Fetus. *Hormone Research* 1994; Vol 42: 215-222
- 4) Simpson, E.R., MacDonald, P.C., 1981. Endocrine physiology of the placenta. *Annu. Rev. Physiol.* 43, 163–188
- 5) Loke, Y.W., King, A., 1995. Trophoblast expression of major histocompatibility complex class I antigens. In: Loke, Y.W., King, A. (Eds.), *Human Implantation Cell Biology and Immunology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 82-101
- 6) Benirschke, K., Kaufmann, P., 1990. *Pathology of the Human Placenta*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, pp. 499–529
- 7) Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 1986;118:1567-82
- 8) Alsat E, Mirlesse V, Fondacci C, Dodeur M, Evain-Brion D. Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:288-95
- 9) Alsat E, Haziza J, Evain-Brion D. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with the differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol* 1993;154:122-8
- 10) P. Cohen, R.G. Rosenfeld, Growth disorders. in: M. Sperling (Ed.), *Textbook of Pediatric Endocrinology*, second ed., 2002
- 11) E. Alsat, J. Guibourdenche, A. Couturier, D. Evain-Brion. Physiological role of human placental growth hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998;140:121-127

12) Ruvdeep Randhawa, Pinchaw Cohen. The role of insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Molecular Genetics and Metabolism* 2005;86:84-90

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° : ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗ ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ (hPGH)

1) Ιστορική ανασκόπηση - Ανακάλυψη της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH)

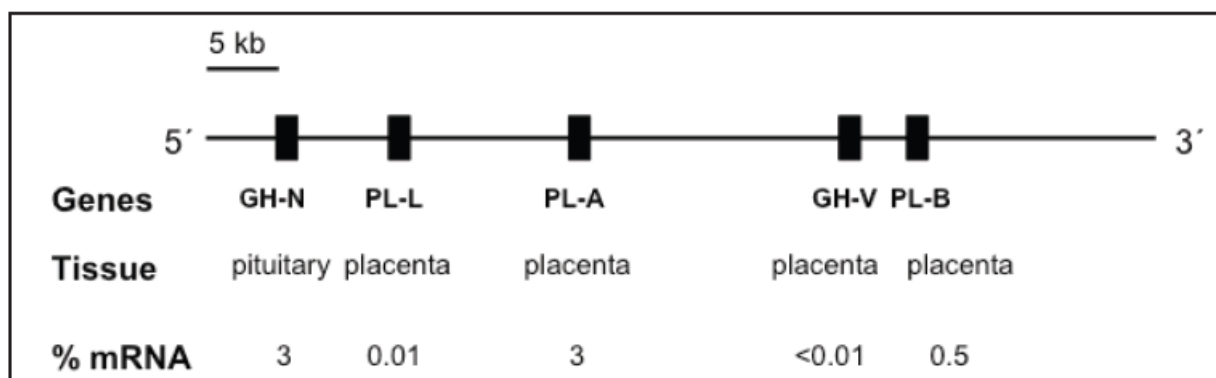
Η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη (human Placental Growth Hormone, χάριν συντομίας hPGH αρχής εφ'εξής στο παρόν σύγγραμμα) αποτελεί το προϊόν έκφρασης του GH-V γονιδίου στον ανθρώπινο πλακούντα, το οποίο έχει περιγραφεί και χαρακτηριστεί την τελευταία εικοσαετία (1,2). Στον άνθρωπο περιγράφηκε για πρώτη φορά ως ανεξάρτητο βιολογικά πρωτεϊνικό μόριο το 1985 (3,4). Οι Hennen και συνεργάτες παρατήρησαν σε ορό από αίμα εγκύων γυναικών την παρουσία ενός πεπτιδίου κατά το δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης, το οποίο παρουσίαζε ανοσοδραστικότητα έναντι μονοκλωνικών αντισωμάτων για την υποφυσιακή αυξητική ορμόνη. Η πρωτεΐνη αυτή που αρχικά ονομάστηκε “πεπτίδιο ομοιάζον τη δράση της αυξητικής ορμόνης” (GH-like peptide) παρατηρήθηκε ότι διέθετε υψηλές συγκεντρώσεις σε εκχυλίσματα από πλακουντιακό ιστό σε σύγκριση με τη συγκέντρωσή της στο περιφερικό αίμα (4). Η μέχρι τότε τυποποίηση του γονιδίου της αυξητικής ορμόνης άφηνε αρκετά “μεταγραφικά κενά ” για πιθανή ύπαρξη και άλλων ισομορφών ορμονικών πεπτιδίων της οικογένειας των αυξητικών ορμονών (5). Οι ερευνητές υπέθεσαν-συμπέραναν την ιστική παραγωγή (από τον πλακούντα) ενός τέτοιου είδους πεπτιδίου, με βιολογική δράση παρόμοια με αυτή του υποφυσιακού αναλόγου. Το πεπτίδιο αυτό ονομάστηκε αυξητική ορμόνη του πλακούντα ή (όπως έχει επικρατήσει στην ευρύτερη ιατρική ορολογία) “πλακουντιακή αυξητική ορμόνη” (3).

2) Το σύστημα γονιδίων αυξητικής ορμόνης - προλακτίνης

Η hPGH αποτελεί μέλος μιας υπεροικογένειας πρωτεϊνών, του συστήματος αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone, GH) – προλακτίνης (Prolactin, PRL). Η ετερόκλητη αυτή οικογένεια πρωτεϊνών περιλαμβάνει αυξητικούς παράγοντες και στεροειδείς ορμόνες με κοινά δομικά - και εν μέρει λειτουργικά - χαρακτηριστικά. Αν και τα γονίδια που τις κωδικοποιούν ανήκουν σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους στο ανθρώπινο γονιδίωμα (τα γονίδια της αυξητικής ορμόνης και

των ισομορφών της στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 ενώ τα γονίδια για την προλακτίνη στο χρωμόσωμα 6), οι έντονες δομικές αναλογίες που παρουσιάζουν αυτές οι πρωτεΐνες μεταξύ τους, καθιστούν πιθανή την προέλευση των γονιδίων τους από κοινό προδρομικό γόνιο (6,7).

Η οικογένεια γονιδίων που κωδικοποιεί πεπτιδικές ορμόνες με μιτωγόνο-αναβολική δράση, γνωστή με την ονομασία «οικογένεια γονιδίων της αυξητικής ορμόνης», στο ανθρώπινο γονιδίωμα εντοπίζεται σε μια περιοχή 66 kb που εδράζει στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (q22-q24) (8-11). Απαρτίζεται από 5 γόνους, καθένας μεγέθους περίπου 1,5 kb, με παρόμοιο πρότυπο οργάνωσης (κάθε γόνος αποτελείται από 5 εξόνια και 4 ιντρόνια) (12), επιδεικνύοντας εννιαίο μεταγραφικό προσανατολισμό και υψηλή ομολογία βάσεων (91%-99% συντηρημένες γενετικά αλληλουχίες) (13,14), γεγονός που οδηγεί στην πιθανή θεωρία το συγκεκριμένο γενετικό locus να εξελίχθηκε από πρόδρομα αρχέγονα γονίδια με γονιδιακό αναδιπλασιασμό. Τρία από τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για κάθε μια από τις ισομορφές του πλακουντιακού γαλακτογόνου hPL (human Placental Lactogen, hPL εφ'εξής στο παρόν σύγγραμμα), PL-A, PL-B και PL-L. Οι εναπομείναντες δυο γόνιοι κωδικοποιούν τις δυο βασικές ισομορφές αυξητικής ορμόνης, την υποφυσιική GH (προϊόν μεταγραφής του GH-N γόνου) και την πλακουντιακή GH, hPGH (προϊόν μεταγραφής του GH-V γόνου). Η σειρά των γονιδίων με κατεύθυνση 5'→3' και των αντιστοίχων προϊόντων φαίνεται στο σχήμα 1. Ο GH-N γόνος εκφράζεται αποκλειστικά στην υπόφυση, ενώ τα GH-V και PL γονίδια αποκλειστικά στον πλακούντα (15-17).



Σχήμα 1. Το σύστημα γονιδίων αυξητικής ορμόνης – προλακτίνης

Επιδεικνύεται η σειρά των γονιδίων σε 5'προς 3' μεταγραφικό προσανατολισμό, η εξειδικευμένη ιστική έκφραση και το ποσοστό παραγόμενου mRNA που αντιστοιχεί σε κάθε γονίδιο μέσα στο γενετικό τόπο. Όπως προκύπτει από τα ποσοστά mRNA ανά γονίδιο, τα PL γονίδια καταλαμβάνουν τον κύριο όγκο μεταγραφικού προϊόντος μέσα στο locus. Από τη δημοσίευση του Stuart Handwerger 2009 “The growth hormone gene cluster: Physiological actions and regulation during pregnancy, *Growth, Genetics & Hormones*, June 2009, vol 25(1), pgs 1-8”

Κάθε ένα από τα γονίδια του συστήματος αυξητικής ορμόνης – προλακτίνης κωδικοποιεί ένα ώριμο πεπτίδιο περίπου 200 καταλοίπων αμινοξέων, του οποίου προηγείται οδηγό πεπτίδιο 25 καταλοίπων αμινοξέων. Τρία από τα πέντε γονίδια (PL-A, PL-B, PL-L, GH-V) εκφράζονται στον πλακούντα (18) ενώ μόνο το γονίδιο της GH-N εκφράζεται στην υπόφυση (19). Η καταστολή της έκφρασης του GH-V γονιδίου στα σωματοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης οφείλεται σε ανασταλτική επίδραση ορισμένων πρωτεϊνών του πυρήνα, κυρίως του NF-1 (Nuclear Factor 1) (20).

3) Το γονίδιο GH-V

Το γονίδιο GH-V εκφράζεται αποκλειστικά στον πλακούντα (21,22). Έχει βρεθεί ότι η αύξηση του μεγέθους του πλακούντα με την πρόοδο της κύησης συμβαδίζει με αντίστοιχη αύξηση των τιμών της hPGH στο αίμα της εγκύου (23), παρατήρηση ενδεικτική της πλακουντιακής προέλευσης της hPGH. Αν και η έκφραση του GH-N στην υπόφυση χρειάζεται την παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα Pit-1, κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να ισχύει για την hPGH, παρ' όλο που η συγκυτιοτροφοβλάστη εκφράζει Pit-1 υποδοχείς (24). Φαίνεται ότι έκφραση του mRNA του GH-V γόνου είναι δυνατή και απουσία του Pit-1 (25), ενώ σε ασθενή με Pit-1 ανεπάρκεια τα επίπεδα της hPGH αυξάνονταν φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (26). Αντίθετα, το GH-N γονίδιο δεν φαίνεται να εκφράζεται στον πλακούντα (27-29).

Το GH-V γονίδιο παράγει ένα πρωτογενές mRNA 800 βάσεων, το οποίο κωδικοποιεί μια ώριμη πρωτεΐνη 22 kDa την GH-V1, η οποία μετονομάστηκε σε πλακουντιακή αυξητική ορμόνη (hPGH) (30). Πρώτη ένδειξη για έκφραση πρωτεΐνης από το γονίδιο GH-V δόθηκε in vitro σε καλλιέργεια κυττάρων πιθήκου (31,32). Η έκφρασή του στον άνθρωπο ανακαλύφθηκε λίγο αργότερα, με in situ υβριδισμό. Οι Frankenne και συνεργάτες το 1987 κατάφεραν να απομονώσουν ένα πεπτίδιο από εκχυλίσματα πλακουντιακού ιστού, με βιολογική δράση παρόμοια με αυτή της υποφυσιακής αυξητικής ορμόνης και να το κλωνοποιήσουν σε επίπεδο cDNA (33). Το προκύπτουν cDNA μόριο συμφωνούσε απόλυτα με την υποτιθέμενη/ μαθηματικά προκύπτουσα αλληλουχία βάσεων της πρωτεΐνης – προϊόντος του GH-V γονιδίου. Οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι το πρωτογενές mRNA του *GH-V* υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ώριμης πρωτεΐνης 191 καταλοίπων αμινοξέων.

Από τη σύνθεση της cDNA βιβλιοθήκης του *GH-V* προκύπτει ένα δεύτερο μόριο cDNA, ενδεικτικό – προβλεπτικό της παρουσίας ενός δεύτερου GH-V γονιδίου (22,34), το οποίο ονομάστηκε *GH-V2*. Το παραχθέν mRNA αυτού, αντιστοιχεί περίπου στο 30% του ολικού mRNA

που απομονώθηκε από το GH-V γονίδιο (34) και είναι μεγαλύτερο σε μέγεθος (1250 κατάλοιπα νουκλεοτιδίων αντί για 800). Θεωρείται προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του *GH-V* και συγκεκριμένα αποτέλεσμα της ανάγνωσης του 4^{ου} ιντρονίου με συνέπεια μεταφραστική ενσωμάτωση 104 επιπλέον καταλοίπων αμινοξέων και διαφορετική στερεοχημεία των δισουλφιδικών του δεσμών. Το πεπτίδιο μεγέθους 26 kDa ονομάστηκε GH-V2. Η GH-V2 έχει διαφορετική στερεοχημική διαμόρφωση σε σχέση με την GH-V1 πρωτεΐνη. Ο προσανατολισμών των δισουλφιδικών της δεσμών προδιαθέτει στην ύπαρξη υδρόφοβου τμήματος εντός του μορίου της. Πιστεύεται ότι το πεπτίδιο GH-V2 αποτελεί στοιχείο της κυτταρικής μεμβράνης και συγκεκριμένα εσωτερική πρωτεΐνη-διάλυτο (22). Η ύπαρξη του GH-V2 πεπτιδίου έχει διαπιστωθεί σε *in vitro* κυτταροκαλλιέργειες και σε ζωικά μοντέλα, χωρίς ωστόσο να έχει μέχρι στιγμής επαληθευτεί η παρουσία του σε ανθρώπινα πλακουντιακά κύτταρα.

4) Η συγκυτιοτροφοβλάστη ως τόπος παραγωγής hPGH

Η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη hPGH, σαν πρωτεϊνικό μόριο, έχει απομονωθεί μέχρι στιγμής μόνο από εκχυλίσματα χοριακών λαχνών του πλακούντα. *In situ* υβριδισμός και τεχνικές ανοσοϊστοχημείας κατέδειξαν τη στοιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης ως τόπο παραγωγής hPGH μέσα στον πλακούντα (27,35). Μάλιστα διαπιστώθηκε ένα πρότυπο χωρικής – διαλείπουσας τμηματικής κατανομής των κυττάρων που παράγουν hPGH (*intermittent staining*), σε αντίθεση με το πλακουντιακό γαλακτογόνο hPL το οποίο παράγεται διαχύτως από όλα τα κυτταρικά στοιχεία της συγκυτιοτροφοβλάστης (27,28,35). Νεότερα δεδομένα αναφέρουν πιθανά την παραγωγή hPGH και από εξωλάχνιους τροφοβλάστες, κάτι τέτοιο όμως μένει να διαπιστωθεί και σε *in vivo* μελέτες (28,36).

5) Αναγνώριση της hPGH ως το μεταγραφικό προϊόν του GH-V γονιδίου

Η ανακάλυψη του GH-V γονιδίου το 1987 στην οικογένεια των γονιδίων της αυξητικής ορμόνης έφερε τους επιστήμονες αντιμέτωπους με ένα “μεταγραφικό κενό”, αναφορικά με την παραγωγή ή μη πεπτιδίου από το γονίδιο αυτό. Η πρώτη υποψία είχε ήδη δοθεί το 1965 από τους Friesen και συνεργάτες (37), οι οποίοι ανέφεραν την παρουσία στον ορό εγκύων μιας άγνωστης μέχρι τότε πρωτεΐνης με μεγάλη δομική ομοιότητα και λειτουργική αναλογία με την υποφυσιακή αυξητική ορμόνη, η οποία δεν ανιχνευόταν σε μη-έγκυες. Απέδωσαν την παραγωγή της στον πλακούντα και την ονόμασαν συμβατικά, “πλακουντιακός παράγων ομοιάζων τη δράση της

αυξητικής ορμόνης”. Το 1985 οι Hennen και συνεργάτες, εφαρμόζοντας τεχνική RIA και χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά είδη μονοκλωνικών anti-hGH αντισωμάτων, καθένα από τα οποία αναγνώριζε ανοσολογικά ξεχωριστό επίτοπο (4), προσπάθησαν να προσδιορίσουν τις ισομορφές αυξητικής ορμόνης GH κατά την κύηση. Το ένα αντίσωμα (Mab 5B4) αναγνώριζε ως επίτοπο το καρβοξυτελικό άκρο της υποφυσιακής GH και το άλλο (Mab K24) ένα εσωτερικό επίτοπό της. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι το 5B4 αντιδρούσε παράλληλα και με ένα άλλο πεπτίδιο, το οποίο δεν αντιδρούσε με το αντίσωμα K24. Μια άλλη σημαντική παρατήρηση ήταν ότι στα άνωθεν πειράματα, η υποφυσιακή GH πρακτικά εξαφανιζόταν στα μέσα της κύησης από τον ορό των εγκύων, με ταυτόχρονη εμφάνιση του - άγνωστου μέχρι τότε - άνωθεν πεπτιδίου, με δομική διαφορά από την υποφυσιακή GH τουλάχιστον ενός επιτόπου (3,38). Επεκτείνοντας την έρευνά τους, οι μελετητές βρήκαν ότι η πρωτεΐνη αυτή παρουσίαζε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε εκχυλίσματα πλακουντιακού ιστού, από ότι στον ορό των εγκύων. Μετέπειτα μελέτες ανοσοϊστοχημείας (28) ανέδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή παράγεται από την συγκυτιοτροφοβλάστη. Συλλογή κεκαθαμένου πεπτιδίου από εκχυλίσματα πλακούντα (39) επέτρεψε το δομικό χαρακτηρισμό της. Η αμινοξική της αλληλουχία, το μέγεθός της (μικρότερο κατά 13 αμινοξέα) και η παρουσία σημείων γλυκοζυλίωσης ταίριαζαν απόλυτα με το προβλεπόμενο μοντέλο πρωτεΐνης - προϊόν του GH-V γόνου. Ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του N-τελικού της άκρου (40) ήρθε να τεκμηριώσει το γεγονός ότι η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη hPGH όντως αποτελούσε το μεταγραφικό προϊόν του GH-V γονιδίου στον άνθρωπο. Παράγοντας ανασυνδυασμένη hPGH, το εργαστήριο των Hennen προχώρησε στη δημιουργία ενός μονοκλωνικού αντισώματος με υψηλή εξειδίκευση για την hPGH, το οποίο δεν αντιδρά με άλλες μορφές αυξητικής ορμόνης συμπεριλαμβανομένης και της υποφυσιακής (41,42). Το αντίσωμα αυτό, που δεν αντιδρά με τον επίτοπο 5B4 της υποφυσιακής GH, ονομάστηκε E8 και είναι εμπορικά διαθέσιμο (IRMA, Biocode SA, Lieges, Belgium) για μετρήσεις hPGH στον ορό (42,43).

6) Δομή hPGH μορίου

Η hPGH έχει περισσότερο βασικό ισοηλεκτρικό σημείο από ότι το υποφυσιακό ανάλογό της ($pI=8,8$ για την hPGH και $pI=5,5$ για την υποφυσιακή GH) (44). Πρόκειται για πρωτεΐνη, η αμινοξική αλληλουχία της οποίας περιλαμβάνει 191 κατάλοιπα αμινοξέων και ένα σημείο N-γλυκοζυλίωσης στη θέση Asn¹⁴⁰ (Ασπαραγίνη 140) (22). Από άποψη αμινοξικής αλληλουχίας διαφέρει από την υποφυσιακή GH σε 15 κωδικόνια αμινοξέων, 13 από τα οποία μεταφράζονται και τελικά ενσωματώνονται στο ώριμο hPGH πεπτίδιο (5,9,23). Επιπλέον διαφορές αναγνωρίζονται στα οδηγά πεπτίδια κάθε πρωτεΐνης (5). Δυο ισομορφές της hPGH έχουν αναγνωρισθεί, μια μη-

γλυκοζυλιωμένη (22 kDa) και μια γλυκοζυλιωμένη μορφή (25 kDa) (45). Η λειτουργική διαφορά μεταξύ τους παραμένει άγνωστη. Ως μεταγραφικό προϊόν του GH-V γονιδίου, η hPGH αποτελεί το βασικό πεπτίδιο.

Η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη hPGH παράγεται αποκλειστικά από τον πλακούντα. Συγκεκριμένα, την περιοχή έκφρασης της hPGH στον πλακουντιακό ιστό αποτελεί η στοιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης (27,35). Η στοιβάδα αυτή, εντοπίζεται στην επιφάνεια των χοριακών λαχνών και αντιστοιχεί στην περιοχή πρόσληψης θρεπτικών ουσιών και ανταλλαγής αερίων μεταξύ εμβρυϊκής και μητρικής κυκλοφορίας. Ταυτόχρονα, θεωρείται ως η βασική ενδοκρινική μονάδα του πλακούντα, όπου γίνεται σύνθεση στεροειδών ορμονών και προγεστερόνης, ουσίες απαραίτητες για τη διατήρηση της κύησης. Εκτός από την πλακουντιακή αυξητική ορμόνη hPGH, από τη συγκυτιοτροφοβλάστη παράγεται ποικιλία πεπτιδικών ορμονών, όπως η χοριακή γοναδοτροπίνη hCG και το πλακουντιακό γαλακτογόνο hPL. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση των γονιδίων hPGH και hPL είναι στενά συνδεδεμένη με τη διαφοροποίηση των κυττάρων της στοιβάδας αυτής. Πιο συγκεκριμένα, hPGH και hPL αρχίζουν να παράγονται κατά τη φάση της συγκυτιοποίησης και διαφοροποίησης της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη, και όχι από αυτά καθ'εαυτά τροφοβλαστικά κύτταρα. Πειράματα έδειξαν ότι η έκφραση των άνωθεν γονιδίων ευοδώνεται όταν τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης αποκτήσουν ένα διεισδυτικό φαινότυπο (46).

7) Ρυθμιστικοί μηχανισμοί σύνθεσης hPGH

Αν και η έκκριση της υποφυσιακής GH είναι παλμική, η ορμόνη δηλαδή απελευθερώνεται κατά ώσεις μέσα σε ένα 24ωρο, κάτι τέτοιο δεν ισχύει και για την πλακουντιακή GH. Η παραγωγή hPGH είναι τονική, δηλαδή παρουσιάζει σταθερό ρυθμό έκκρισης μέσα σε ένα 24ωρο. Η τονικότητα στην έκκρισή της κρίνεται απαραίτητη δεδομένου ότι έτσι παρέχεται ένα σταθερό ορμονικό περιβάλλον για τη βέλτιστη ανάπτυξη του εμβρύου.

Η ρύθμιση της παραγωγής hPGH είναι πολυπαραγοντική. Υπάρχει πλήθος ερωτημάτων που μένουν ακόμη να διευκρινισθούν σχετικά με το μοριακό μικροπεριβάλλον που επηρεάζει τη σύνθεση και απελευθέρωση της ορμόνης από τα πλακουντιακά κύτταρα. Ωστόσο, έχουν απομονωθεί και περιγραφεί συγκεκριμένα ερεθίσματα τα οποία φαίνεται να επιδρούν ευοδώνοντας ή αναστέλλοντας τη σύνθεση ή/και τη δράση της hPGH. Οι παράγοντες αυτοί επιδρούν ρυθμιστικά τόσο σε επίπεδο γονιδιώματος, τροποποιώντας την έκφραση του GH-V γονιδίου, όσο και στο επίπεδο της κυκλοφορούσας στον ορό hPGH πρωτεΐνης, αυξάνοντας ή περιορίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητά της στους ιστούς-στόχους.

7,1) Σε επίπεδο γονιδίου - γενετική έκφραση hPGH

α) Υποφυσιακή καταστολή *GH-V*

Αν και οι γνώσεις μας γύρω από τους μηχανισμούς που διέπουν την έκφραση των γονιδίων της οικογένειας των αυξητικών ορμονών είναι περιορισμένες, η “ιστική εξειδίκευση” (tissue-specific) που αυτά επιδεικνύουν αποτελεί αδιαμφισβήτητο γεγονός. Η hPGH εκφράζεται αποκλειστικά στον πλακούντα. Φαίνεται ότι υπάρχουν παράγοντες που καταστέλλουν την έκφραση του GH-V γόνου στα σωματοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, ευοδώνοντας έτσι μόνο την έκφραση του GH-N γονιδίου από το GH gene locus (20,47). Παράλληλα, ο μεταγραφικός παράγων Pit-1, ο οποίος θεωρείται απαραίτητος για την έκφραση της υποφυσιακής GH, φαίνεται να μην επηρεάζει την παραγωγή hPGH και την έκφραση του *GH-V*. Η συγκυτιοτροφοβλάτη εκφράζει τον Pit-1 (24). Πειράματα έδειξαν ότι ο GH-V γόνος εκφράζεται και απουσία Pit-1 (25), ενώ σε μια ασθενή με Pit-1 ανεπάρκεια τα επίπεδα hPGH ανέβαιναν κανονικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (26).

β) Διαφοροποίηση κυτταροτροφοβλάστης - Το αποτέλεσμα τη συγκυτιοποίησης

Οι *in vivo* μελέτες της συμπεριφοράς - έκφρασης του GH-V γονιδίου είναι περιορισμένες. Το μεγαλύτερο εύρος της υπάρχουσας γνώσης προέρχεται από *in vitro* μελέτες. Αυτές αφορούν καλλιέργειες ανθρώπινων κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων ή κυττάρων από πλακουντιακά εκχυλίσματα, υλικό που λαμβάνεται από τελειόμηνο ή προ-τελειόμηνο πλακούντα με τη γέννηση. Έπειτα από ενζυμικό καθαρισμό και κατάλληλη προετοιμασία, γίνεται η συλλογή των πρωτογενών κυτταροβλαστών και η καλλιέργειά τους στα κατάλληλα θρεπτικά μέσα. Κρίσιμο στάδιο για τη βιωσιμότητα των κυτταροβλαστών αποτελεί η διαφοροποίησή τους σε συγκυτιοτροφοβλάστη. Πρόκειται για διαδικασία “αυθόρμητης” συγκυτιοποίησης/ συνένωσης των κυτταροβλαστών σε μια εννιαία στοιβάδα, την συγκυτιοτροφοβλάστη, με ταυτόχρονη μορφολογική διαφοροποίηση - ωρίμανση των προσεκβολών και των τελικών κυτταρικών τους απολήξεων.

Έχει βρεθεί ότι η hPGH ξεκινάει να παράγεται στο υλικό της κυτταροκαλλιέργειας έπειτα από τη φάση της διαφοροποίησης/ συγκυτιοποίησης, δηλαδή στη φάση της συγκυτιοτροφοβλάστης και όχι νωρίτερα. Εφαρμόζοντας ποσοτική real-time PCR σε κυτταρικά συγκύτια οι Tarrade και συνεργάτες απέδειξαν ότι αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του GH-V γονιδίου συμβαδίζει με τη διαδικασία διαφοροποίησης *in vitro* των τροφοβλαστών (48). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι διάφορα σηματοδοτικά μόρια, που επάγουν τη διαφοροποίηση και το σχηματισμό της συγκυτιοτροφοβλάστης, ευοδώνουν και την έκφραση του γονιδίου της hPGH. Αυτοί οι παράγοντες

περιλαμβάνουν τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (49), την χοριακή γοναδοτροπίνη (50), τον ανασταλτικό παράγοντα της λευχαιμίας (LIF) (51), τον διεγείρων τις κυτταρικές αποικίες παράγων-1 (CSF-1) (52), το κυκλικό cAMP (53), τον TGF- β (54), το μονοπάτι Wnt/ β -catenin (55-57), καθώς και αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο PPAR ligand (58), ο παράγων Ikaros (59) και ο GATA-2/3 (60). Συνεπώς, η παρουσία και η άνοδος των επιπέδων της hPGH φαίνεται να αποτελεί αξιόλογο δείκτη του επιτυχούς σχηματισμού της συγκυτιοτροφοβλάστης (62).

Κρίσιμος παράγοντας για την τροφοβλαστική διαφοροποίηση και την επαγωγή του *GH-V* θεωρείται η επάρκεια οξυγόνου (61). Χαμηλή συγκέντρωση O_2 κατευθύνει τη διαφοροποίηση των πλακουντιακών κυττάρων προς το σχηματισμό εξωλάχνιας τροφοβλάστης, όπου τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα διεισδύουν στο τοίχωμα της μήτρας. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις O_2 φαίνεται να επικρατεί η διαφοροποίηση των κυττάρων προς σχηματισμό λαχνωτής τροφοβλάστης, οι προσεκβολές της οποίας καλύπτουν την εξωτερική επιφάνεια των χοριακών πλακουντιακών λαχνών.

Προσθήκη 0,1 mM 8-βρωμο-κυκλικού cAMP σε καλλιέργειες ανθρώπινων τροφοβλαστικών κυττάρων έχει βρεθεί ότι αυξάνει την παραγωγή hPGH και hPL (16), αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει τους Golos και συνεργάτες (63) που κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα σε καλλιέργειες συγκυτιοτροφοβλάστης από Rhesus πίθηκο. Η εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (GH-releasing hormone), η γκρελίνη και η σωματοστατίνη δεν φαίνεται να τροποποιούν την hPHG έκκριση *in vivo* ή *in vitro* (64,65). Αύξηση των επιπέδων έκφρασης του *GH-V* παρατηρήθηκαν έπειτα από θεραπεία με ρετινοειδή και τον PPAR ligand (48). Κατά αντιστοιχία, ερεθίσματα που παρεμποδίζουν τη διεισδυτικότητα της συγκυτιοτροφοβλάστης ελαττώνουν την έκφραση του *GH-V*. Τέτοια είναι τα υπεροξειδία του χαλκού και του ψευδαργύρου, η δισμουτάση των οποίων παρεμποδίζει τη διείσδυση της εξωλάχνιας τροφοβλάστης (62,66).

γ) Μεταγραφικοί παράγοντες και *GH-V*

Πρόσφατες μελέτες των Lominick και Handwerger έδειξαν ότι ο προμότορας του *GH-V* γόνου υπερενεργοποιείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες MEF2 και FOXF1, αλλά όχι από τον FOXF2 (67). Εφόσον οι παράγοντες FOXF1 και FOXF2 προσδένονται στην ίδια θέση του *GH-V* προμότορα, οι ερευνητές πιθανολογούν την παρουσία επιπλέον σηματοδοτικών μορίων, τα οποία θεωρούν συνενεργοποιητές στη διαδικασία μεταγραφής, όπως για παράδειγμα την Activator Protein 2 (AP2) (64). Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις από μοντέλα καλλιιεργειών ότι το μονοξειδίο του αζώτου NO ενδεχομένως να αποτελεί τοπικό ρυθμιστή της έκφρασης του *GH-V* γονιδίου (62), πιθανά μέσω νευροδιαβιβαστικών σημάτων.

7,2) Ρύθμιση της hPGH σε επίπεδο κυκλοφορούσας στον ορό πρωτεΐνης σε φυσιολογικές κησεις

- α) Επίδραση ποικίλων συγκεντρώσεων γλυκόζης
- β) Κοιλιακή παχυσαρκία - Αυξημένος Δείκτης Μάζας Σώματος
- γ) Φυλετικός διμορφισμός hPGH
- δ) Κάπνισμα μητέρας
- ε) Πρόσδεση σε πρωτεΐνες του πλάσματος

α) Επίδραση ποικίλων συγκεντρώσεων γλυκόζης - Διαπλακουντιακή μεταφορά γλυκόζης

Υπάρχει πληθώρα ενδείξεων, τόσο από ζωικά μοντέλα όσο και από καλλιέργειες τροφοβλαστών, που καταδεικνύουν την επάρκεια ή ένδεια γλυκόζης στο πλακουντιακό μικροπεριβάλλον ως βασικό ρυθμιστή/ παράγοντα που επηρεάζει καθοριστικά το ρυθμό έκκρισης hPGH. Έχει βρεθεί ότι ο ανθρώπινος πλακούντας εκφράζει υποδοχείς - μεταφορείς γλυκόζης, της οικογένειας των GLUT μεταφορέων γλυκόζης, ειδικά δε ο GLUT-1 υποδοχέας βρίσκεται στον πλακούντα σε αφθονία (68,69). Επιπλέον ενδείξεις προκύπτουν από πειράματα σε ποντίκια, όπου θεραπεία με IGF-1 κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης σχετίζεται με αύξηση της σύνθεσης mRNA των μεταφορέων GLUT-1 και GLUT-3 (70). Οντογενετικές μελέτες σε πρόβατα έδειξαν ότι σε πρώιμα στάδια της κύησης υπάρχει ταχεία σύνθεση GLUT-1 παράλληλα με το μέγεθος/ βάρος του πλακούντα, ενώ σε όψιμα στάδια της κύησης επικρατεί η σύνθεση GLUT-3, η οποία βρέθηκε να συμβαδίζει με τον αυξημένο ρυθμό μεταβολισμού του πλακούντα (71). Πιστεύεται ότι ένα σημαντικό μέρος της διαπλακουν-τιακής μεταφοράς γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω των GLUT υποδοχέων. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι ο GLUT-1 ευθύνεται για μεταφορά γλυκόζης από μητέρα σε πλακούντα, ενώ ο GLUT-3 από πλακούντα σε έμβρυο (72).

Η επικρατούσα επί του παρόντος άποψη θέλει την hPGH να καταστέλλεται παρουσία επάρκειας γλυκόζης στο πλακουντιακό μικροπεριβάλλον. Ισχυρή ένδειξη προς την κατεύθυνση αυτή δόθηκε από την μελέτη των Patel και συνεργατών το 1995 (73). Σε in vitro καλλιέργεια κυτταροβλαστών από τελειόμηνα πλακουντιακά εκχυλίσματα παρατηρήθηκε ελάττωση της έκκρισης hPGH έπειτα από προσθήκη γλυκόζης, μάλιστα κατά ένα δοσοεξαρτώμενο πρότυπο. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε κατά το ήμισυ καταστολή της παραγωγής hPGH σε συγκέντρωση γλυκόζης ίση με 1 gr/mL στο θρεπτικό υλικό. Σε μια άλλη μελέτη, διαπιστώθηκε 27% αύξηση της hPGH στον ορό εγκύων με σακχαρώδη διαβήτη της κύησης, κατά τη διάρκεια οξέος υπερινσουλιαιμικού/ υπογλυκαιμικού επεισοδίου (74). Φαίνεται ότι η στοιβάδα της

συγκυτιοτροφοβλάστης, η οποία αποτελεί τον τόπο παραγωγής hPGH και GLUT υποδοχέων, ερχόμενη σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα, ανταποκρίνεται στις ταχείες μεταβολές της γλυκαιμικής κατάστασης της μητέρας μέσω τροποποίησης της hPGH έκκρισης (16), πιθανά μέσω παρακρινούς/ αυτοκρινούς δράσης. Πρόκειται για αντιρροπιστικό μηχανισμό προστασίας του εμβρύου από υπεργλυκαιμία. Συνεπώς, αύξηση των επιπέδων hPGH αποτελούν σήμα περιβάλλοντος υποθρεψίας για το έμβρυο. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και μια άλλη in vivo μελέτη (44, 75), όπου έγινε δοκιμασία φόρτισης με γλυκόζη σε έγκυες με σακχαρώδη διαβήτη. Παρατηρήθηκε πτώση των επιπέδων hPGH, χωρίς διακύμανση στις τιμές του hPL, της λεπτίνης ή της χοριακής γοναδοτροπίνης.

Νεότερες μελέτες έρχονται να ανατρέψουν τα δεδομένα περί καταστολής της hPGH σε περιβάλλον υπεργλυκαιμίας. Σε μικρή cohort μελέτη, οι McIntyre και συνεργάτες παρατήρησαν αυξημένες τιμές hPGH στον ορό 20 εγκύων με σακχαρώδη διαβήτη κύησης σε σύγκριση με έγκυες με φυσιολογική γλυκαιμική ρύθμιση (76). Παράλληλα, δοκιμασία φόρτισης με γλυκόζη σε υγιείς έγκυες δεν κατέστειλε τα επίπεδα hPGH (77). Τα νέα αυτά δεδομένα εμφανίζουν την hPGH αυξημένη στο υπεργλυκαιμικό περιβάλλον του σακχαρώδη διαβήτη. Ως πιθανότερη εξήγηση, οι επιστήμονες θεώρησαν αποσυσχέτιση της hPGH από το γλυκαιμικό status της μητέρας, πιθανά ως μηχανισμό αντιρρόπισης, λόγω της παρουσίας των παθογενετικών μηχανισμών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του διαβήτη και ιδιαίτερα με την εκδήλωση αντίστασης στην ινσουλίνη (76). Σαν πιθανός παθογενετικός μηχανισμός προτάθηκε η αντιρροπιστική μόνιμη αύξηση των βασικών επιπέδων της hPGH σε περιβάλλον χρόνιας υπεργλυκαιμίας στο σακχαρώδη διαβήτη, στα πλαίσια ανταγωνισμού της δράσης της ορμόνης με την ινσουλίνη. Η παρουσία ενός αντιρροπιστικού μηχανισμού αυτού του είδους θεωρείται πολύ πιθανή, δεδομένου ότι κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και με την υποφυσιακή GH επί σακχαρώδη διαβήτη στη μη-έγκυο κατάσταση (υπεργλυκαιμική δράση GH) (78,79).

β) Κοιλιακή παχυσαρκία - Αυξημένος Δείκτης Μάζας Σώματος

Υπάρχει πλέον ομοφωνία ότι ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) της μητέρας συσχετίζεται κατά αντίστροφο τρόπο με τις τιμές της hPGH στην κυκλοφορία καθ' όλα τα στάδια της εγκυμοσύνης (43,80-82). Τη διαπίστωση αυτή έρχονται να επιβεβαιώσουν μελέτες που καταδεικνύουν μια σαφή αντίστροφη συσχέτιση (inverse correlation) ανάμεσα στις τιμές hPGH και λεπτίνης στον ορό σε μη-παθολογικές κυήσεις (83,84). Η λεπτίνη είναι μια παραγόμενη από τα λιποκύτταρα και τον πλακούντα ορμόνη η οποία αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη και διεγείρει τον μεταβολισμό των λιποκυττάρων. Η αυξητική ορμόνη διαθέτει έντονη καταβολική -

λιπολυτική δράση και είναι ευρέως γνωστό ότι άτομα με αυξημένο ΔΜΣ έχουν χαμηλότερες τιμές υποφυσιακής GH (85-87). Ειδικότερα, η παρουσία παχυσαρκίας κοιλιακού τύπου (η οποία σχετίζεται με φαινόμενα αντίστασης στην ινσουλίνη και παρουσία λοιπών παραγόντων κινδύνου στα πλαίσια μεταβολικού συνδρόμου) φαίνεται να ρυθμίζει σε μεγάλο βαθμό την ημερήσια GH έκκριση στους ενήλικες (85). Προφανώς κάτι αντίστοιχο ισχύει και για την hPGH, την αυξητική ορμόνη του πλακούντα, η οποία διαθέτει εφάμιλλη με την υποφυσιακή GH σωματογόνο και λιπολυτική δράση (88). Υψηλές τιμές λεπτίνης συνήθως ανευρίσκονται σε παχύσαρκα άτομα που διαθέτουν υψηλό ΔΜΣ (89).

γ) Φυλετικός διμορφισμός hPGH

Υπάρχει πλήθος ενδείξεων ότι εγκυμοσύνες με θήλεα έμβρυα εκδηλώνουν υψηλότερες τιμές hPGH από ότι με άρρενα (81,82,84). Το ίδιο έχει παρατηρηθεί να ισχύει και για άλλες πλακουντιακής προέλευσης ορμόνες, όπως το πλακουντιακό γαλακτογόνο. Αντιστοιχία παρατηρείται και κατά την εξωμήτριο ζωή, δηλαδή υψηλότερα επίπεδα hPGH ανευρίσκονται στις γυναίκες από ότι στους άνδρες (85,90,91). Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να αποτελέσει το ότι τα θήλεα έμβρυα, οργανισμοί γενετικά προικισμένοι να συσσωρεύσουν στην εξωμήτριο ζωή περισσότερο λιπώδη ιστό από ότι τα άρρενα, υπερπαραγάγουν όλες τις ισομορφές αυξητικής ορμόνης άρα και την πλακουντιακή. Μια εναλλακτική θεωρεία, αφορά την εμφάνιση (από μέρους της μητέρας) αντίστασης στην αυξητική ορμόνη, λόγω υπερπαραγωγής υποφυσιακής GH από το θήλυ έμβρυο. Επομένως, σε μια κύηση θήλεος, απαιτούνται μεγαλύτερα ποσά hPGH - η οποία είναι η αποκλειστική μορφή αυξητικής ορμόνης στη μητρική κυκλοφορία κατά την κύηση - προκειμένου να υπερνικηθεί η αντίσταση στην αυξητική ορμόνη που έχει αναπτύξει η μητέρα και να προκύψει στο θήλυ έμβρυο ισότιμη hPGH δράση (81,84).

δ) Κάπνισμα μητέρας

Έχει βρεθεί ότι μητέρες που κάπνιζαν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είχαν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις hPGH στο αίμα τους, από ότι μη-καπνίζουσες έγκυες (84). Οι μητέρες αυτές γέννησαν παιδιά με χαμηλότερο - από το αναμενόμενο - βάρος γέννησης και μήκος σώματος, καθώς και μικρότερο μέγεθος πλακούντα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Είναι γνωστή από παλιά η συμμετοχή του καπνίσματος στην πρόκληση πλακουντιακής ανεπάρκειας (92,93). Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν προταθεί ποικίλοι παθογενετικοί μηχανισμοί, όπως η πρόκληση διαταραχών στους ενζυμικούς μηχανισμούς του πλακούντα με ταυτόχρονη αύξηση των

αγγειακών αντιστάσεων τοπικά, καθώς και η ελάττωση της μερικής τάσης/ συγκέντρωσης O₂ στο πλακουντιακό μικροπεριβάλλον, καταλύοντας έτσι ένα βασικό ερέθισμα για τροφοβλαστική διαφοροποίηση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη των Coutant και συνεργατών αποτελεί η ανάδειξη του καπνίσματος κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης σε ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη των τιμών της hPGH στον ορό, όπως προκύπτει έπειτα από πολλαπλή ανάλυση συσχέτισης (multiple regression analysis) (84). Η διαπίστωση αυτή οριοθετεί μια απευθείας επίδραση του καπνίσματος στην παραγωγή της hPGH, ανεξάρτητα από την επίδρασή του στη βιολογία/ λειτουργία του πλακούντα.

ε) Πρόσδεση σε πρωτεΐνες του πλάσματος

Ο βαθμός πρόσδεσης της hPGH σε πρωτεΐνες του πλάσματος και συγκεκριμένα στην GHBP (Growth Hormone Binding Protein) καθορίζει το ελεύθερο στην κυκλοφορία κλάσμα της hPGH (free hPGH), το οποίο θεωρείται και το λειτουργικά ενεργό μόριο (17). Η hPGH προσδέεται με εφάμιλλη με την υποφυσιακή GH συγγένεια στην GHBP (94). Η δέσμευση αυτή αποτελεί μια δυναμική κατάσταση η οποία καθορίζει την - ανά μονάδα χρόνου - διαθέσιμη ελεύθερη hPGH (free hPGH) για δράση στους ιστούς. Η αυξημένη πρόσδεση της hPGH στην GHBP (bound hPGH) περιορίζει τη βιοδιαθεσιμότητά της. Η κινητική της GHBP στον ορό ακολουθεί μια συμμετρική κωδονοειδή κατανομή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (76,95-98). Η παρουσία της GHBP στην κυκλοφορία θέτει περιορισμούς στις μετρήσεις των hPGH τιμών στον ορό, οδηγώντας ενίοτε στη μέτρηση της ολικής hPGH (όχι μόνο του ελεύθερου κλάσματος), συνεπώς σε υπερεκτίμηση και bias των hPGH τιμών (99,100). Τα επίπεδα της GHBP - με τη σειρά τους - ρυθμίζονται από διάφορους παράγοντες, σημαντικός από τους οποίους εμφανίζεται να είναι ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) (101). ΔΜΣ και hPGH φαίνεται να συσχετίζονται αντίστροφα (43,80-82,84). Πιστεύεται δε ότι ένας πιθανός διαμεσολαβητής της σχέσης αυτής είναι η GHBP. hPGH και GHBP εκδηλώνουν αντίστροφη συσχέτιση ειδικά στο 2^ο ήμισυ της εγκυμοσύνης (76,95). Συνεπώς η free hPGH αναμένεται υψηλότερη σε γυναίκες με χαμηλό ΔΜΣ. Δεδομένου της λιπολυτικής δράσης της (88), θεωρείται πιθανό η hPGH να εξασφαλίζει μια συνεχή προσφορά αυξημένου θερμιδικού υποστρώματος στο αναπτυσσόμενο έμβρυο στις γυναίκες χαμηλού ΔΜΣ σε σύγκριση με αυτές με υψηλότερο ΔΜΣ.

8) Μοριακή κινητική – Βιολογικά χαρακτηριστικά hPGH μορίου

Η hPGH ανιχνεύεται στη μητρική, αλλά όχι στην εμβρυϊκή κυκλοφορία (39). Ωστόσο, νεότερες μελέτες έχουν αναδείξει την παρουσία της στο αμνιακό υγρό (102,103) και στο ομφαλικό αίμα (104).

Η παραγωγή hPGH ξεκινάει νωρίς κατά την κύηση, περί την 8^η-10^η εβδομάδα (16,62), με πρωιμότερη ηλικία κύησης στην οποία έχει περιγραφεί παραγωγή της ορμόνης από τον πλακούντα την 5^η εβδομάδα (82). Μέγιστες τιμές επιτυγχάνονται περί το μέσο της κύησης, οπότε ο ρυθμός παραγωγής της ορμόνης σταθεροποιείται, με αποτέλεσμα οι τιμές στον ορό να εμφανίζουν μικρές μόνο διακυμάνσεις (plateau τιμών hPGH) μέχρι το τέλος της εγκυμοσύνης. Από την 15^η-20^η εβδομάδα της κύησης η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη σταδιακά αντικαθιστά την υποφυσιακή αυξητική ορμόνη, ως βασική μορφή αυξητικής ορμόνης στην κυκλοφορία της μητέρας (3), κατά τέτοιο τρόπο ώστε μετά την 24^η-25^η εβδομάδα η υποφυσιακή GH καθίσταται πλέον μη ανιχνεύσιμη στη μητρική κυκλοφορία (39,105,106). Στο σχήμα 2 παραθέεται ένα διάγραμμα από την δημοσίευση των Fuglsang και συνεργατών το 2005 (107), όπου φαίνεται η κινητική των δυο τύπων αυξητικής ορμόνης στον ορό σε φυσιολογικές κινήσεις. Αιφνίδια απότομη πτώση των τιμών της PGH στον ορό παρατηρείται εντός μιας ώρας από την έναρξη του τοκετού, πιθανά οφειλόμενη στις αιφνίδιες αλλαγές στη μητροπλακουν-τιακή ροή αίματος, καθώς και σε απελευθέρωση πρωτεασών από τον επίτοκο πλακούντα (106). Πρακτικά, μέσα σε 30 λεπτά από τη λήξη του τοκετού και την έξοδο του πλακούντα hPGH δεν ανιχνεύεται στο αίμα της μητέρας, επιβεβαιώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον περιορισμένο χρόνο ημιζωής της ορμόνης και την πλακουντιακή προέλευσή της (108).

Σε αντίθεση με την υποφυσιακή, η έκκριση της hPGH είναι συνεχής (τονικό πρότυπο) και όχι κατά ώσεις (παλμικό πρότυπο) (109). Η συνεχής αυτή έκκριση της hPGH είναι απαραίτητη για τη δημιουργία ενός σταθερού ορμονικού περιβάλλοντος για το αναπτυσσόμενο έμβρυο, καθώς και για την προσαρμογή του μητρικού μεταβολισμού στην κύηση (16,17).

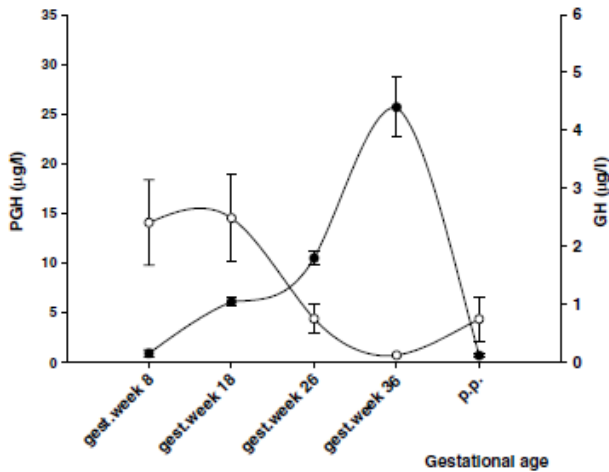


Fig. 1. Serum PGH (filled circles) and GH (open circles) during pregnancy in healthy subjects. Data are presented as means and SEM; $n = 11$. Notice the different scalings on the y-axes for PGH and GH.

Σχήμα 2.

Μεταβολή των συγκεντρώσεων στον ορό της πλακουντιακής (PGH) και της υποφυσιακής (GH) αυξητικής ορμόνης σε συνάρτηση με το χρόνο σε φυσιολογικές κύσεις.

8,1) Χρόνος ημιζωής

Ο χρόνος ημίσειας ζωής της hPGH είναι σχετικά μικρός και εκτιμάται σε μερικά λεπτά (17). Ο πίνακας που ακολουθεί (σχήμα 3) παραθέτει το χρόνο ημιζωής της ορμόνης, όπως αυτός έχει υπολογισθεί σε τρεις διαφορετικές μελέτες (39,108,110). Περιοριστικός παράγοντας στις μετρήσεις αυτές αποτελεί το μικρό πλήθος των δειγμάτων. Για την υποφυσιακή GH ο χρόνος ημιζωής στον ορό υπολογίζεται περίπου στα 15-17 λεπτά, ανάλογα τη διαθέσιμη GHBP (111,112). Δεδομένου της παρόμοιας βιολογικής συμπεριφοράς των δυο αυξητικών ορμονών και με βάση την ταχεία πτώση των hPGH επιπέδων μετά τον τοκετό (106), μπορεί κανείς με σχετική σιγουριά να εικάσει ένα χρόνο ημιζωής για την hPGH παρόμοιο με της υποφυσιακής GH. Θεωρείται ότι ο χρόνος $T_{1/2}=13,8$ min που υπολογίστηκε με ειδική για την hPGH μέθοδο ανοσοφθορισμού προσεγγίζει περισσότερο τον πραγματικό χρόνο ημίσειας ζωής της ορμόνης στην κυκλοφορία.

Estimated half-life of PGH

Reference	$T_{1/2}$ (min)	Number of subjects	PGH measurement
Eriksson et al. [137]	n.a. (short)	2	Indirect method
Frankenne et al. [65]	10–20	4	Indirect method
Lønberg et al. [136]	13.8	4	Direct method

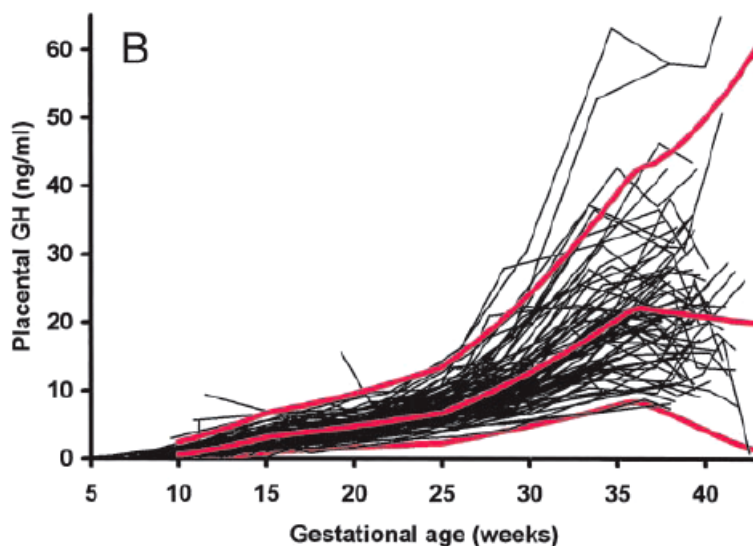
n.a.: not assessed.

Σχήμα 3. Πειραματικά υπολογιζόμενες τιμές χρόνου ημιζωής hPGH.

Πίνακας από τη δημοσίευση των Fuglsang-Ovesen 2006, “Aspects of placental growth hormone physiology, Growth Hormone & IGF Research 2006, vol 16, pgs 67–85 □

8,2) Φυσιολογικές τιμές στον ορό

Αναφορικά με τις φυσιολογικές τιμές της hPGH στον ορό, αυτές προφανώς ποικίλουν, ανάλογα την χρονική περίοδο της κύησης όπου πραγματοποιείται η μέτρηση. Οι μέγιστες τιμές παρατηρούνται στο 3^ο τρίμηνο, συμβαδίζοντας με το μέγιστο βάρος που προσλαμβάνει ο πλακούντας. Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό της hPGH είναι η μεγάλη βιολογική διακύμανση που παρουσιάζουν οι φυσιολογικές τιμές της στο μητρικό ορό, για μια δεδομένη ηλικία κύησης (82). Σε μια αναδρομική μελέτη σε 89 φυσιολογικές εγκυμοσύνες με μονήρες κύημα, οι Chellakooty και συνεργάτες παρατήρησαν ότι μετά την 25^η εβδομάδα της κύησης, το εύρος της διακύμανσης των hPGH τιμών στο αίμα των εγκύων αυξάνει σταδιακά, με μέγιστη διακύμανση προς το τέλος της κύησης (35^η-40^η εβδομάδα, σχήμα 4). Αν και παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις (τιμές hPGH >50 ng/mL), προκύπτει ένα μέσο εύρος τιμών 20-40 ng/mL κατά το 2^ο ήμισυ της κύησης.



Σχήμα 4.

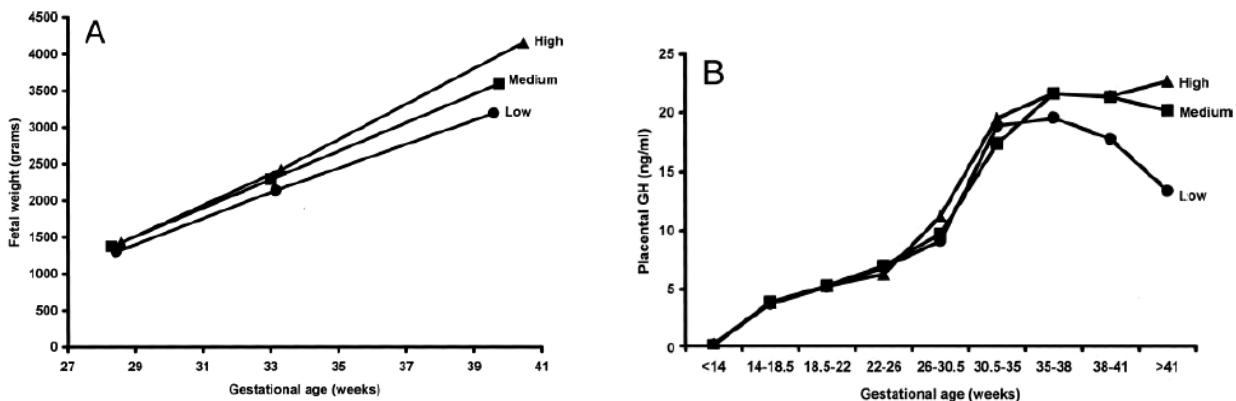
Καμπύλλες μεταβολής των συγκεντρώσεων στο μητρικό ορό της hPGH με την πρόοδο της κύησης. Το γράφημα περιλαμβάνει 89 ανεξάρτητες καμπύλλες, καθεμία αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή εγκυμοσύνη. Οι παχιές γκριζες γραμμές αντιπροσωπεύουν τη διάμεσο (μεσαία γραμμή) και 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (δύο ακραίες γραμμές). Γράφημα από τη δημοσίευση των Chellakooty et al 2004, “A Longitudinal Study of Intrauterine Growth and the Placental Growth Hormone (GH)-Insulin-Like Growth Factor I Axis in Maternal Circulation: Association between Placental GH and Fetal Growth, JCEM 2004, vol 89(1), pgs 384–391 □

8,3) Επίδραση στο βάρος του πλακούντα

Έχει βρεθεί ότι αύξηση του μεγέθους του πλακούντα συμβαδίζει με αντίστοιχη αύξηση των τιμών της hPGH στο αίμα της εγκύου (23). Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο, αν αναλογισθεί κανείς ότι ο ρυθμός αύξησης του μεγέθους του πλακούντα επιταχύνεται από το μέσον την κύησης και μετά, συνεπώς αυξάνεται ο διαθέσιμος αριθμός των κυττάρων που παράγουν τη συγκεκριμένη ορμόνη. Μια άλλη σημαντική παρατήρηση αφορά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε σχέση με την μέγιστη παραγωγή hPGH από τον πλακούντα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η διάρκεια της εγκυμοσύνης σχετίζεται με το στάδιο της κύησης(=την ηλικία κύησης) όπου παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση hPGH στον ορό (82). Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι, σε ηλικίες κύησης 37-42 εβδομάδων, όσο νωρίτερα κατά την κύηση έφτανε στη μέγιστη (για τη δεδομένη κύηση) τιμή της η hPGH, τόσο νωρίτερα ερχόταν ο τοκετός και τερματιζόταν η εγκυμοσύνη. Με βάση όσα ειπώθηκαν προηγουμένως για απότομη πτώση των τιμών της hPGH με την έναρξη του τοκετού, θα μπορούσε κανείς να εικάσει ότι η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη ενδεχομένως να εμπλέκεται στους βιοχημικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με έναρξη του τοκετού.

8,4) Επίδραση στο βάρος γέννησης

Έχει πολλάκις παρατηρηθεί θετική συσχέτιση των επιπέδων hPGH στο αίμα της εγκύου με το βάρος γέννησης του νεογνού (76,82,84). Σε φυσιολογικές κυήσεις, χαμηλότερες τιμές hPGH έχουν βρεθεί σε γυναίκες που γέννησαν ελαφρύτερα παιδιά (82) (σχήμα 5). Ωστόσο, εκτιμάται ότι κατά το 2^ο ήμισυ της κύησης τα επίπεδα της hPGH δεν μπορούν να θεωρηθούν προγνωστικά του βάρους γέννησης (80,81).



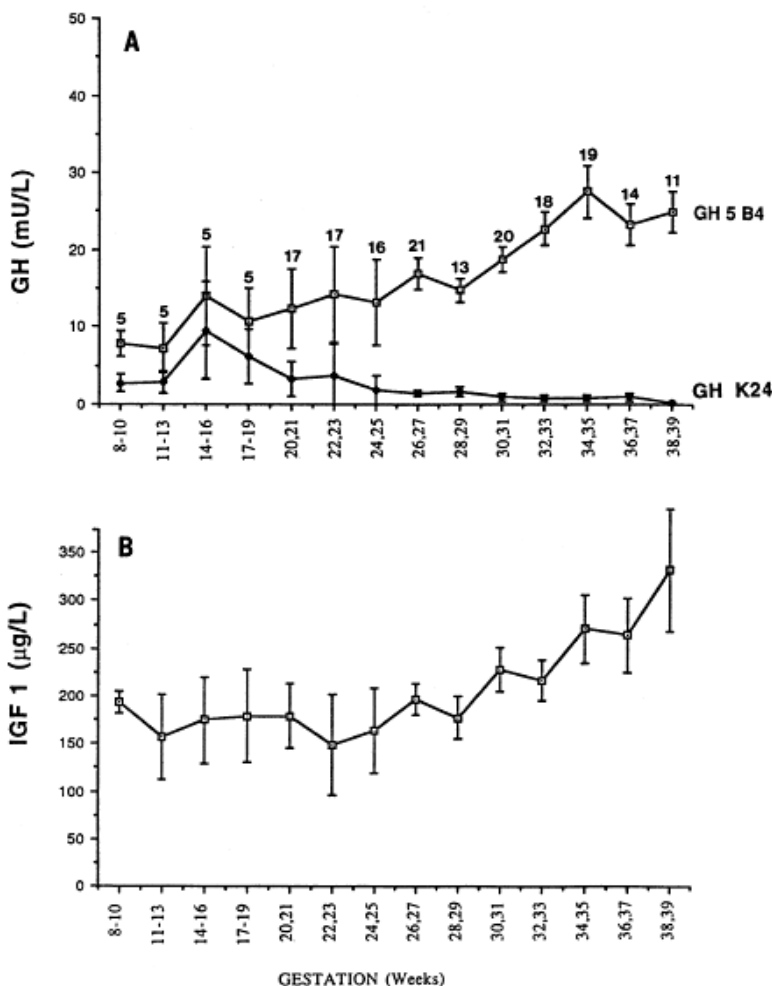
Σχήμα 5.

Παρόμοιες μεταβολές του βάρους γέννησης (ΒΓ) (γράφημα Α) και των συγκεντρώσεων στον ορό της hPGH (γράφημα Β) κατά την εξέλιξη μιας φυσιολογικής κύησης. Για κάθε υπό μελέτη χαρακτηριστικό, Ο πληθυσμός της μελέτης απαρτίζεται από τρεις ομάδες: χαμηλό (●), μεσαίο (■) και υψηλό (▲) ΒΓ. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τη διάμεσο κάθε ομάδας. Παρατηρούμε ότι η ομάδα των παιδιών με χαμηλό ΒΓ έχει και τις μικρότερες hPGH τιμές. Γράφημα από τη δημοσίευση των Chellakooty et al 2004, “A Longitudinal Study of Intrauterine Growth and the Placental Growth Hormone (GH)-Insulin-Like Growth Factor I Axis in Maternal Circulation: Association between Placental GH and Fetal Growth, JCEM 2004, vol 89(1), pgs 384–391 □

8,5) Σχέση hPGH και IGF-1 κατά την κύηση

Υπάρχει ποικιλία μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία, τόσο επιπολασμού-επίπτωσης όσο και αναδρομικές μελέτες με μεγάλο αριθμό δειγμάτων, που αναδεικνύουν μια σταθερή θετική συσχέτιση/συνμεταβολή των επιπέδων της hPGH με αυτά του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1) (16,17,82, 76,106,113,114). Μάλιστα, η συνμεταβολή των συγκεντρώσεων των δυο μορίων διατηρείται, ανεξαρτήτως του σταδίου/ηλικίας της κύησης, της παρουσίας ή μη παθολογίας της κύησης καθώς και του είδους της παθολογίας της κύησης (16,17,113,106). Οι Caufriez και συνεργάτες προσδιόρισαν στον ορό εγκύων με υγιείς, μη επιλεγμένες κύσεις τα επίπεδα της πλακουντιακής και της υποφυσιακής αυξητικής ορμόνης, καθώς και του IGF-1, σε διάφορα στάδια καθ’ όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (σχήμα 6) (16,113). Γίνεται εμφανές το σχεδόν όμοιο πρότυπο μεταβολής των συγκεντρώσεων της hPGH (GH 5B4, σχήμα 6, γράφημα Α) και του IGF-1 (σχήμα 6, γράφημα Β). Περαιτέρω ενδείξεις για τον ρυθμιστικό

ρόλο της hPGH στον IGF-1 προκύπτουν από τη μελέτες εγκύων με ακρομεγαλία (115). Παρά την υπερέκκριση υποφυσιακής GH και τις υψηλές βασικές τιμές ορού IGF-1 στη μη εγκύμονα κατάσταση, με την έναρξη και πρόοδο της κύησης η συγκέντρωση του IGF-1 συνέχισε να ανεβαίνει σταθερά, ακολουθώντας το πρότυπο έκκρισης της hPGH. Επιπροσθέτως, σε παθολογικές κύσεις σχετιζόμενες με διαταραχές της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας, στον ορό των εγκύων ανιχνεύονται χαμηλότερες συγκεντρώσεις hPGH σε σύγκριση με υγιείς κύσεις, ελάττωση η οποία έχει βρεθεί να συνοδεύεται με αντίστοιχη μείωση των συγκεντρώσεων στον ορό του IGF-1 (106). Στο σημείο αυτό πρέπει να διευκρινισθεί ότι ο IGF-1 που κυκλοφορεί στο μητρικό ορό είναι αυτός που δρα στον πλακούντα. Ο άνθρωπος πλακούντας έχει βρεθεί ότι δεν εκφράζει mRNA για τον IGF-1 (116). Συνεπώς, τα επίπεδα του IGF-1 στο μητρικό ορό αντικατοπτρίζουν και την IGF-1 δραστηριότητα του πλακούντα.



Σχήμα 6. Πολυπαραγοντική μελέτη των συγκεντρώσεων αυξητικής ορμόνης (GH) (A) και IGF-1 (B) στο μητρικό ορό σε φυσιολογικές κύσεις. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο±SEM σε δεδομένα χρονικά στάδια της κύησης (εκφράζονται ως εβδομάδες αμνηόρροιας). GH

5B4: hPGH και υποφυσιακή GH (Mab 5B4 αντίσωμα έναντι N-καρβοξυτελικού επιτόπου της υποφυσιακής GH), GH K24: υποφυσιακή GH (Mab K24 αντίσωμα έναντι εσωτερικού επιτόπου της υποφυσιακής GH)

Όπως θα συζητηθεί εκτενώς στη συνέχεια, ένα μεγάλο μέρος των δράσεων της hPGH διαμεσολαβείται μέσω του IGF-1, τα επίπεδα του οποίου φαίνεται να ρυθμίζει η ορμόνη. Ένας εμβρυϊκός ιστός, η συγκυτιοτροφοβλάστη, φαίνεται να αναλαμβάνει εν μέρει τον έλεγχο του μητρικού μεταβολισμού με το να αντικαταστήσει την μητρικής προέλευσης υποφυσιακή αυξητική ορμόνη με ένα δικό του προϊόν, την πλακουντιακή αυξητική ορμόνη hPGH.

9) Βιολογικές Ιδιότητες - Δράση hPGH

Συγκρινόμενη με την υποφυσιακή GH, η hPGH έχει εφάμιλλη με αυτήν σωματογόνο δράση και ικανότητα πρόσδεσης στους υποδοχείς αυξητικής ορμόνης GHRs (Growth Hormone Receptors) (62), ενώ εκδηλώνει μειωμένη λακτογόνο δράση (117). Αναφορικά με τη σωματογόνο – αυξητική δράση της, η hPGH (όπως και η υποφυσιακή GH) προάγει την κατά μήκος αύξηση των οστών και τη διαφοροποίηση των στοιχείων του μυοσκελετικού συστήματος (118). Οι ενδείξεις από διαγονιδιακά μοντέλα ζώων υπέρ της σωματογόνου δράσης της PGH είναι χαρακτηριστικές. Προκύπτει ότι ποντίκια που υπερεκφράζουν το GH-V γονίδιο γίνονται κατά 40-90% βαρύτερα συγκρινόμενα με ποντίκια με φυσιολογική GH-V έκφραση (119). Παράλληλα, χορήγηση hPGH επάγει την πρόσληψη και αποκατάσταση του σωματικού βάρους σε ποντίκια που έχουν υποστεί μερική εκτομή της υπόφυσης, κατά τρόπο εφάμιλλο με την υποφυσιακή GH (117). Έχει υπολογισθεί ότι η hPGH έχει 7 φορές μεγαλύτερη σωματογόνο-αυξητική δράση από ότι το πλακουντιακό γαλακτογόνο hPL (64). Η λακτογόνος δράση της hPGH σχετίζεται κυρίως με διέγερση του θηλασμού.

Όπως η υποφυσιακή GH, η hPGH ασκεί καταβολική δράση στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό της μητέρας, επάγοντας τη λιπόλυση και κατά συνέπεια την απελευθέρωση πληθώρας ελεύθερων λιπαρών οξέων μακράς αλύσου και κετονικών σωμάτων, εφοδιάζοντας το έμβρυο με ενεργειακό και δομικό υπόστρωμα (17,120). Από το μέσον της κύησης και μετά, η ευαισθησία της μητέρας στην ινσουλίνη φθίνει και στο μητρικό αίμα εκδηλώνεται μεταγευματική υπεργλυκαιμία, υπερτριγλυκεριδαιμία και υπερινσουλιναϊμία. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη βασίζεται σε ποσοστό μέχρι και 80% στην επάρκεια γλυκόζης για ενεργειακή απόδοση (16,17, 121). Η hPGH αναλαμβάνει να κατευθύνει το μητρικό μεταβολισμό θρεπτικών ουσιών, υδατανθράκων και πρωτεϊνών, εις όφελος

του εμβρύου (16,17,122). Η επίδρασή της στο μητρικό ήπαρ περιλαμβάνει επαγωγή της γλυκογονόλυσης και αναστολή της γλυκονεογένεσης, κινητοποιώντας και απελευθερώνοντας τα ενδοηπατικά αποθέματα γλυκόζης (120). Η δράση της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης στο ήπαρ πραγματοποιείται με έμμεσο τρόπο, μέσω ελέγχου του σύνθεσης IGF-1 από το μητρικό ήπαρ (16,17), αλλά και κατευθύνοντας επιλεκτικά την δράση του IGF-1 εντός του ήπατος (120). Ταυτόχρονα, η hPGH επάγει τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών, ενώ πιθανολογείται να έχει και ανοσορυθμιστικές ιδιότητες. Ένδειξη για το τελευταίο αποτελεί η ανεύρεση GH-V mRNA σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (25). Εικάζεται δε ότι συμμετέχει στο μηχανισμό ανοσολογικής ανοχής των πατρικής προέλευσης αντιγόνων του κυήματος.

Οι δράσεις της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης διενεργούνται κατά κύριο λόγο έμμεσα, μέσω ελέγχου της δράσης του IGF-1 (φαινόμενο συναγωνισμού με την ινσουλίνη). Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλεισθεί απευθείας επίδραση της ορμόνης στους ιστούς-στόχους (παρακρινής/ αυτοκρινής δράση), όπως μαρτυρά η παρουσία ειδικών hPGH υποδοχέων στον πλακούντα (123,124,125).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η διακύμανση στις τιμές της hPGH στο μητρικό ορό συνοδεύεται από αντίστοιχες διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων του IGF-1, ανεξαρτήτως της παρουσίας ή μη επιπλοκών της κύησης. Γίνεται εμφανές ότι η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη αποτελεί πρωταρχικό ρυθμιστή της δράσης του IGF-1 κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (126). Τα δυο αυτά μόρια ουσιαστικά σχηματίζουν ένα ορμονικό άξονα, τον άξονα hPGH/ IGF-1. Ο ορμονικός αυτός άξονας φαίνεται να κατέχει κυρίαρχο ρόλο στη σωματική ανάπτυξη του εμβρύου και στον καθορισμό του ενεργειακού ισοζυγίου μητέρας-εμβρύου, εις όφελος του εμβρύου. Συνεπώς, ένας εμβρυϊκός ιστός, η συγκυτιοτροφοβλάστη, φαίνεται να αναλαμβάνει εν μέρει τον έλεγχο του μητρικού μεταβολισμού, αντικαθιστώντας την μητρικής προέλευσης υποφυσιακή αυξητική ορμόνη με ένα δικό του προϊόν, την πλακουντιακή αυξητική ορμόνη hPGH (16,17).

10) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 1^{ου} ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- 1) Cooke NE. Prolactin: normal synthesis, regulation, actions. In: DeGroot LJ, editor. Endocrinology. Vol 1. Philadelphia: WB Saunders; 1989. p. 384-407
- 2) Cooke NE, Liebhaber SA. Molecular biology of the growth hormone-prolactin gene system. Vitam Horm 1995;50:385-459

- 3) G. Hennen, F. Frankenne, J. Closset, F. Gomez, G. Pirens, N. el Khayat, A human placental GH: increasing levels during second half of pregnancy with pituitary GH suppression as revealed by monoclonal antibody radioimmunoassays, *Int. J. Fertil.* 30 (1985) 27–33
- 4) G. Hennen, F. Frankenne, G. Pirens, F. Gomez, J. Closset, C. Schaus, N. el Khayat, New chorionic GH-like antigen revealed by monoclonal antibody radioimmunoassays, *Lancet* 1 (1985) 399.
- 5) Seeburg PH. The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* 1982;1:239-49
- 6) Miller W'L, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrinol Rev* 1983;4:97-130
- 7) Niall HD, Hogan ML, Sauer R, Rosenblum IY, Greenwood FC. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:866-70
- 8) Barsh GS, Seeburg PH & Gelinas RE (1983) The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acids Res*, 11, 3939–3958
- 9) Hirt H, Kimelman J, Birnbaum MJ, Chen EY, Seeburg PH, Eberhardt NL & Barta A (1987) The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations. *DNA*, 6, 59–70
- 10) Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE & Seeburg PH (1989) The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics*, 4, 479–497
- 11) George DL, Phillips JAd, Francke U, Seeburg PH. The genes for growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of human chromosome 17 in region q21 to qter. *Hum Genet.* 1981;57:138-141
- 12) DeNoto FM, Moore DD & Goodman HM (1981) Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, 9, 3719–3730
- 13) Miller W'L, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrinol Rev* 1983;4:97-130
- 14) Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinas RE, Seeburg PH. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 1989;4:479-97
- 15) Lefevre C, Imagawa M, Dana S, Grindlay J, Bodner M & Karin M (1987) Tissue-specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J*, 6, 971–981

- 16) E. Alsat, J. Guibourdenche, A. Couturier, D. Evain-Brion, Physiological role of human placental growth hormone, *Molecular and Cellular Endocrinology* 140 (1998) 121–127
- 17) Jens Fuglsang, Per Ovesen. Aspects of placental growth hormone physiology (review), *Growth Hormone & IGF Research* 16 (2006) 67–85
- 18) Barrera-Saldana HA, Seeburg PH & Sauders GF (1983) Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J Biol Chem*, 258, 3787–3793
- 19) Martial JA, Hallewell RA, Baxter JD & Goodman HM (1979) Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science*, 205, 602–607
- 20) Norquay LD, Jin Y, Surabbi RM, Gietz RD, Tanese N & Cattini PA (2001) A member of the nuclear-factor-1 family is involved in the pituitary repression of the human placental growth hormone genes. *Biochem J*, 354,387–395
- 21) Frankenne F, Rentier-Detnm F, Scippo ML, Martialj, Hennen G. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:635-7
- 22) Cooke NE, Ray J, Emery JG, Liebhaber SA: Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J Biol Chem* 1988;263:900
- 23) MacLeod, J.N., Lee, A.K., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E., 1992. Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol. Chem.* 267, 14219–14226
- 24) A.M. Bamberger, C.M. Bamberger, L.P. Pu, L.A. Puy, Y.P. Loh, S.L. Asa, Expression of pit-1 messenger ribonucleic acid and protein in the human placenta, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 2021–2026
- 25) L. Melen, G. Hennen, R.P. Dullaart, E. Heinen, A. Igout, Both pituitary and placental growth hormone transcripts are expressed in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), *Clin. Exp. Immunol.* 110 (1997) 336–340
- 26) J. Verhaeghe, M. Bougoussa, E. Van Herck, F. de Zegher, G. Hennen, A. Igout, Placental growth hormone and IGF-I in a pregnant woman with Pit-1 deficiency, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 53 (2000) 645–647
- 27) M.L. Scippo, F. Frankenne, E.L. Hooghe-Peters, A. Igout, B.Velkeniers, G. Hennen, Syncytiotrophoblastic localization of the human growth hormone variant mRNA in the placenta, *Mol. Cell. Endocrinol.* 92 (1993) R7–R13.
- 28) C.S. Jara, A.T. Salud, G.D. Bryant-Greenwood, G. Pirens, G.Hennen, F. Frankenne, Immunocytochemical localization of the human growth hormone variant in the human placenta, *J. Clin.Endocrinol. Metab.* 69 (1989) 1069–1072.

- 29) A. Lytras, M.E. Bock, J.G. Dodd, P.A. Cattini, Detection of placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin ribonucleic acid expression in human trophoblastic neoplasms by reverse transcriptase–polymerase chain reaction, *Endocrinology* 134 (1994) 2461–2467
- 30) Igout A, Scippo ML, Frankenne F & Hennen G (1989) Expression and secretion of the human placental growth hormone in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 17, 3998
- 31) Pavlakis GN, Hizuka N, Gorden P, Seeburg PH, Hamer DH. Expression of human growth hormone genes in monkey cells infected by simian virus 40 recombinants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7398-402.
- 32) Hizuka N, Hendricks CM, Pavlakis GN, Hamer DH, Gorden P. Properties of human growth hormone polypeptides: purified from pituitary extracts and synthesized in monkey kidney cells and bacteria. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:545-50.
- 33) Igout A, Scippo ML, Frankenne F~ Hennen G. Cloning and nucleotide sequence of placental hGH-V cDNA. *Arch Int Physiol Biochim* 1988;96:63-7.
- 34) Cooke NE, Ray J, Watson IVIA, Estes PA, Kuo BA, Liebhaber SA. Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J Clin Invest* 1988;82:270-5.
- 35) Liebhaber SA, Urbanek M, Ray J, Than RS, Cooke NE. Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta. *J Clin Invest* 1989;83:1985-91.
- 36) Marie-Christine Lacroix, Jean Guibourdenche, Thierry Fournier, Ingrid Laurendeau, Ahmed Igout, Vincent Goffin, Jacques Pantel, Vassilis Tsatsaris, and Daniele Evain-Brion, Stimulation of Human Trophoblast Invasion by Placental Growth Hormone, *Endocrinology* 2005, 146(5):2434–2444
- 37) Friesen H. Purification of a placental factor with immunological and chemical similarity to human growth hormone. *Endocrinology* 1965;76:369-81.
- 38) Hennen G, Frankenne F, Closset J, Gomez F, Pirens G, Smal J, et al. Monoclonal antibodies: basic principles, experimental and clinical applications in endocrinology. In: Forti C, Lipsett MB, Serio M, editors. *Monoclonal antibody to growth hormone: the discovery of a new variant, human placental growth hormone*. Vol 30. New York: Raven Press; 1985. p. 29-40. Serono Symposia.
- 39) Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J, Hennen G. The physiology of growth hormones in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:1171-80.

- 40) Frankenne F, Scippo ML, Van Beeumen J, Igout A, Hennen G. Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:15-8.
- 41) Igout A, Van Beeumen J, Frankenne F, Scippo ML, Devreese B & Hennen G (1993) Purification and biochemical characterization of recombinant human placental growth hormone produced in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 295, 719–724.
- 42) Evain-Brion D, Alsat E, Igout A, Frankenne F & Hennen G (1994). Placental growth hormone variant: assay and clinical aspects. *Acta Paediatr*, 399, 49–51.
- 43) Z. Wu et al., A new nonisotopic, highly sensitive assay for the measurement of human placental growth hormone: development and clinical implications, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 804–811
- 44) Alsat et al 1997. Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1526-34
- 45) J. Ray, B.K. Jones, S.A. Liebhaber, N.E. Cooke, Glycosylated human growth hormone variant, *Endocrinology* 125 (1989) 566–568.
- 46) Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991;99:681-92
- 47) M.W. Nachtigal, B.E. Nickel, P.A. Cattini, Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. A possible mechanism for locus regulation, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 8473–8479.
- 48) Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, Rochette-Egly C & Evain-Brion D (2001). PPAR/RXR heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001, 142, 4504–4514.
- 49) Matsuo H, Maruo T, Murata K, Mochizuki M. Epidermal growth factor regulates trophoblast proliferation and differentiation in an autocrine/paracrine manner. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1993;45:23-30.
- 50) Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J. Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 1993;132:1387-1395
- 51) Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, et al. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. *Hum Reprod* 1995;10:1907-1911.
- 52) Garcia-Lloret MI, Morrish DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR, Guilbert LJ. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF- 1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Experim Cell Res* 1994;214:46-54.

- 53) Strauss JF, 3rd, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N, Gafvels ME. The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta* 1992;13:389-403
- 54) Peng C. The TGF-beta superfamily and its roles in the human ovary and placenta. *J Obstet Gynaecol Can.* 2003;25:834-844.
- 55) Getsios S, Chen GT, MacCalman CD. Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression. *J Reprod Fertil.* 2000;119:59-68.
- 56) Getsios S, Chen GT, MacCalman CD. Alpha-, beta-, gamma-catenin, and p120(CTN) expression during the terminal differentiation and fusion of human mononucleate cytotrophoblasts in vitro and in vivo. *Mol Reprod Dev* 2001;59:168-177.
- 57) Pollheimer J, Loregger T, Sonderegger S, et al. Activation of the canonical wingless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *Am J Pathol* 2006;168:1134-1147.
- 58) Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3874-3881.
- 59) Nomura S, Ito T, Yamamoto E, et al. Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1751:19-25.
- 60) Ma GT, Roth ME, Groskopf JC, et al. GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* 1997;124:907-914.
- 61) Robins JC, Heizer A, Hardiman A, Hubert M, Handwerger S. Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells. *Placenta.* 2007;28:1141-1146.
- 62) M. C. Lacroix, J. Guibourdenche, J. L. Frendo, F. Muller and D. Evain-Brion. Human Placental Growth Hormone - A Review. *Placenta* (2002), 23, Supplement A, Trophoblast Research, 16, S87-S94
- 63) Golos, T.G., Durning, M., Nadeau, K., 1994. In vitro expression of four placental growth hormone:chorionic somatomammotropin messenger ribonucleic acids is stimulated by 8-bromo-adenosine 3',5'-monophosphate in rhesus monkey syncytiotrophoblasts. *Endocr J.* 2, 363-366.
- 64) Stuart Handwerger, *Growth, Genetics & Hormones* 2009, Volume 25, Number 1, June 2009
- 65) De Zegher, F., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Spitz, B., Fajjerson, Y., Blomberg, F., Beckers, A., et al., 1990. Perinatal growth hormone (GH) physiology: effect of GH-releasing factor

on maternal and fetal secretion of pituitary and placental GH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 520–522

66) Frenco J, The´ron P, Bird T, Massin N, Muller F, Guibourdenche J, Luton D, Vidaud M, Anderson WB & Evain-Brion D (2001) Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology*, 142, 3638–3648.

67) Lomenick JP, Hubert MA, Handwerger S. Transcription factor FOXF1 regulates growth hormone variant gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E947-951.

68) Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O., Hirano, H., 1992. Localization of erythrocyte:Hep G2-type glucose transporter (GLUT 1) in human placental villi. *Cell Tissue Res.* 267, 407–412.

69) Hauguel de Mouzon, S., Leturque, A., Alsat, E., Loizeau, M., Evain-Brion, D., Girard, J., 1994. Developmental expression of Glut1 glucose transporter and c-fos genes in human placental cells. *Placenta* 15, 35–46.

70) Bauer et al 1998, Fetal growth and placental function, *Molecular and Cellular Endocrinology* 140 (1998) 115–120

71) Currie MJ, Bassett NS, Gluckman PD, Ovine glucose transporter-1 and -3: cDNA sequences and developmental gene expression in the placenta. *Placenta* 1997, 18(5-6):393-401.

72) Zhou, J., Bondy, C.A., 1993. Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. *J. Clin. Invest.* 91, 845–852.

73) Patel, N., Alsat, E., Igout, A., Baron, F., Hennen, G., Porquet, D., et al., 1995. Glucose inhibits human placental GH secretion, in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1743–1746.

74) Bjorklund AO, Adamson UK, Carlstrom KA, Hennen G, Igout A, Lins PE & Westgren LM (1998) Placental hormones during induced hypoglycemia in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus:evidence of an active role for placenta in hormonal counter-regulation. *Br J Obstet Gynaecol*, 105, 649–655.

75) Chaignaud C, Guibourdenche J, Sibony O, Evain-Brion D, Luton D, Chevenne D & Porquet D (2000) Modulation de la secretion des hormones placentaires au cours du test de O’Sullivan. In *Actualite´s en Pharmacie Biologique et Clinique* (Ed.) Garnier JP, Le Moe`l G, Nivet-Antoine V & Beaudoux JL, pp. 153–156. Paris.

76) McIntyre et al 2000, Placental Growth Hormone (GH), GH-Binding Protein, and Insulin-Like Growth Factor Axis in Normal, Growth-Retarded, and Diabetic Pregnancies: Correlations with Fetal Growth, *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1143–1150, 2000

77) McIntyre et al 2002, Placental growth hormone is not suppressed by oral glucose loading in normal human pregnancy, *Horm Metab Res.* 2002 May;34(5):250-3.

- 78) Davidson MB. 1987 Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocr Rev.* 8:115–129.
- 79) Moller N, Jørgensen JO, Schmitz O, et al. 1990 Effects of a growth hormone pulse on total and forearm substrate fluxes in humans. *Am J Physiol.* 258:E86–E91.
- 80) J. Verhaeghe, A. Pintiaux, E. Van Herck, G. Hennen, J.M. Foidart, A. Igout, Placental GH, IGF-I, IGF-binding protein-1, and leptin during a glucose challenge test in pregnant women:relation with maternal body weight, glucose tolerance, and birth weight, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 2875–2882.
- 81) M. Chellakooty, L. Skibsted, S.O. Skouby, A.M. Andersson, J.H. Petersen, K.M. Main, N.E. Skakkebaek, A. Juul, Longitudinal study of serum placental GH in 455 normal pregnancies:correlation to gestational age, fetal gender, and weight, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 2734–2739.
- 82) M. Chellakooty, K. Vangsgaard, T. Larsen, T. Scheike, J. Falck-Larsen, J. Legarth, A.M. Andersson, K.M. Main, N.E. Skakkebaek, A. Juul, A longitudinal study of intrauterine growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 384–391
- 83) H. Norrelund, J. Frystyk, J.O. Jorgensen, N. Moller, J.S.Christiansen, H. Orskov, A. Flyvbjerg, The effect of growth hormone on the insulin-like growth factor system during fasting, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 3292–3298.
- 84) R. Coutant, d.C. Boux, O. Douay, E. Mathieu, S. Rouleau, F. Beringue, P. Gillard, J.M. Limal, P. Descamps, Relationships between placental GH concentration and maternal smoking, newborn gender, and maternal leptin: possible implications for birth weight, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 4854–4859.
- 85) N. Vahl, J.O. Jorgensen, C. Skjaerbaek, J.D. Veldhuis, H. Orskov, J.S. Christiansen, Abdominal adiposity rather than age and sex predicts mass and regularity of GH secretion in healthy adults, *Am. J. Physiol.* 272 (1997) E1108–E1116.
- 86) T.K. Hansen, C.H. Gravholt, H. Orskov, M.H. Rasmussen, J.S. Christiansen, J.O. Jorgensen, Dose dependency of the pharmacokinetics and acute lipolytic actions of growth hormone, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 4691–4698.
- 87) N. Vahl, N. Moller, T. Lauritzen, J.S. Christiansen, J.O.Jorgensen, Metabolic effects and pharmacokinetics of a growth hormone pulse in healthy adults: relation to age, sex, and body composition, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 3612–3618.

- 88) H.M. Goodman, L.R. Tai, J. Ray, N.E. Cooke, S.A. Liebhaber, Human growth hormone variant produces insulin-like and lipolytic responses in rat adipose tissue, *Endocrinology* 129 (1991) 1779–1783.
- 89) Sagawa et al 2002, Possible Role of Placental Leptin in Pregnancy-A Review, *Endocrine*, vol. 19, no. 1, 65–71, October 2002
- 90) K.Y. Ho, W.S. Evans, R.M. Blizzard, J.D. Veldhuis, G.R. Merriam, E. Samojlik, R. Furlanetto, A.D. Rogol, D.L. Kaiser, M.O. Thorner, Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64 (1987) 51–58.
- 91) E.B. Eden, F.A. Karlsson, T. Naessen, P. Gillberg, L. Wide, Ambulatory morning growth hormone concentrations increase in men and decrease in women with age, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62 (2002) 25–31
- 92) Ergaz et al 2005, (Review) Intrauterine growth restriction—etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models? *Reproductive Toxicology* 20 (2005) 301–322
- 93) Eric Jauniaux, Graham J. Burton, Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit, *Early Human Development* (2007) 83, 699–706
- 94) G. Baumann, N. Davila, M.A. Shaw, J. Ray, S.A. Liebhaber, N.E. Cooke, Binding of human growth hormone (GH)-variant (placental GH) to GH-binding proteins in human plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73 (1991) 1175–1179.
- 95) J. Fuglsang, F.F. Lauszus, S. Fisker, A. Flyvbjerg, P. Ovesen, Growth hormone binding protein and maternal body mass index in relation to placental growth hormone and insulin requirements during pregnancy in type 1 diabetic women, *Growth Horm. IGF Res.* 15 (2005) 223–230
- 96) R. Barnard, F.Y. Chan, H.D. McIntyre, Growth hormone binding protein in normal and pathologic gestation: correlations with maternal diabetes and fetal growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 1879–1884.
- 97) G. Massa, Growth hormone-binding proteins during human pregnancy: maternal, fetal and neonatal data, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206 (1994) 316–319.
- 98) G. Massa, A. Igout, L. Rombauts, F. Frankenne, M. Vanderschueren-Lodeweyckx, Effect of oestrogen status on serum levels of growth hormone-binding protein and insulin-like growth factor-I in non-pregnant and pregnant women, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 39 (1993) 569–575.

- 99) S. Fisker, L. Ebdrup, H. Orskov, Influence of growth hormone binding protein on growth hormone estimation in different immunoassays, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 58 (1998) 373–381
- 100) T.K. Hansen, S. Fisker, B. Hansen, H.H. Sorensen, J.S.Christiansen, J.O. Jorgensen, H. Orskov, Impact of GHBP interference on estimates of GH and GH pharmacokinetics, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 57 (2002) 779–786.
- 101) S. Fisker, N. Vahl, J.O. Jorgensen, J.S. Christiansen, H. Orskov, Abdominal fat determines growth hormone-binding protein levels in healthy nonobese adults, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 123–128.
- 102) Mittal et al 2008, The effect of gestational age and labor on placental growth hormone in amniotic fluid, *Growth Hormone & IGF Research* 18 (2008) 174–179
- 103) Papadopoulou et al 2006, Increased human placental growth hormone at midtrimester pregnancies may be an index of intrauterine growth retardation related to preeclampsia, *Growth Hormone & IGF Research* 16 (2006) 290–296
- 104) Mittal et al 2007, Placental growth hormone is increased in the maternal and fetal serum of patients with preeclampsia, *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007 September ; 20(9): 651–659.
- 105) Eriksson L (1989) Growth hormone in human pregnancy. Maternal 24-hour serum profiles and experimental effects of continuous GH secretion. *Acta Obstet Gynecol Scand, Suppl.*, 147, 1–38.
- 106) Mirlesse V, Frankenne F, Alsat E, Poncelet M, Hennen G & Evain-Brion D (1993) Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res*, 34, 439–442.
- 107) J. Fuglsang, C. Skjaerbaek, U. Espelund, J. Frystyk, S. Fisker, A. Flyvbjerg, P. Ovesen, Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 62 (2005) 554–559.
- 108) Lonberg U, Damm P, Andersson AM, Main KM, Chellakooty M, Lauenborg J, Shakkebaek NE, Juul A. Increase in maternal placental growth hormone during pregnancy and disappearance during parturition in normal and growth hormone-deficient pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188(1):247-51
- 109) Eriksson L, Frankenne F, Eden S, Hennen G, Von Schoultz B. Growth hormone 24-h serum profiles during pregnancy-lack of pulsatility for the secretion of the placental variant. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96(8):949-53
- 110) L. Eriksson, F. Frankenne, S. Eden, G. Hennen, B. Von Schoultz, Growth hormone secretion during termination of pregnancy. Further evidence of a placental variant, *Acta Obstet.Gynecol. Scand.* 67 (1988) 549–552.

- 111) T.K. Hansen, Pharmacokinetics and acute lipolytic actions of growth hormone. Impact of age, body composition, binding proteins, and other hormones, *Growth Horm. IGF Res.* 12 (2002) 342–358.
- 112) F. Schaefer, G. Baumann, D. Haffner, L.M. Faunt, M.L. Johnson, M. Mercado, E. Ritz, O. Mehls, J.D. Veldhuis, Multifactorial control of the elimination kinetics of unbound (free) growth hormone (GH) in the human: regulation by age, adiposity, renal function, and steady state concentrations of GH in plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (1996) 22–31.
- 113) Caufriez et al 1993, Regulation of maternal IGF-I by placental GH in normal and abnormal human pregnancies, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265: E572-E577
- 114) Caufriez et al 1994, Regulation of maternal insulin-like growth factor I by placental growth hormone in pregnancy. Possible action of maternal IGF-I on fetal growth, *Horm Res* 1994;42:62-65
- 115) Beckers, A., Stevenaert, A., Foidart, J.M., Hennen, G., Frankenne, F., 1990. Placental and pituitary growth hormone secretion during pregnancy in acromegalic women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71, 725–731.
- 116) Han et al 1996. The Expression of Insulin-Like Growth Factor (IGF) and IGF-Binding Protein (IGFBP) Genes in the Human Placenta and Membranes: Evidence for IGF-IGFBP Interactions at the Feto-Maternal Interface, *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2680-2693, 1996
- 117) MacLeod JN, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA & Cooke NE. Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology* 1991;128:1298-302
- 118) Andrea Giustina, Gherardo Mazziotti, and Ernesto Canalis, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton, *Endocrine Reviews*, 29: 535–559, 2008
- 119) R.F. Selden, T.E. Wagner, S. Blethen, J.S. Yun, M.E. Rowe, H.M. Goodman, Expression of the human growth hormone variant gene in cultured fibroblasts and transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8241–8245
- 120) Vijayakumar et al 2010, Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism, *Growth Hormone & IGF Research* 20 (2010) 1–7
- 121) Huw Jones, Susan E. Ozanne, Fetal programming of glucose–insulin metabolism, *Molecular and Cellular Endocrinology* 297 (2009) 4–9
- 122) Hiden et al 2006, Insulin control of placental gene expression shifts from mother to foetus over the course of pregnancy, *Diabetologia* (2006) 49: 123–131

123) Frankenne F, Alsat E, Scippo ML, Igout A, Hennen G & Evain-Brion D (1992) Evidence for the expression of growth hormone receptors in human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*, 182, 481–486.

124) Hill DJ, Riley SC, Basset NS & Waters MJ (1992) Localisation of the growth hormone receptor, identified by immunocytochemistry, in second trimester human fetal tissues and in placenta throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 646–650.

125) Mertani HC, Delehay-Zervas MC, Martini JF, Postel-Vinay MC & Morel G (1995) Localization of growth hormone receptor messenger RNA in human tissues. *Endocrine*, 3, 135–142.

126) Ruvdeep Randhawa, Pinchas Cohen, The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth (minireview), *Molecular Genetics and Metabolism* 86 (2005) 84–90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° : ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΕΙΔΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΑ (IGF-1) ΚΑΙ ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΕΣ ΑΥΤΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΝΑ (IGFBP-1) ΚΑΙ ΤΡΙΑ (IGFBP-3)

1) Γενικά χαρακτηριστικά της οικογένειας των IGFs

Οι ινσουλινοειδείς αυξητικοί παράγοντες ένα και δυο (Insulin-like Growth Factors, χάριν συντομίας IGFs αρχής εφ'εξής στο παρόν σύγγραμμα) IGF-1 και IGF-2, είναι χαμηλού μοριακού βάρους (7,5 kDa έκαστος) πρωτεΐνες. Το μόριό τους αποτελείται από μια μονήρη πεπτιδική αλυσίδα, με υψηλή ομολογία αμινοξικής σύνθεσης μεταξύ τους (1). Θεωρούνται πρωτεΐνες εξελικτικά συντηρημένες. Δομικά παρουσιάζουν ομοιότητες με το πεπτίδιο της προ-ινσουλίνης (2), ενώ λειτουργικά μιμούνται/ ανταγωνίζονται τη δράση της ινσουλίνης (εξ'ου και ο χαρακτηρισμός "παράγοντες ομοιάζοντες τη δράση της ινσουλίνης, ινσουλινοειδείς"). Πρόκειται για ορμονικά σηματοδοτικά μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, προάγοντας τη σωματική αύξηση, τόσο ενδομητρίως, όσο και κατά την εξωμήτριο ζωή. Επηρεάζουν λειτουργίες που σχετίζονται με το μεταβολισμό, την προαγωγή/ ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση καθώς και το ορμονικό περιβάλλον όπου πραγματοποιούνται οι διεργασίες αυτές (1-4). Η δράση τους αφορά μια ποικιλία ιστών και κυτταρικών ομάδων, όπως τα οστά, οι μύες, ο λιπώδης ιστός και το ήπαρ (1). Κατά την ενδομήτριο ζωή, οι IGFs δρουν ως παρακρινείς αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι συντίθενται από ποικιλία εμβρυϊκών ιστών (5,6). Υπεύθυνα για την παραγωγή τους γονίδια είναι αντίστοιχα τα *Igf-1* και *Igf-2*.

Η σωματογόνος-αυξητική δράση των IGFs στους ιστούς φαίνεται να είναι αθροιστική. Ενδεικτικό της συνέργειας των δυο μορίων είναι η εξεσημασμένη ελάττωση του βάρους γέννησης ποντικών με γενετικά στοχευμένη σίγαση και των δυο *Igf* γόνων, σε σύγκριση με την μικρότερη ελάττωση του βάρους γέννησης έπειτα από επιλεκτική μονήρη σίγαση του καθ'ενός γόνου ξεχωριστά (7).

Ο IGF-1 ευθύνεται κυρίως για τη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου της μητέρας εις όφελος του εμβρύου. Ο ρόλος του επικεντρώνεται στην προαγωγή και διατήρηση ενός σταθερού περιβάλλοντος βιοδιαθέσιμων θρεπτικών ουσιών και δομικού υποστρώματος για ενεργειακή απόδοση στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (1). Ο IGF-2 ευθύνεται κυρίως για αυτήν καθ'εαυτή την σωματική ανάπτυξη/ σωματογένεση του εμβρύου και - τουλάχιστον στα πρώιμα στάδια της κύησης - θεωρείται ισχυρότερο μιτογόνο της εμβρυϊκής σωματικής αύξησης (1,4).

2) Συστατικά στοιχεία του IGF άξονα

Οι IGFs διαθέτουν ισχυρή μιτωγόνο-αναβολική δράση (8). Η δράση αυτή καθορίζεται αφ' ενός από το ρυθμό παραγωγής τους από τα Igf γονίδια, αφ' ετέρου από τη διαθέσιμη ποσότητα αδέσμευτου-ελεύθερου IGF στην κυκλοφορία, συνεπώς λειτουργικά διαθέσιμου για δράση στους ιστούς-στόχους. Η βιοδιαθεσιμότητα των IGFs εξαρτάται από την παρουσία στον ορό των δεσμευτικών των IGF πρωτεϊνών IGFBPs (IGF Binding Proteins). Πρόκειται για οικογένεια πρωτεϊνών απαρτιζόμενη από έξι μέλη (IGFBP-1 έως IGFBP-6) (8,9). Οι IGFBPs προσδένονται με τους IGFs και τους αδρανοποιούν. Οι IGFBPs με τη σειρά τους υπόκεινται σε μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, κυριότερες εκ των οποίων είναι η φωσφορυλίωση και η πρωτεόλυση. Για την τελευταία υπεύθυνες είναι οι πρωτεάσες των IGFBPs (IGFBP proteases), ξεχωριστή ομάδα πρωτεϊνών. Οι IGFBP πρωτεάσες αδρανοποιούν τις IGFBPs και παρατείνουν το χρόνο ημιζωής των IGFs, γι' αυτό και θεωρούνται συν-μιτογόνα με αυτούς (9). Οι IGFs, οι υποδοχείς τους, οι IGFBPs και οι IGFBP πρωτεάσες σχηματίζουν ένα ορμονικό-σηματοδοτικό μηχανισμό, γνωστό ως "IGF άξονα", υπεύθυνο για τη διαχείριση ποικίλων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων όπως η επάρκεια θρεπτικών ουσιών και η ιστική οξυγόνωση, καθώς και πλήθους ορμονικών σημάτων, με κυριότερες την GH, την ινσουλίνη, την κορτιζόλη, τις θυρεοειδικές ορμόνες και τις στεροειδείς ορμόνες του φύλου (1,4).

3) Ρύθμιση γενετικής έκφρασης - παραγωγής IGF-1

Ο ρυθμός παραγωγής IGF-1 εξαρτάται από το στάδιο της εγκυμοσύνης (=την ηλικία κύησης) (5,10,11). Η γενετική έκφραση του Igf-1 γονιδίου είναι πολυπαραγοντική, ωστόσο αναγνωρίζονται τρεις βασικοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί:

- 1) μεταβολική ρύθμιση - επίπεδο θρέψης και οξυγόνωσης της μητέρας
- 2) ενδοκρινική ρύθμιση
- 3) ρυθμιστική επίδραση από τις IGFBPs

3,1) Μεταβολική ρύθμιση

Πλήθος μελετών σε ζώα έχουν σαφώς καταδείξει ότι πρόκληση υποθρεψίας ή/και συνθηκών υποξίας στην έγκυο μητέρα οδηγεί σε πτώση των κυκλοφορούντων επιπέδων IGF-1 στο έμβρυο, ανεξαρτήτως της μεθόδου θερμιδικής αποστέρησης (3).

3,2) Ενδοκρινική ρύθμιση

In utero, ο IGF-1 επηρεάζεται από ορμόνες που σχετίζονται με το ενεργειακό ισοζύγιο, όπως η ινσουλίνη, η θυροξίνη και τα γλυκοκορτικοειδή (12). Τα τελευταία επηρεάζουν σημαντικά και τον IGF-2. Η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στον άξονα των IGFs πιστεύεται ότι σχετίζεται με αλλαγές του κυτταρικού προγραμματισμού που συντελούνται ενδομητρίως, οι οποίες αργότερα κατά την ενήλικη ζωή οδηγούν στην εμφάνιση εκφυλιστικών καρδιαγγειακών και μεταβολικών νοσημάτων, όπως η στεφανιαία νόσος και ο σακχαρώδης διαβήτης. Η υπόθεση του “λιτού φαινότυπου” (thrifty phenotype hypothesis) του Barker έχει επαληθευτεί από μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους και πειράματα σε ζώα και έχει βρεθεί ότι σχετίζεται συν των άλλων με in utero έκθεση σε υψηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών (13). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ενδομήτρια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις κορτιζόλης οδηγεί σε πρόωμη μετάβαση από επικράτηση του IGF-2 σε επικράτηση του IGF-1 signaling (το οποίο κυριαρχεί στο σωματοτρόπο άξονα των ενηλίκων), με συνέπεια την πρόωμη έναρξη του “τύπου ενήλικα” κυτταρικού κύκλου, άρα και την πρόωμη γήρανση των κυττάρων (14).

3,3) Παρουσία IGFBPs

Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που υφίστανται οι IGFBPs παίζουν καθοριστικό ρόλο στη δράση του IGF-1 και θα συζητηθούν εκτενώς στη συνέχεια (6^η ενότητα παρόντος κεφαλαίου).

4) IGF-1 και πλακούντας - έκφραση και τοπική δράση

Ο πλακούντας παράγει IGFs. Πρωιμότερο στάδιο της κύησης που έχει καταγραφεί πλακουντιακή IGF παραγωγή είναι η 6^η εβδομάδα (5,6). Αν και σε πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης επικρατεί κυρίως παραγωγή IGF-2, από τις αρχές του 2^{ου} τριμήνου ο ρυθμός παραγωγής IGF-1 αυξάνεται, για να φτάσει στα μέγιστα επίπεδα περί το μέσον της κύησης, από όπου και έπειτα διατηρείται σε σχετικά σταθερά επίπεδα (11). Ο αυξημένος ρυθμός παραγωγής κατά το 2^ο τρίμηνο φαίνεται να σχετίζεται με τις αυξημένες θερμιδικές και μεταβολικές ανάγκες του εμβρύου κατά την περίοδο αυτή. Συγκεκριμένα, ο IGF-1 συντελεί στην κατά μήκος αύξηση του εμβρυϊκού σκελετού (15,16) και στην αύξηση του μεγέθους των εμβρυϊκών ιστών και οργάνων, τα οποία έχουν ήδη σχηματισθεί κατά το 1^ο τρίμηνο (1,3,4). Ο IGF-1 δρα συνδεδεμένος με τον τύπο ένα IGF υποδοχέα (IGF-1R) στις κυτταρικές επιφάνειες (17).

Component of IGF axis	Expression at maternal-fetal interface	Author, year
IGF-I	villous cytotrophoblast; extravillous trophoblast; microvillous membrane; decidua	Han et al., 1996
IGF-II	chorionic plate; chorionic mesoderm; cytotrophoblast; extravillous trophoblast; amnion and chorion leave	Han et al., 1996
IGFBP-1	endometrial stromal cells and decidualised stroma	Han et al., 1996
IGFBP-2	decidua	Han et al., 1996
IGFBP-3	decidua; extravillous trophoblast; amnion and chorion leave; villous core	Han et al., 1996
IGFBP-4	decidua; villous core	Han et al., 1996
IGFBP-5	decidua; villous core	Han et al., 1996
IGFBP-6	decidua	Han et al., 1996
IGF1R	syncytiotrophoblast; cytotrophoblast; microvillous membrane; villous core	Murata et al., 1994; Fang et al., 1997; Holmes et al., 1999
IGF2/M6PR	microvillous membrane	Fang et al., 1997

Σχήμα 1: Χωρική έκφραση των μορίων μέλη του IGF άξονα στην εμβρυομητρική επιφάνεια. Από τη δημοσίευση των Forbes και Westwood 2008, “ The IGF Axis and Placental Function - A Mini Review, Horm Res 2008;69:129–137”

Σε αντίθεση με τον IGF-2, ο πλακούντας είναι μια μάλλον φτωχή πηγή IGF-1, μιας και εκφράζει μικρές μόνο ποσότητες mRNA του *Igf-1* (18). Ωστόσο, σημαντικοί ιστοί παραγωγής IGF-1 στην εμβρυομητρική επιφάνεια θεωρούνται η συγκυτιοτροφοβλάστη, το λαχνωτό χόριο και η εξωλάχνια τροφοβλάστη και σε μικρότερο βαθμό το φθαρτοποιημένο ενδομήτριο (σχήμα 1, 5,6). Πιστεύεται ότι ο πλακούντας ρυθμίζει έμμεσα την IGF-1 δράση στο μητρικό ορό επηρεάζοντας τη σύνθεσή του στους μητρικούς ιστούς, ιδίως στο μητρικό ήπαρ (1), μέσω της παραγωγής ορμονών από τη συγκυτιοτροφοβλάστη και συγκεκριμένα της hPGH (19).

5) Ρόλος του IGF-1 στην εμβρυϊκή ανάπτυξη

Ο IGF-1, ο οποίος διαθέτει μιτογόνο - αναβολική δράση, προάγει τη σωματική αύξηση και ευοδώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση (20). Η σημασία του IGF-1 για την εμβρυϊκή ανάπτυξη τεκμηριώνεται από τη θετική συσχέτιση - συνμεταβολή που έχει παρατηρηθεί μεταξύ των συγκεντρώσεων IGF-1 στο ομφαλικό αίμα και στο βάρος γέννησης των νεογνών σε υγιείς κτήσεις (21,22). Η δράση του εξαρτάται από την ηλικία (= το στάδιο) της κύησης, τη θερμιακή κατάσταση και την ηλικία της μητέρας καθώς και από τον αριθμό των κυοφορούντων εμβρύων (8). Η επίδραση του IGF-1 στην προαγωγή της εμβρυϊκής ανάπτυξης μπορεί να διαφοροποιηθεί σε δυο σκέλη: 1) επίδραση στο μητρικό μεταβολισμό και 2) επίδραση στον εμβρυϊκό μεταβολισμό, μέσω IGF-1 δράσεων στον πλακούντα (1).

5,1) Επίδραση IGF-1 στο μητρικό μεταβολισμό

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο 1^ο κεφάλαιο του παρόντος συγγράμματος, ο παραγόμενος από τη μητέρα IGF-1 δεν διαπερνά τον εμβρυοπλακουντιακό φραγμό, δηλαδή μητρικός IGF-1 δεν δρα απευθείας στο έμβρυο. Η δράση του IGF-1 στο έμβρυο είναι έμμεση, μέσω IGF-1 δράσης στον πλακούντα.

Ο IGF-1 παράγεται κυρίως από το μητρικό ήπαρ και λιγότερο από άλλους μητρικούς ιστούς (σκελετικοί μύες, νεφρά, λιπώδης ιστός). Κατά την κύηση, ο IGF-1 συμβάλλει στην αύξηση του μεγέθους των οργάνων της εγκύου (πρόκληση οργανομεγαλίας) όπως το ήπαρ, οι σκελετικοί μύες, η μήτρα και ο λιπώδης ιστός, προκειμένου να ανταποκριθεί η μέλλουσα μητέρα στις αυξημένες μεταβολικές και λειτουργικές ανάγκες της κύησης (23). Συντελεί στην υπερπλασία και υπερτροφία των κυττάρων του μυομήτριου. Παράλληλα, προάγει την κυτταρική αύξηση στους μητρικούς ιστούς προστατεύοντας τα κύτταρα από την απόπτωση και επάγοντας την ιστική αποκατάσταση (cell turnover) (1). Ωστόσο, ο βασικός ρόλος του IGF-1 κατά την κύηση είναι ο έλεγχος του μητρικού μεταβολισμού υδατανθράκων, θρεπτικών ουσιών και δομικών μορίων και η καθοδήγησή του προς όφελος των εμβρυϊκών μεταβολικών αναγκών (1,2,4). Πράγματι, το μέγιστο εύρος της IGF-1 δράσης εκδηλώνεται σε συνθήκες εμβρυϊκής υποθρεψίας. Έχει βρεθεί ότι ο IGF-1 προάγει την αντίσταση της μητέρας στην ινσουλίνη. Παράλληλα κινητοποιεί τα ενδοηπατικά και περιφερειακά αποθέματα γλυκόζης και διεγείρει την - πιθανά μέσω hPGH διαμεσολαβούμενη - σπλαχνική λιπόλυση, με σκοπό τη μέγιστη απόδοση γλυκόζης, αμινοξέων, λιπαρών οξέων και λοιπών ενεργειακών και δομικών μορίων στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (1,4,24).

5,2) Επίδραση IGF-1 στον εμβρυϊκό μεταβολισμό - IGF-1 δράση στον πλακούντα

Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες τροφοβλαστών έχουν αποδείξει ότι η συγκυτιοτροφοβλάστη εκφράζει IGF-1R υποδοχείς όπως και υποδοχείς ινσουλίνης (24,25). Στον πλακούντα ο IGF-1 επάγει την έκφραση υποδοχέων-μεταφορέων γλυκόζης (26) διευκολύνοντας τη διαπλακουντιακή μεταφορά γλυκόζης. Ταυτόχρονα, ο IGF-1 προάγει τη διαφοροποίηση της κυτταρο- σε συγκυτιο-τροφοβλάστη, επάγοντας τη συγκυτιοποίηση (σχήμα 2, 27,28) και διεγείροντας τη διεισδυτικότητα και τη μεταναστευτική ικανότητα των τροφοβλαστικών κυττάρων (σχήμα 2, 29,30). Πειράματα σε καλλιέργειες πλακουντιακών ινοβλαστών 1^{ου} τριμήνου που επιμολύνθηκαν με αδενοϊό - φορέα του Igf-1 γονιδίου, έδειξαν ότι ο IGF-1 προάγει την υπερπλασία και την επιβίωση των κυττάρων (31), ενώ ταυτόχρονα αποτρέπει την απόπτωση σε καλλιέργειες τροφοβλαστών και πλακουντιακών ινοβλαστών (31,32).

Ο IGF-1 συμμετέχει στην πλακουντιακή μορφογένεση (1), η δε αύξηση των IGF-1 επιπέδων συμβαδίζει με αντίστοιχη αύξηση της πλακουντιακής μάζας και της επιφάνειας ανταλλαγής αερίων και θρεπτικών ουσιών (26). Σημαντική είναι η θετική συσχέτιση που έχει βρεθεί μεταξύ των τιμών IGF-1 στο μητρικό ορό με σωματομετρικά χαρακτηριστικά του εμβρύου, όπως το μέγεθος του μηριαίου οστού και το βάρος κατά τη γέννηση (33). Επιπρόσθετα, ο IGF-1 συμμετέχει στην ορμονική ρύθμιση του ενδομήτριου περιβάλλοντος, ανταποκρινόμενος κυρίως σε ορμόνες που σχετίζονται με το θερμιδικό - ενεργειακό ισοζύγιο (βλέπε ενδοκρινική ρύθμιση IGF-1). Επίσης επάγει την έκκριση ορμονών που θεωρούνται απαραίτητες για την επιβίωση του εμβρύου, όπως η προγεστερόνη, η χοριακή γοναδοτροπίνη και το πλακουντιακό γαλακτογόνο hPL (34).

Τέλος, ο IGF-1 φαίνεται να σχετίζεται με ελάττωση των περιφερικών αγγειακών αντιστάσεων στη μητέρα και τοπικά στον πλακούντα. Όπως προκύπτει από καλλιέργειες τελειόμηνων ανθρώπινων πλακουντιακών κυττάρων, ο IGF-1 εμποδίζει την απελευθέρωση αγγειοσυσπαστικών πεπτιδίων, όπως οι προσταγλανδίνες E και F και η θρομβοξάνη (35). Το γεγονός αυτό έρχονται να υποστηρίξουν μελέτες σε έμβρυα με IUGR φαινότυπο επί εδάφους προεκλαμψίας, όπου παρατηρούνται χαμηλές τιμές IGF-1 στο μητρικό αίμα (36-38). Το σχήμα 2 από την ανασκόπηση των Forbes και Westwood (4) ανακεφαλαιώνει τη δράση καθενός από τα επιμέρους στοιχεία του IGF άξονα στον πλακούντα.

Table 2. Summary of the role of components of the IGF axis in the placenta: the role of IGFs and IGFBPs in promoting (†) or inhibiting (‡) events in the placenta are described

	Function	Authors, dates
IGF-I	† migration † extravillous proliferation † fibroblast proliferation † differentiation → syncytial	Aplin et al., 2000; Lacey et al., 2002 Maruo et al., 1995 Miller et al., 2005 Bhaumick et al., 1992; Milio et al., 1994; Cohran et al., 1996
	† differentiation → extravillous ‡ apoptosis metabolism: † amino acid uptake	Aplin et al., 2000; Lacey et al., 2002 Smith et al., 2002; Miller et al., 2005 Bloxam et al., 1994; Kniss et al., 1994; Karl et al., 1995; Yu et al., 1998; Jensen et al., 2000
IGF-II	† migration † extravillous proliferation † cytotrophoblast proliferation † fibroblast proliferation ‡ apoptosis metabolism: † nutrient exchange surface area † permeability for nutrients	Irving et al., 1995; Hamilton et al., 1998 Thomsen et al., 1997 Thomsen et al., 1997 Miller et al., 2005 Miller et al., 2005 Lopez et al., 1996; Constancia et al., 2002; Sibley et al., 2004
	IGFBP-1	‡ basal trophoblast migration † basal trophoblast migration † IGF-II induced trophoblast migration ‡ IGF- induced cytotrophoblast proliferation ‡ differentiation → extravillous metabolism: np-IGFBP-1 † IGF-I induced nutrient uptake p-IGFBP-1 ‡ basal nutrient uptake p-IGFBP-1 ‡ IGF-I induced nutrient uptake
IGFBP-3	‡ IGF-induced fibroblast proliferation	Rogers et al., 1996

Σχήμα 2. Περίληψη της δράσης των ποικίλων μορίων που απαρτίζουν τον IGF άξονα.

Επεξήγηση συμβόλων:

(↓) ανασταλτική επίδραση του παράγοντα στη συγκεκριμένη λειτουργία

(↑) ευοδωτική επίδραση του παράγοντα στη συγκεκριμένη λειτουργία

Από τη δημοσίευση των Forbes και Westwood 2008, “ The IGF Axis and Placental Function - A Mini Review, Horm Res 2008;69:129–137”

6) Κυκλοφορούσες μορφές IGF-1 στον ορό - Ρόλος του 150 kDa μοριακού συμπλόκου

Ο IGF-1 κυκλοφορεί στον ορό με τη μορφή ενός τετραμερούς μοριακού συμπλόκου, μοριακού βάρους 150 kDa. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από ένα μόριο IGF-1, ένα μόριο IGFBP-1 και IGFBP-5 και μια γλυκοπρωτεΐνη γνωστή με το όνομα acid labile subunit (ALS) (39,40). Όλα τα συστατικά μόρια του 150 kDa συμπλόκου παράγονται από το ήπαρ. Επίσης, μικρά ποσά IGF-1 κυκλοφορούν σε διμερή σύμπλοκα 50 kDa με άλλες IGFBPs (συνήθως με την IGFBP-3), ενώ λιγότερο του 1% της συνολικής ποσότητας IGF-1 στην κυκλοφορία βρίσκεται σε ελεύθερη/αδέσμευτη μορφή στον ορό (39). Η πρόσδεση στο 150 kDa σύμπλοκο υποχρεώνει τον IGF-1 να

παραμένει στο ενδοαγγειακό διαμέρισμα, μιας και το 150 kDa σύμπλοκο αδυνατεί να περάσει τον ενδοθηλιακό φραγμό, παρατείνοντας έτσι το χρόνο ημιζωής του IGF-1 στην κυκλοφορία και ταυτόχρονα παρέχοντας μια δεξαμενή βραδείας αποδέσμευσης IGF-1 (IGF-1 reservoir) για δράση στους ιστούς (8,9,41). Ενδεικτικά παραθέτονται οι χρόνοι ημιζωής των διαφόρων μορφών IGF-1 στον ορό : Για την αδέσμευτη (free) IGFBP-3 $T_{1/2}=30-90$ min, για τον αδέσμευτο (free) IGF-1 $T_{1/2} < 10$ min, ενώ για το 150 kDa σύμπλοκο $T_{1/2}=12$ ώρες (9).

Για να μπορέσει ο IGF-1 να δράσει στους ιστούς πρέπει να συνδεθεί με τους IGF-1R υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας, γεγονός που προϋποθέτει την αποδέσμευσή του από το 150 kDa σύμπλοκο. Αυτό επιτυγχάνεται με περιορισμένη πρωτεόλυση της IGFBP-3 εντός του συμπλόκου, κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προκύψει/ απελευθερωθεί ένα διμερές αποτελούμενο από IGF-1 και IGFBP-3 (42). Το διμερές αυτό ακολούθως διαπερνά τον ενδοθηλιακό φραγμό και επιτρέπει τη σύνδεση του IGF-1 με τους υποδοχείς του. Γίνεται αισθητό ότι η IGFBP-3, εκτός από παράταση του χρόνου ημιζωής, ευθύνεται και για την ιστική κατανομή του IGF-1, μέσω της διανομής του στους διάφορους ιστούς με το διμερές σύμπλοκο (8,9).

7) Δεσμευτικές του IGF-1 πρωτεΐνες ένα (IGFBP-1) και τρία (IGFBP-3)

7,1) Έκφραση IGFBP-1 και IGFBP-3 από τους εμβρυϊκούς ιστούς

Όπως φαίνεται και από το σχήμα 1, η IGFBP-1 παράγεται κυρίως από το φθαρτοποιημένο ενδομήτριο και τα στρωματικά κύτταρα της μήτρας και όχι από τον πλακούντα. Αντίθετα, ο πλακούντας, μαζί με την εξωλάχνια τροφοβλάστη και το λαχνωτό χόριο αποτελούν βασική πηγή IGFBP-3 (σχήμα 1, 5,6).

7,2) Ρύθμιση παραγωγής IGFBP-1 και IGFBP-3

Έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της IGFBP-3 παραμένουν σχετικά σταθερά, μη μεταβαλλόμενα από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος . Πιστεύεται ότι οι σταθερές συγκεντρώσεις της IGFBP-3 στον ορό οφείλονται στη συμμετοχή της στο 150 kDa σύμπλοκο και κατά συνέπεια στην ανάγκη για σταθερές συγκεντρώσεις IGF-1 στον ορό (43). Βασικός ρυθμιστής των συγκεντρώσεων IGFBP-3 θεωρείται η αυξητική ορμόνη (41). Αντίθετα, η IGFBP-1 επηρεάζεται έντονα από τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και οι τιμές τις στον ορό μπορούν να παρουσιάσουν έντονες διακυμάνσεις. Πιο συγκεκριμένα, η IGFBP-1 ανταποκρίνεται κυρίως σε αλλαγές της θερμοδίκης

κατάστασης της μητέρας (θρεπτική ρύθμιση, απαντητικότητα στην ινσουλίνη) και σε ορμονικά σήματα, με κυριότερο την κορτιζόλη (44,45).

7,3) Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των IGFBP-1 και IGFBP-3 και η λειτουργική τους σημασία

Η συγγένεια πρόσδεσης (affinity) των IGFBP-1 και IGFBP-3 με τον IGF-1 καθορίζεται από την παρουσία μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων στο μόριο τους. Γενικά, κατά την υγιή εγκυμοσύνη οι μεταβολικές και μιτογόνες διεργασίες καθιστούν επιτακτική την παρουσία μεγάλων βιοδιαθέσιμων ποσοτήτων IGF-1. Αυτό επιτυγχάνεται με ελάττωση της συγγένεια πρόσδεσης των IGFBP-1 και IGFBP-3 με τον IGF-1 (2), μέσω μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων των IGFBP. Αναφορικά με το είδος των μετα-τροποποιήσεων των IGFBP, η IGFBP-1 υφίσταται κυρίως φωσφορυλίωση σε μια θέση σερίνης (8,9) και σε μικρότερο βαθμό πρωτεόλυση, ενώ η IGFBP-3 υφίσταται κυρίως πρωτεόλυση (8,9). Έχει παρατηρηθεί ότι οι IGFBP-1 και -3 μπορούν να έχουν εξίσου IGF-προαγωγό ή IGF-ανασταλτική δράση στη κυτταρική ανάπτυξη, ανάλογα την παρουσία ή απουσία της μετα-μεταγραφικής τροποποίησης στο μόριό τους (9,41). Οι τροποποιήσεις αυτές και οι επακόλουθες μεταβολές στην πρόσδεση του IGF-1 μπορούν να εξηγήσουν τους ποικίλους και ενίοτε αντικρουόμενους ρόλους των IGFBP. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της IGFBP-1 αναστέλλει, ενώ η αποφωσφορυλίωση επάγει την IGF-1 επαγόμενη πρόσληψη αμινοξέων σε καλλιέργειες τροφοβλαστών (46). Άλλο παράδειγμα σχετίζεται με την ικανότητα της IGFBP-1 ενίοτε να διεγείρει τη μετανάστευση/ διεισδυτική ικανότητα τροφοβλαστικών κυττάρων σε καλλιέργεια (47,48) και άλλοτε να την αναστέλλει (49).

Αναφορικά με την IGFBP-1, κατά την κύηση πιστεύεται ότι επικρατεί η μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της (50), η οποία έχει μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης με τον IGF-1, με συνέπεια κατά την υγιή κύηση η IGFBP-1 να ασκεί ευωδοτική δράση στην κυτταρική ανάπτυξη.

7,4) IGFBP και ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR)

Πλήθος μελετών έχει αναδείξει μια σαφή σχέση ανάμεσα σε υψηλές τιμές κυκλοφορούσας IGFBP-1 και χαμηλές συγκεντρώσεις IGFBP-3 στον ορό σε περιπτώσεις κύσεων που εκδήλωσαν ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR), ανεξαρτήτως του παθογενετικού μηχανισμού πρόκλησης της νόσου (51-53). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η αύξηση των επιπέδων IGFBP-1 κατά την κύηση είναι ικανή να προκαλέσει, χωρίς συνοδή παθολογία, φαινότυπο IUGR (54).

7,5) Βιολογικές Ιδιότητες - Δράσεις IGFBP-1 και IGFBP-3

Υπάρχουν κάποιες γενικές αρχές που διέπουν τη δράση των IGFbps, συνεπώς και εκείνη των IGFBP-1 και IGFBP-3 (41). Οι IGFbps περιορίζουν τη βιοδιαθέσιμη ποσότητα του IGF-1 για σύνδεση με τους IGF-1R υποδοχείς ενώ ταυτόχρονα προάγουν την IGF-1 δράση, παρέχοντας μια δεξαμενή βραδείας αποδέσμευσης IGF-1. Επίσης, προλαμβάνουν την IGF-1 επαγόμενη υπογλυκαιμία και μεταφέρουν τον IGF-1 από το ενδοαγγειακό στο εξωαγγειακό διαμέρισμα. Παράλληλα, οι IGFbps εμφανίζουν και IGF-ανεξάρτητες δράσεις, ιδίως η IGFBP-3, επηρεάζοντας τον κυτταρικό παλλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Τέλος, πρόσφατες μελέτες κάνουν λόγο και για δράση της IGFBP-3 απευθείας στον πυρήνα, μέσω πρόσδεσης του μορίου της με το σύστημα πορινών του πυρήνα (8,9,41). Το σχήμα 3 συνοψίζει τις δράσεις των IGFbps.

Functions of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins

Limit bioavailability of free IGFs to bind IGF receptors
Prevent IGF-induced hypoglycemia
Regulate transport of IGFs between intra- and extravascular spaces
Prolong the half-life of IGFs in circulation
Enhance actions of IGFs by forming a slow-releasing pool of IGFs
Affect cellular proliferation/death via IGFBP receptors
Nuclear actions

Σχήμα 3. Δράσεις των IGFbps. Από τη δημοσίευση των Wetterau και συνεργατών “Novel Aspects of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins - Minireview, Molecular Genetics and Metabolism 1999, vol 68, pgs 161–181”

Αναφορικά με τη δράση της IGFBP-1, διαθέτει την ικανότητα πρόσδεσης με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και συγκεκριμένα με τους $\alpha 5\beta 1$ υποδοχείς ιντεγκρίνης. Η πρόσδεση στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία της δίνει τη δυνατότητα να ασκεί ευεργετική δράση στην προαγωγή της κυτταρικής κινητικότητας, συνεπώς στη μετατάστευση των κυττάρων, μέσω IGF-1 ανεξάρτητων μηχανισμών (9,55). Η δράση της IGFBP-1 ρυθμίζεται έντονα από την παρουσία ινσουλίνης ή κορτιζόλης στο αίμα (44,45). Η υπερινσουλιναίμια αναστέλλει τη σύνθεση της IGFBP-1. Αντιθέτως, καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από πτώση των επιπέδων ινσουλίνης στον ορό

(όπως σε περιπτώσεις IUGR ή σακχαρώδη διαβήτη της κύησης) συνοδεύονται από άνοδο των τιμών IGFBP-1 στο αίμα. Γενικά πιστεύεται ότι η IGFBP-1 αναστέλλει τις μεταβολικές και αυξητικές ικανότητες του IGF-1 (56). Από άποψη μετα-μεταγραφικών τροποποιήσεων η φωσφορυλίωση του μορίου της IGFBP-1 αναστέλλει, ενώ στη μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της διεγείρει τη δράση του IGF-1 (8,9,41).

Αναφορικά με την IGFBP-3, η δράση της θεωρείται ότι ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική αύξηση όταν βρίσκεται συνδεδεμένη μαζί με τον IGF-1 (στο 150 kDa τετραμερές σύμπλοκο στον ορό ή σε διμερές μαζί του για IGF-1 πρόσδεση και δράση στους ιστούς). Η παρουσία της IGFBP-3 στον ορό άνευ σύνδεσης με τον IGF-1 σχετίζεται με ανασταλτική της κυτταρικής αύξησης επίδραση στα κύτταρα (9). Πρωταρχικός ρυθμιστής της δράσης της IGFBP-3 στη μη έγκυο κατάσταση θεωρείται η υποφυσιακή αυξητική ορμόνη (41). Νεότερες μελέτες συνηγορούν υπέρ πιθανών πυρηνικών δράσεων της IGFBP-3. Έχει ανακαλυφθεί σε σειρές νεφρικών κυττάρων και καρκινικών κυττάρων μαστού η παρουσία στο μόριο της IGFBP-3 της μιας αλληλουχίας-σήματος πυρηνικής εντοπισμού NLS (Nuclear Localisation Sequence), η οποία πιθανολογείται ότι επιτρέπει στην IGFBP-3 να προσδένεται στο σύστημα ιμπορτίνης του πυρήνα, σύστημα που διευκολύνει την ενδοπυρηνική μεταφορά (57,58). Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν την πιθανότητα η IGFBP-3 να ασκεί άμεσα έλεγχο στο γενετικό υλικό των κυττάρων και να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση (9,41).

8) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1) AN Sferruzzi-Perri, JA Owens, KG Pringle and CT Roberts, The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth - topical review, *J Physiol* 2011, vol 589(1), pp 7–20

2) Christopher J.Bowman, Randal D.Streck and Robert E.Chapin, Maternal-Placental Insulin-Like Growth Factor (IGF) Signaling and its Importance to Normal Embryo-Fetal Development - Review Article, *Birth Defects Research (Part B)* 89:339–349 (2010)

3) Abigail L.Fowden. The Insulin-like Growth Factors and feto-placental Growth, *Placenta* (2003), vol 24, pp 803–812

4) Karen Forbes, Melissa Westwood, The IGF Axis and Placental Function - A Mini Review, *Horm Res* 2008;69:129–137

- 5) Han et al 1996, The Expression of Insulin-Like Growth Factor (IGF) and IGF-Binding Protein (IGFBP) Genes in the Human Placenta and Membranes: Evidence for IGF-IGFBP Interactions at the Feto-Maternal Interface, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, vol 81(7), pp 2680-2693
- 6) Han et al 1996, IGF-binding protein mRNAs in the human fetus: tissue and cellular distribution of developmental expression, *Horm Res* 1996; vol 45(3-5):160-6.
- 7) Louvi A, Accili D & Efstratiadis A (1997). Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol* 189, 33–48.
- 8) Paulo F Collett-Solberg, Pinchas Cohen. Genetics, Chemistry and Function of the IGF/IGFBP System. *Endocrine*, vol 12(2), pp 121-136, April 2000
- 9) Matthew M. Rechler and David R. Clemmons, Regulatory Actions of Insulin-like Growth Factor-binding Proteins, *TEM Vol. 9, No. 5*, 1998
- 10) Coulter CL, Han VK. 1996. The pattern of expression of insulin-like growth factor (IGF). IGF-I receptor and IGF binding protein (IGFBP) mRNAs in the rhesus monkey placenta suggests a paracrine mode of IGF-IGFBP interaction in placental development. *Placenta* 17:451–460.
- 11) Dhara S, Lalitkumar PG, Sengupta J, Ghosh D. 2001. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factors I and II at the primary implantation site in the Rhesus monkey. *Mol Hum Reprod* 7:365–371.
- 12) Fowden AL (1995) Endocrine regulation of fetal growth. *Reproduction, Fertility and Development* 1995, vol 7, pp 351–363.
- 13) Barker DTP (2001) The malnourished baby and infant. *British Medical Bulletin*, 60, 69–88.
- 14) Langford et al 1994, The pathophysiology of the insulin-like growth factor axis in fetal growth failure: a basis for programming by under nutrition? *European Journal of Clinical Investigation* (1994) 24,851-856
- 15) Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D: Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 2002; 110:771–781.
- 16) Andrea Giustina, Gherardo Mazziotti, and Ernesto Canalis, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton, *Endocrine Reviews* 2008, vol 29: 535–559
- 17) Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu J-L, Butler A: The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001; 22: 53–74.

- 18) Han VK & Carter AM (2000). Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta* 21, 289–305.
- 19) E. Alsat, J. Guibourdenche, A. Couturier, D. Evain-Brion, Physiological role of human placental growth hormone, *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998, vol 140, pp 121–127
- 20) Han VKM & Fowden AL (1994) Paracrine regulation fetal growth. In *Early Fetal Growth and Development* (Eds) Ward RHT, Smith SK & Donnai D, pp. 275–292. RCOG Press.
- 21) Osorio M, Torres J, Moya F, Pezzullo J, Salafia C, Baxter R, Schwander J, Fant M: Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins-1, -2, and -3 in newborn serum: relationships to fetoplacental growth at term. *Early Hum Dev* 1996; 46: 15–26.
- 22) Klauwer D, Blum WF, Hanitsch S, Rascher W, Lee PD, Kiess W: IGF-I, IGF-II, free IGFI and IGFBP-1, -2 and -3 levels in venous cord blood: relationship to birthweight, length and gestational age in healthy newborns. *Acta Paediatr* 1997; 86: 826–833.
- 23) Lof M, Olausson H, Bostrom K, Janerot-Sjoberg B, Sohlstrom A & Forsum E (2005). Changes in basal metabolic rate during pregnancy in relation to changes in body weight and composition, cardiac output, insulin-like growth factor I, and thyroid hormones and in relation to fetal growth. *Am J Clin Nutr* 81, 678–685.
- 24) Hiden U, Maier A, Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Wadsack C, Lang I, Dohr G & Desoye G (2006). Insulin control of placental gene expression shifts from mother to foetus over the course of pregnancy. *Diabetologia* 49, 123–131.
- 25) Fang J, Furesz TC, Lurent RS, Smith CH & Fant ME (1997). Spatial polarization of insulin-like growth factor receptors on the human syncytiotrophoblast. *Pediatr Res* 41, 258–265.
- 26) Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Pringle KG, Robinson JS & Roberts CT (2006). Maternal insulin-like growth factors-I and -II act via different pathways to promote fetal growth. *Endocrinology* 147, 3344–3355.
- 27) Bhaumick B, George D, Bala RM: Potentiation of epidermal growth factor-induced differentiation of cultured human placental cells by insulin-like growth factor-I. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1005–1011.
- 28) Milio LA, Hu J, Douglas GC: Binding of insulin-like growth factor I to human trophoblast cells during differentiation in vitro. *Placenta* 1994; 15: 641–651.
- 29) Lacey H, Haigh T, Westwood M, Aplin JD: Mesenchymally-derived insulin-like growth factor 1 provides a paracrine stimulus for trophoblast migration. *BMC Dev Biol* 2002; 2: 5.

- 30) Aplin JD, Lacey H, Haigh T, Jones CJ, Chen CP, Westwood M: Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 199–202.
- 31) Miller AG, Aplin JD, Westwood M: Adenovirally mediated expression of insulin-like growth factors enhances the function of first trimester placental fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 379–385.
- 32) Smith S, Francis R, Guilbert L, Baker PN: Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. *Placenta* 2002; 23: 322–330.
- 33) Ferguson S, Rogers M, Chung T, Chard T, Wang HS, Owens P, Moyse K. 1994 IGF-I and IGFBP-I in pregnancy are related to glucose metabolism and fetal growth. *Proc of the 3rd Int Symp on Insulin-Like Growth Factors. Growth Regul.* 4(Suppl 1):112.
- 34) Maruo T, Murata K, Matsuo H, Samoto T & Mochizuki M (1995). Insulin-like growth factor-I as a local regulator of proliferation and differentiated function of the human trophoblast in early pregnancy. *Early Pregnancy* 1, 54–61.
- 35) Siler-Khodr TM, Forman J & Sorem KA (1995). Dose-related effect of IGF-I on placental prostanoid release. *Prostaglandins* 49, 1–14.
- 36) Mirlesse et al 1993, Placental Growth Hormone levels in Normal Pregnancy and in Pregnancies with Intrauterine Growth Retardation, *Pediatric Research* 1993, vol 34(4), 439-442.
- 37) Schiessl B, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Gutt B, Kirk SE, Oberhoffer R, Friese K. Role of placental growth hormone in the alteration of maternal arterial resistance in pregnancy. *J Reprod Med.* 2007 Apr;52(4):313-6.
- 38) Verkauskiene et al 2007, Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age, *European Journal of Endocrinology* (2007), vol 157, pp 605–612.
- 39) Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation, a review. *Horm Res* 42:140–144, 1994.
- 40) Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 273: 6074–6079, 1998.
- 41) Lawrence A, Wetterau, Michael G. Moore, Kuk-Wah Lee, Melanie L. Shim, and Pinchas Cohen, Novel Aspects of the Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (Minireview), *Molecular Genetics and Metabolism* 68, 161–181 (1999)
- 42) Boisclair et al 2001, The acid-labile subunit (ALS) of the 150 kDa IGF-binding

protein complex: an important but forgotten component of the circulating IGF system (review), *Journal of Endocrinology* (2001), vol 170, pp 63–70.

43) Katz LEL, Rosenfeld RG, Cohen P. Clinical significance of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). *Endocrinologist* 1995, vol 5, pp 36–43.

44) Underwood LE, Thissen JP, Lemozy S, Ketelslegers JM, Clemmons DR. Hormonal and nutritional regulation of IGF-I and its binding proteins. *Hormone Res* 42:145–151, 1994.

45) Smith WJ, Underwood LE, Clemmons DR. Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 80:443–449, 1995.

46) J. Yu, M. Iwashita, Y. Kudo, g. Takeda, Phosphorylated insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits while non-phosphorylated IGFBP-1 stimulates IGF-I-induced amino acid uptake by cultured trophoblast cells, *Growth Hormone and IGF Research* 1998, vol 8, pp 65-70.

47) Irving JA, Lala PK: Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res* 1995; 217: 419–427.

48) Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK: Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res* 1998; 244: 147–156.

49) Irwin JC, Giudice LC: Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 21-31.

50) Westwood M, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A: The phosphorylation pattern of insulin-like growth factor-binding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1735–1741.

51) Lassarre C, Hardouin S, Dattos F, Forestier F, Frankenne F & Binoux M (1991) Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatric Research*, 29, 219–225.

52) Chard T (1994) Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal human fetal growth. *Growth Regulation*, 4, 91–100.

53) Ong K, Kratzsch J, Keiss W, Costello M, Scott C & Dunger D (2000). Size at birth and cord blood levels of insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3 and the soluble IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in term human infants. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85, 4266–4269.

54) Carole S. Watson, Peter Bialek, Makoto Anzo, Javad Khosravi, Siu-Pok Yee, and Victor K. M. Han, Elevated Circulating Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 Is Sufficient to Cause Fetal Growth Restriction, *Endocrinology* 2006, vol 147, pp 1175–1186

55) Ruoslati E, Pierschlaber MD. New perspectives in cell adhesions: RGD and integrins. *Science* 238:491–497, 1987.

56) Murphy LJ, Rajkumar K, Molnar P. Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-3 overexpression in transgenic mice. *Prog Growth Factor Res* 6:425–432.

57) Li W, Fawcett J, Widmer HR, Fielder PJ, Rabkin R, Keller GA. Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in opossum kidney cells. *Endocrinology* 138:1763–1766.

58) Schedlich LJ, Young TF, Firth SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998, vol 273:18347–18352.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ (IUGR)

1) Εισαγωγή

Η περιγραφή της σωματικής ανάπτυξης ενός εμβρύου είναι ζωτικής σημασίας, τόσο για την ενδομήτριο, όσο και την εξωμήτριο ζωή. Ένα πλήρως σωματικά ανεπτυγμένο έμβρυο έχει όλες τις απαιτούμενες δυνάμεις και ενεργειακά αποθέματα για να ανταπεξέλθει επιτυχώς στην επίπονη διαδικασία του τοκετού και να αντιπαρέλθει τις βιολογικές δυσκολίες που επιφυλάσσουν τα πρώτα 24ωρα της εξωμήτριας ζωής (προσαρμογή αναπνευστικού - καρδιαγγειακού συστήματος, θερμορυθμιστικές και λοιπές μεταβολικές ανάγκες). Αντίθετα, ένα έμβρυο μειονεκτικής ενδομήτριας ανάπτυξης διαθέτει μειωμένα ενεργειακά αποθέματα κατά τον τοκετό, ενώ επιπλέον εκδηλώνει αυξημένες ενεργειακές και μεταβολικές ανάγκες περιγεννητικά, λόγω της ανωριμότητας των βιολογικών του συστημάτων. Επιπρόσθετα, το υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης νεογνό κινδυνεύει από απώτερες επιπλοκές κατά την ενήλικο ζωή, κυρίως την πρόωμη εμφάνιση εκφυλιστικών νοσημάτων. Για όλους τους παραπάνω λόγους, είναι βασικό να υπάρχει έγκαιρη και - το κυριότερο - ορθά τεκμηριωμένη περιγεννητική διάγνωση της παθολογικής αυτής κατάστασης, που πλέον είναι ευρύτερα γνωστή ως “Ενδομήτρια Υπολειπόμενη Ανάπτυξη” (IntraUterine Growth Retardation, IUGR). Γίνεται εμφανές ότι ο χαρακτηρισμός ενός εμβρύου ως IUGR το “προικίζει αρνητικά” τόσο για το άμεσο όσο και για το απώτερο μέλλον του, γι’ αυτό και πρέπει να αποδίδεται με φειδώ κατά τον προγεννητικό έλεγχο, αλλά και έγκαιρα και επιθετικά όταν και όπου πραγματικά χρειάζεται.

2) Ορισμός Ενδομήτριας Υπολειπόμενης Ανάπτυξης (IUGR) - Συναφείς έννοιες

Γενικά, με τον όρο “υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη” (IntraUterine Growth Retardation, IUGR, ή Fetal Growth Restriction, FGR, οι δυο όροι θεωρούνται πλήρως ισοδύναμοι και θα χρησιμοποιούνται εφ’ εξής ισότιμα στο παρόν σύγγραμμα) ορίζεται η αδυναμία του εμβρύου/νεογνού να επιτύχει ενδομήτρια τη γενετικά καθορισμένη δυνατότητα ανάπτυξής του (1,2). Πρέπει να γίνει σαφές ότι αξιολογείται περισσότερο η αδυναμία του εμβρύου να αναπτυχθεί με συνέπεια παράλληλα σε μια δεδομένη εκατοστιαία θέση παρά το απόλυτο βάρος/μέγεθος αυτού (3,4).

Κατά περίπτωση στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούνται διάφοροι εναλλακτικοί όροι όπως “χαμηλό βάρος γέννησης” (Low Birth Weight, LBW) ή “νεογνό μικρό για την ηλικία κύησης” (Small for Gestational Age, SGA). Αν και υπάρχει ευρεία αλληλοεπικάλυψη μεταξύ τους, πρέπει να

τονισθεί ότι οι όροι αυτοί δεν είναι συνώνυμοι με την IUGR. Ως χαμηλό βάρος γέννησης ορίζεται το βάρος γέννησης μικρότερο από 2500 γραμμάρια, ανεξάρτητα από την ηλικία κύησης (5,6). Οι Lubchenco και συνεργάτες (5,7) κατέταξαν τα χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά σε τρεις κατηγορίες: α) Πρόωρα AGA (Appropriate for Gestational Age, AGA), δηλαδή νεογνά που γεννήθηκαν πριν τις 37 εβδομάδες με βάρος κατάλληλο για την ηλικία της κύησης, β) Πρόωρα SGA. Η πλειονότητα των παιδιών αυτής της ομάδας θεωρούνται αληθή IUGR, γ) Τελειόμηνα SGA (μικρό βάρος γέννησης μετά τις 37 εβδομάδες). Ως SGA χαρακτηρίζεται το έμβρυο/νεογνό που οι σωματομετρικοί του παράμετροι (κυρίως το βάρος) είναι μικρότεροι από μια δεδομένη εκατοστιαία θέση (συνήθως την 10^η ΕΘ) ή το έμβρυο/νεογνό του οποίου το βάρος είναι χαμηλότερο κατά δυο σταθερές αποκλίσεις (-2 SD) από μια αναμενόμενη τιμή για την ηλικία της κύησης (8). Ωστόσο, με το χαρακτηρισμό SGA είναι δύσκολο κανείς να διευκρινίσει/ διαγνώσει ανάμεσα σε νεογνά που έχουν υποστεί υπολειπόμενη ανάπτυξη ενδομητρίως και σε εκείνα με ιδιοσυστασιακά χαμηλό ανάστημα - μικρό μέγεθος σώματος (3,8).

Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι δεν παρουσιάζουν όλα τα έμβρυα με SGA ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης, ενώ η πλειονότητα των IUGR νεογνών είναι και SGA. Η ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης ουσιαστικά αναφέρεται στην ύπαρξη ενός ενδομήτριου γεγονότος που, προκαλώντας εμβρυϊκή δυσπραγία- εμβρυϊκό stress, διέκοψε τη φυσιολογική πορεία ανάπτυξης του εμβρύου (in utero insult) (2).

3) Παράγοντες κινδύνου για χαμηλό βάρος κατά τη γέννηση

Κατά καιρούς έχει αναγνωρισθεί ένα πλήθος παραγόντων που θεωρούνται ότι προδιαθέτουν - ευνοούν τη γέννηση παιδιών χαμηλού βάρους. Στο σχήμα 1 παρατίθενται οι συχνότεροι από αυτούς. Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του σχήματος, το θετικό μαιευτικό ιστορικό (προηγούμενη SGA γέννηση), το χαμηλό κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο, η μαύρη φυλή, οι ακραίες μητρικές ηλικίες (<16 και >35 ετών) (9), οι ενδομήτριες λοιμώξεις και η πολλαπλή κύηση αποτελούν ενδεικτικούς προδιαθεσικούς παράγοντες για γέννηση χαμηλού βάρους νεογνού. Παράλληλα, η παρουσία χρόνιων νοσημάτων στη μέλλουσα μητέρα, ειδικά από το καρδιαγγειακό σύστημα (νεφρική νόσος, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, προϋπάρχουσα υπέρταση ή υπέρταση της κύησης/ προεκλαμψία) και η κατάχρηση αλκοόλ και ουσιών, όπως και το κάπνισμα, αυξάνουν την πιθανότητα μιας SGA εγκυμοσύνης (10).

African American race
Low socioeconomic status
Low maternal weight for height
Low maternal weight at her birth
Maternal short stature
Previous infant of low birthweight
Poor nutrition in the mother before and during pregnancy
Maternal age (less than 16 or over 35)
Uterine or cervical anomalies
Multiple gestation
Preeclampsia or maternal hypertension
Chronic disease in the mother
Intrauterine infection
Placental insufficiency; umbilical cord abnormalities
Heavy physical work during pregnancy
Altitude
Smoking, alcohol or drug usage
Short interpregnancy interval

Σχήμα 1.

Προδιαθεσικοί παράγοντες για SGA - χαμηλό βάρος γέννησης. Από τη δημοσίευση του A. Rosenberg “ The IUGR Newborn, Seminars in Perinatology 2008, vol 32, pp 219-224”

4) Καμπύλες Ενδομήτριας Ανάπτυξης - η σημασία της Εκατοστιαίας Θέσης (ΕΘ)

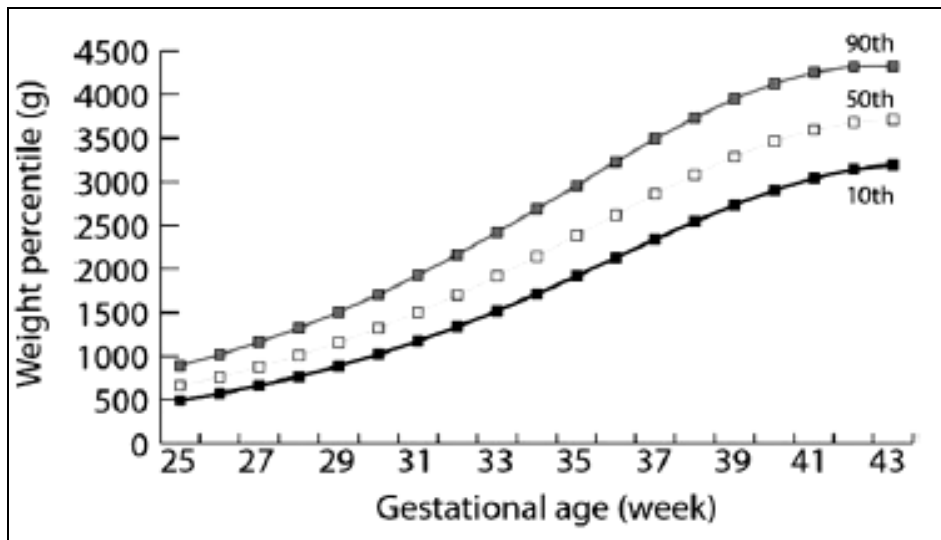
Οι καμπύλες ανάπτυξης ορίζουν την στατιστικά υπολογιζόμενη αναμενόμενη σωματική ανάπτυξη ενός “μέσου” πληθυσμού παιδιών ίδιας εθνικότητας για μια δεδομένη ηλικία κύησης (11). Η χρησιμότητά τους έγκειται στη δυνατότητα που παρέχουν για υπολογισμό της εκατοστιαίας θέσης (ΕΘ) διαφόρων σωματομετρικών χαρακτηριστικών, με κυριότερο το βάρος του σώματος. Αναφορικά με το βάρος του σώματος, οι μελέτες των Manning και Usher έδειξαν ότι η τοποθέτηση ενός εμβρύου χαμηλότερα από μια δεδομένη ΕΘ που έχει οριστεί ως “κατώφλι” (cut-off value) για το βάρος σώματος μπορεί να συσχετισθεί με ανάλογη βαρύτητα περιγεννητικής πρόγνωσης (12,13,14). Μελετώντας μια ομάδα 1560 SGA νεογνών, οι Manning και συνεργάτες (13) έδειξαν ότι νεογνά βάρους γέννησης 1500-2500 γραμμάρια (δηλαδή <10^η ΕΘ) είχαν 5%-30% αυξημένη πιθανότητα φτωχού περιγεννητικού αποτελέσματος σε σχέση με ομάδα ελέγχου (βάρος γέννησης > 2500 γραμμάρια, 10^η ΕΘ<ΒΓ<90^η ΕΘ). Οι μελετητές ανακάλυψαν ότι μετατοπίζοντας την cut-off τιμή κάτω από την 5^η ΕΘ, εντοπιζόταν η μέγιστη πιθανότητα για εκδήλωση σοβαρής ενδομήτριας δυσπραγίας. Οι Scott, Usher και συνεργάτες με τη σειρά τους παρατήρησαν ότι, για βάρος γέννησης μεταξύ 3^{ης} και 10^{ης} ΕΘ, η νεογνική νοσηρότητα οκταπλασιαζόταν. Για τιμές βάρους σώματος μικρότερες της 3^{ης} ΕΘ η νεογνική νοσηρότητα παρουσίαζε εικοσαπλάσια αύξηση, οδηγώντας τους μελετητές να προσδιορίσουν την 3^η ΕΘ ως cut-off τιμή για αληθή IUGR (12). Η ανάγκη για

ομοφωνία οδήγησε το 2000 το Αμερικάνικο Κολλέγιο Γυναικολόγων-Μαιευτήρων (ACOG) να ορίσει για το βάρος σώματος για μια δεδομένη ηλικία κύησης την 10^η ΕΘ ως cut-off εκατοστιαία θέση, κάτω από την οποία υπάρχει πιθανότητα σοβαρής/ αληθούς ενδομήτριας δυσπραγίας (6). Συνεπώς, ο επί του παρόντος επίσημος ορισμός της ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης (IUGR) είναι “έμβρυο με βάρος σώματος εβρισκόμενο χαμηλότερα από την 10^η ΕΘ για το φύλο και την ηλικία της κύησης” (6).

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι η 10^η ΕΘ σαν cut-off τιμή εμπερικλείει ένα σημαντικό αριθμό (περίπου 70%) εμβρύων που θα είναι ιδιοσυστασιακά, όχι παθολογικά μικρά, δηλαδή παιδιά που θα εμπίπτουν στην κατηγορία SGA (13). Η επιλογή της 10^{ης} ΕΘ φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με την επιθυμία του ACOG concensus group να χάσει όσο το δυνατόν λιγότερα αληθή IUGR έμβρυα, που ενδεχομένως να έχουν ΒΣ>10^η ΕΘ (6,15,16), παρά με προσπάθεια να περιορίσει τα false-positive αποτελέσματα.

Επίσης, αυτό είναι το κατάλληλο σημείο για να τονισθεί η αναγκαιότητα για δημιουργία εξατομικευμένων καμπύλων εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η σωματική ανάπτυξη καθορίζεται σε μέγιστο βαθμό από το γενετικό υπόβαθρο κάθε εμβρύου, το οποίο προφανώς ποικίλει. Οι γενετικές καταβολές μεταφράζονται σε παράγοντες όπως το φύλο του εμβρύου, η εθνικότητα και ο σωματότυπος (βάρος, ύψος) των γονέων. Επίσης, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και η κατάσταση τοκίας της μητέρας, αν δηλαδή το παρόν κύημα είναι το πρώτο, δεύτερο κτλ παιδί που κυοφορεί η συγκεκριμένη γυναίκα. Προκειμένου όλες αυτές οι ανεξάρτητες μεταβλητές να ληφθούν υπόψη στον υπολογισμό του βάρους σώματος, έχει δημιουργηθεί ένα λογισμικό υπολογιστή (17), διαθέσιμο ελεύθερα στο διαδίκτυο. Πρόκειται για τον ιστοτόπο www.gestation.net (18), όπου είναι δυνατός ο υπολογισμός της ακριβούς ΕΘ για το βάρος σώματος για μια δεδομένη ηλικία κύησης.

Στο σχήμα 2 παραθέτονται ενδεικτικά καμπύλες ανάπτυξης που αφορούν την 10^η, την 50^η και την 90^η ΕΘ.



Σχήμα 2.

Καμπύλες ανάπτυξης για την 10η, την 50η και την 90η ΕΘ. Από τη δημοσίευση των Doubilet και συνεργατών “Improved birth weight table for neonates developed from gestations dated by early ultrasonography. J Ultrasound Med 16:241-249, 1997”

5) Κλινική ταξινόμηση IUGR

Η IUGR υποδιαιρείται σε δυο κατηγορίες, σε συμμετρική και ασύμμετρη (4). Κριτήριο διάκρισης αποτελεί ο λόγος HC/AC (περίμετρος κεφαλής προς περίμετρο θώρακα) (19). Στη συμμετρική ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης το έμβρυο είναι συμμετρικά μικρό (κεφάλι, μήκος σώματος), εν αντιθέσει με την ασύμμετρη μορφή όπου διατηρείται φυσιολογικό (δηλαδή μεγαλύτερο) μέγεθος κεφαλής. Η διάκριση αυτή σχετίζεται σαφώς με την αιτιολογία και τη χρονική έναρξη κατά περίπτωση. Η συμμετρική μορφή IUGR παρατηρείται νωρίς κατά την κύηση και οφείλεται συνήθως σε έκθεση σε περιβαλλοντικούς τοξικούς/χυμικούς παράγοντες, σε ιογενείς λοιμώξεις ή σε ενδογενή αδυναμία ανάπτυξης οφειλόμενη σε γενετικά αίτια (ανευπλοειδίες, διαταραχές στη γενετική αποτύπωση κα) (1). Η συμμετρική IUGR σχετίζεται με καταστάσεις που ουσιαστικά οδηγούν σε ελάττωση του απόλυτου αριθμού των εμβρυϊκών κυττάρων (4). Η ασύμμετρη μορφή IUGR είναι πιο συχνή (75% όλων των IUGR περιπτώσεων) και οφείλεται σε μητροπλακουντιακή ανεπάρκεια. Εδώ παρατηρείται το φαινόμενο της επιλεκτικής προσφοράς αίματος στον εγκέφαλο έναντι των υπολοίπων ιστών (φαινόμενο “διάσωσης του εγκεφάλου”). Τα νεογνά με ασύμμετρη IUGR χαρακτηρίζονται από μικρό μέγεθος ήπατος (λόγω ελαττωμένων αποθεμάτων γλυκογόνου), μειωμένη μάζα σκελετικών μυών, μειωμένο υποδόριο λίπος και

περίμετρο θώρακα, αλλά με φυσιολογική περίμετρο κεφαλής (4). Η ασύμμετρη IUGR σχετίζεται περισσότερο με ελλειμματική ανάπτυξη των υπαρχόντων κυττάρων/ιστών που έχουν ήδη διαμορφωθεί στο έμβρυο κατά το χρόνο της προσβολής, παρά με ελάττωση του αριθμού τους.

Οι παραπάνω χαρακτηρισμοί είναι κυρίως περιγραφικοί και αποσκοπούν στον προσδιορισμό της αιτιολογίας, άρα και του τρόπου αντιμετώπισης, της υπολειπόμενης ανάπτυξης. Η κλινική εμπειρία έχει αποδείξει ευρεία αλληλοεπικάλυψη των δυο οντοτήτων (συμμετρική και ασύμμετρη μορφή). Σημαντικότερο στοιχείο θεωρείται η ηλικία της κύησης οπότε επιδρά ο βλαπτικός παράγοντας, παρά το είδος του παράγοντα αυτού καθ' εαυτού (4).

6) Διάγνωση IUGR - Υπολογισμός της Ηλικίας Κύησης (HK)

Πρωταρχικό στάδιο για τη διάγνωση μιας IUGR κύησης είναι ο ακριβής υπολογισμός της ηλικίας κύησης. Αυτό επιτυγχάνεται τόσο ημερολογιακά (ημερολογιακή HK) όσο και υπερηχογραφικά (υπερηχογραφική HK) (4). Η χρήση και μόνο της ημερομηνίας τελευταίας εμμήνου ρύσης (TEP) για τον προσδιορισμό της ηλικίας κύησης θεωρείται αναξιόπιστη μέθοδος. Ακόμα και όταν η γυναίκα είναι απολύτως βέβαιη για την ημερομηνία TEP, υπάρχει το ενδεχόμενο καθυστερημένης ωορρηξίας. Η συνδυασμένη χρήση των δυο άνωθεν στοιχείων εξασφαλίζει περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα (20). Σε κάθε τρίμηνο της κύησης χρησιμοποιούνται διαφορετικές υπερηχογραφικές παράμετροι. Κατά το 1^ο τρίμηνο της κύησης, το κεφαλουραίο μήκος του εμβρύου (crown rump length) αποτελεί αξιόπιστο δείκτη και όταν υπάρχει απόκλιση περί τις 7 ημέρες ανάμεσα σε TEP και υπερηχογραφικά ευρήματα θα πρέπει να αποτελεί το βασικό κριτήριο υπολογισμού της ηλικίας της κύησης σε αυτό το στάδιο της εγκυμοσύνης (21). Κατά το 2^ο τρίμηνο χρησιμοποιούνται τα υπερηχογραφικά κριτήρια του Hadlock, τα οποία περιλαμβάνουν το λόγο περίμετρο κεφαλής/περίμετρο θώρακα και συνυπολογισμό του μήκους του μηριαίου οστού (22). Τα κριτήρια αυτά βοηθούν στον ακριβή υπολογισμό του βάρους του εμβρύου και στον προσδιορισμό της αναμενόμενης ημερομηνίας τοκετού με απόκλιση περίπου 10 ημερών (23).

7) Συνέπειες υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης

Οι συνέπειες της ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης είναι σημαντικές για το έμβρυο/νεογνό τόσο άμεσα, όσο και αργότερα.

7,1) Άμεσες συνέπειες

Κατά την περιγεννητική περίοδο τα IUGR νεογνά διατρέχουν 12 φορές υψηλότερο κίνδυνο θανάτου (24,25), κινδυνεύοντας από υποθερμία, υπογλυκαιμία, αναπνευστική ανεπάρκεια/ πνευμονική αιμορραγία και εγκεφαλοπάθεια (σχήμα 3). Ένα IUGR έμβρυο, λόγω ενδομήτριας δυσπραγίας - εμβρυϊκού stress κινδυνεύει από πρόωρο τοκετό (26). Σχετικά συχνή στα παιδιά αυτά είναι η εμφάνιση εγκεφαλικής παράλυσης (27). Έχει βρεθεί ότι η προωρότητα αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ελλειμματική ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος και συνεπώς μειωμένη πνευματική απόδοση και γνωσιακή λειτουργία (χαμηλότερος δείκτης IQ) στα παιδιά αυτά, διαταραχές του λόγου και της ομιλίας και ενίοτε διαταραχές από τη συναισθηματική σφαίρα (27). Λόγω των αυξημένων μεταβολικών αναγκών ένα IUGR νεογνό αντιμετωπίζει αυξημένη πιθανότητα περιγεννητικής νοσηλείας σε μονάδα, με μακροπρόθεσμα πιθανά επακόλουθα την ανάπτυξη βρογχοπνευμονική δυσπλασίας και αμφιβληστροειδοπάθειας της προωρότητας (10,25,26,28,29) (σχήματα 3,4).

Intrauterine fetal demise
Perinatal asphyxia
Meconium aspiration syndrome
Persistent pulmonary hypertension of the newborn
Pulmonary hemorrhage
Hypoglycemia
Hyperglycemia
Polycythemia/hyperviscosity
Temperature instability

Σχήμα 3.

Συνέπειες για το IUGR νεογνό κατά την άμεση περιγεννητική περίοδο. Από τη δημοσίευση του A. Rosenberg “ The IUGR Newborn, Seminars in Perinatology 2008, vol 32, pp 219-224”

Hypoxic–ischemic encephalopathy, seizures
Respiratory distress due to aspiration, secondary surfactant deficiency, pulmonary hemorrhage
Persistent pulmonary hypertension
Hypotension due to myocardial dysfunction
Transient tricuspid valve insufficiency
Anuria or oliguria due to acute tubular necrosis
Feeding intolerance, necrotizing enterocolitis
Elevated aminotransferases due to liver injury
Adrenal insufficiency due to hemorrhage
Disseminated intravascular coagulation

Σχήμα 4.

Κλινικές εκδηλώσεις σχετιζόμενες με περιγεννητική ασφυξία. Από τη δημοσίευση του A. Rosenberg “ The IUGR Newborn, Seminars in Perinatology 2008, vol 32, pp 219-224”

7,2) Απώτερες συνέπειες

Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη προκαλεί αναπρογραμματισμό του εμβρυϊκού ενδοκρινολογικού άξονα (30). Η ενδομήτρια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών (κυρίως κορτιζόλης) λόγω του εμβρυϊκού stress οδηγεί σε πρόιμη μετάβαση στον “ τύπου ενήλικα” προγραμματισμό του κυτταρικού κύκλου (31). Τα παιδιά που έχουν υποστεί ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη διαθέτουν ελατωμένη μάζα λιπώδους ιστού και συνήθως κοντότερο ανάστημα (32). Παρόλο που το ύψος σταδιακά αποκαθίσταται (ένα IUGR παιδί θα φτάσει τα αναμενόμενα για την ηλικία του πρότυπα ύψους μέσα στα δυο πρώτα χρόνια ζωής), ο ενδομήτριος μεταβολικός αναπρογραμματισμός φαίνεται να επιμένει και τα παιδιά αυτά χαρακτηρίζονται από αυξημένα βασικά επίπεδα γλυκόζης (μη αντιρροπούμενη υπεργλυκαιμία), αντιρροπιστική υπερινσουλιαιμία και ταχύ πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων. Συνεπώς, αναπτύσσουν ήδη από την εφηβεία παχυσαρκία, κυρίως σπλαχνικού τύπου και χρόνια αντίσταση στην ινσουλίνη (33). Οι συνέπειες είναι εντονότερες κατά την ενήλικη ζωή. Η χρόνια αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Κατά την ενηλικίωση τα IUGR παιδιά διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κοιλιακής παχυσαρκίας (34) και εκφυλιστικών νοσημάτων. Πρόκειται κυρίως για καρδιαγγειακά νοσήματα (στεφανιαία νόσος, νεφρική νόσος, αρτηριακή υπέρταση) και μεταβολικά νοσήματα (σακχαρώδη διαβήτη τύπου II) στα πλαίσια μεταβολικού συνδρόμου (35-38).

8) Αίτια ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης

Αναφορικά με τα αίτια της ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης, αυτά διακρίνονται σε εμβρυϊκής, μητρικής και πλακουντιακής προέλευσης αίτια (1,39, σχήμα 5). Στα εμβρυϊκής προέλευσης αίτια συγκαταλέγονται γενετικές διαταραχές όπως ανευπλοειδίες και διαταραχές στη γενετική αποτύπωση (κυρίως μονογονεϊκή δισωμία) (40), λοιμώξεις (κυρίως ελονοσία) (41) και πολλαπλές κύησεις (42). Αίτια από την πλευρά της μητέρας αφορούν κατάχρηση ουσιών (κάπνισμα, αλκοόλ, τοξικομανία, καφεΐνη) (43), χρόνιες νόσοι, κακή διατροφή ή κύηση κατά την εφηβεία, κύηση σε μεγάλο υψόμετρο ή τέλος ιδιοσυστασιακά αίτια (μικρή σε μέγεθος μητέρα). Πλακουντιακής αιτιολογίας ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης οφείλεται σε πλακουντιακή ανεπάρκεια ποικίλης αιτιολογίας (έμφρακτα πλακούντα, αποκόλληση, χρόνια αγγειακή νόσος) (42), με την προεκλαμψία να παίζει εδώ καθοριστικό ρόλο (44).

Common causes of growth restriction.	
Maternal factors	<ul style="list-style-type: none"> Undernutrition⁹¹ Maternal low birthweight⁹² Low maternal weight gain⁹² Maternal age < 16⁹³ Low socio-economic status Parity⁹² Medical disorders⁴ Chronic Hypertension Systemic Lupus Erythematosus Pre-eclampsia Diabetes with vasculopathy Renal disease
Environmental factors	<ul style="list-style-type: none"> Drug use- smoking,⁹³ alcohol, illicit drugs High altitude Irradiation
Placental factors⁴	<ul style="list-style-type: none"> Abnormal placentation Chronic abruption, Infarcts, focal lesions Chronic inflammatory conditions (villitis) Single UA, Velamentous cord insertion, Placental haemangioma Confined placental mosaicism
Fetal factors⁴	<ul style="list-style-type: none"> Chromosomal anomalies Genetic conditions Congenital malformations Intrauterine infections Multiple pregnancy

Σχήμα 5.

Συνήθη αίτια υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης. Από τη δημοσίευση των Sankaran και συνεργατών “ Aetiology and Pathogenesis of IUGR, Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 2009, vol 23, pp 765–777”.

9) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

1) David Monk, Gudrun E. Moore. Intrauterine growth restriction-genetic causes and consequences. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine (2004) 9, 371-378

- 2) Zivanit Ergaz, Meytal Avgil, Asher Ornoy. Intrauterine growth restriction – etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models? *Reproductive Toxicology* 2005;20:301-322
- 3) Dev Maulik, Fetal Growth Compromise: Definitions, Standards, and Classification. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, June 2006, vol 49(2), pp 214-218
- 4) Elizabeth Platz and Roger Newman, Diagnosis of IUGR: Traditional Biometry, *Semin Perinatol* 2008, vol 32, pp 140-147
- 5) Battaglia FC, Lubchenco LO: A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr* 71:159-163, 1967
- 6) American College of Obstetricians and Gynecologists. Intrauterine growth restriction. ACOG Practice Bulletin no. 12. Washington DC, American College of Obstetricians and Gynecologists, 2000
- 7) Dobson PC, Abell DA, Beischer NA: Mortality and morbidity of fetal growth retardation. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 21:69-72, 1981
- 8) Soothill PW, Bobrow CS, Holmes R: Small for gestational age is not a diagnosis (Editorial). *Ultrasound Obstet Gynecol* 13:225-228, 1999
- 9) Christine V Newburn-Cook, Judee E Onyskiw, Is Older Maternal Age a Risk Factor for Preterm Birth and Fetal Growth Restriction? A Systematic Review, *Health Care for Women International* 2005, vol 26(9), pp 852 -875
- 10) Adam Rosenberg, The IUGR Newborn, *Semin Perinatol* 2008, vol 32, pp 219-224
- 11) Gardosi J, New definition of small for gestational age based on fetal growth potential. *Horm Res.* 2006; 65 Suppl 3:15-8
- 12) Scott KE, Usher R: Fetal malnutrition: its incidence, causes and effect. *Am J Obstet Gynecol* 94:951-963, 1966
- 13) Manning FA, Hill LM, Platt LD: Qualitative amniotic fluid volume determination by ultrasound: antepartum detection of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 193:254-258, 1981
- 14) Sheree L. Boulet, Greg R. Alexander, Hamisu M. Salihu, Russell S. Kirby, Waldemar A. Carlo, Fetal growth risk curves: Defining levels of fetal growth restriction by neonatal death risk, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006, vol 195, pp 1571–7
- 15) Usher R, McLean F: Intrauterine growth and live-born caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr* 74:901-910, 1969

- 16) Seeds JW, Peng T: Impaired fetal growth and risk of fetal death: is the tenth percentile the appropriate standard? *Am J Obstet Gynecol* 178: 658-661, 1998
- 17) F. Figueras and J. Gardosi, Should We Customize Fetal Growth Standards? *Fetal Diagn Ther* 2009; 25:297–303
- 18) J. Gardosi, A. Francis, Software program for the calculation of customized birth weight percentiles8 Version 6.2, 2000-2007, , 15 April, 2010, Available at: <http://www.gestation.net>. Retrieved.
- 19) Amy G. Gottlieb and Henry L. Galan, Nontraditional Sonographic Pearls in Estimating Gestational Age, *Seminars in Perinatology*, vol 32, No 3, June 2008, pp 154-160
- 20) Campbell S, Thoms A: Ultrasound measurement of the fetal-to-abdomen circumference ratio in the assessment of growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 84:165-174, 1977
- 21) Neilson JP, Manjana SP, Whitfield CR: Screening for small for dates fetuses: a controlled trial. *Br Med J* 289:179-182, 1984
- 22) Hadlock FP, Harrist RB, Carpenter RJ, et al: Sonographic estimation of fetal weight. *Radiology* 150:535-540, 1984
- 23) Creasy RK, Resnik R: Intrauterine growth restriction, in Creasy RK, Resnik R (eds): *Maternal–Fetal Medicine* (ed 5). Philadelphia, PA, WB Saunders, 2004, pp 495-508
- 24) Wennergren M, Wennergren G, Vilbergasson G: Obstetric characteristics and neonatal performance in a four-year small for gestational age population. *Obstet Gynecol* 72:615-620, 1988
- 25) McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, et al: Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med* 340: 1234-1238, 1999
- 26) Susan W. Aucott, Pamela K. Donohue, Frances J. Northington, Increased Morbidity in Severe Early Intrauterine Growth Restriction, *Journal of Perinatology* (2004) 24, 435–440.
- 27) H.M.A. de Bie, K.J. Oostrom, H.A. Delemarre-van de Waal, Brain Development, Intelligence and Cognitive Outcome in Children Born Small for Gestational Age, *Horm Res Paediatr* 2010, vol 73, pp 6–14
- 28) Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, et al: Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction: the Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 182:198-206, 2000
- 29) Regev RH, Lusky A, Dolfin T, et al: Excess mortality and morbidity among small-for-gestational-age premature infants: a population based study. *J Pediatr* 143:186-191, 2003
- 30) Christina Kanaka-Gantenbein, George Mastorakos and George Chrousos, Endocrine-Related Causes and Consequences of Intrauterine Growth Retardation, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 997: 150–157 (2003).

- 31) Langford K, Blum W, Nicolaides K, Jones J, McGregor A, Miell G, The pathophysiology of the insulin-like growth factor axis in fetal growth failure: a basis for programming by under nutrition? *European Journal of Clinical Investigation* (1994), vol 24, pp 851-856
- 32) Pallotto Eugenia and Kilbride Howard W, Perinatal Outcome and Later Implications of Intrauterine Growth Restriction, *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2006, vol 49, No 2, pp 257-269
- 33) Morrison et al 2009, Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity, *Pediatr Nephrol*, vol 25(4), pp 669-77, April 2010.
- 34) Rebecca Simmons, Perinatal programming of obesity, *Semin Perinatol* 2008, vol 32, pp 371-374
- 35) Keith M Godfrey and David JP Barker, Fetal nutrition and adult disease, *Am J Clin Nutr* 2000; 71(suppl):1344S–52S.
- 36) Armitage et al 2004, Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 561.2 (2004), pp 355-377
- 37) David J P Barker, Adult Consequences of Fetal Growth Restriction, *Clinical Obstetrics and Gynecology* 2006, vol 49, No 2, pp 270-283
- 38) Jonathan C. K. Wells, The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect, *Biol. Rev.* (2007), 82, pp. 143–172.
- 39) Srividhya Sankaran, Aetiology and Pathogenesis of IUGR, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 23 (2009) 765–777
- 40) McMinn et al 2006, Unbalanced Placental Expression of Imprinted Genes in Human Intrauterine Growth Restriction, *Placenta* (2006), vol 27, e540-e549
- 41) Umbers et al 2011, Placental malaria-associated inflammation disturbs the insulin-like growth factor axis of fetal growth regulation, *J Infect Dis.* 2011, vol 203(4), pp 561-9.
- 42) Baschat AA. Fetal growth disorders. In James DK, Steer PJ & Weiner CP (eds.). *High risk pregnancy management options*. 3rd edn. Pennsylvania: Saunders Elsevier, 2006, pp. 240–271.
- 43) CARE Study Group 2008, Maternal caffeine intake during pregnancy and risk of fetal growth restriction: a large prospective observational study, *BMJ* 2008;337:a2332
- 44) Roberta B. Ness and Baha M. Sibai, Shared and disparate components of the pathophysiology of fetal growth restriction and preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2006), vol 195, pp 40–9.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° : ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ (PE)

1) Εισαγωγή

Η προεκλαμψία αποτελεί μια από τις κυριότερες μαιευτικές επιπλοκές της κύησης, με συχνότητα εμφάνισης 2-7% στις πρωτότοκες εγκύους. Θεωρείται μια απειλητική για τη ζωή πολυσυστηματική διαταραχή και ένα από τα συχνότερα αίτια μητρικής θνητότητας και νοσηρότητας (1). Ταυτόχρονα, αποτελεί σημαντικό αίτιο υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης του εμβρύου, ενδομήτριας δυσπραγίας-υποξίας και γέννησης χαμηλού βάρους νεογνού. Παρά τη βελτίωση της περιγεννητικής φροντίδας, ουσιαστικές αλλαγές στη διάγνωση, αντιμετώπιση και πρόγνωση της νόσου δεν έχουν παρατηρηθεί, με τον πρόωρο τοκετό του παιδιού να θεωρείται η μόνη αποτελεσματική θεραπεία της νόσου, γεγονός που σχετίζεται με αυξημένη νεογνική θνητότητα και νοσηρότητα (1,2). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα παιδιά γυναικών που εκδήλωσαν προεκλαμψία με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακών και μεταβολικών νοσημάτων (σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, αρτηριακή υπέρταση, στεφανιαία νόσο και υπερλιπιδαιμία) στη μετέπειτα ζωή τους (3).

Παρ'ότι τα τελευταία χρόνια επικρατεί έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον ως προς τη διερεύνηση της προεκλαμψίας, ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός αυτής παραμένει άγνωστος. Στην εκδήλωση της νόσου σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν τόσο γονιδιακοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες (2,4). Με βάση την παραδοχή ότι η προεκλαμψία εκδηλώνεται αποκλειστικά κατά την κύηση και η λύση της επέρχεται με τον τοκετό και την έξοδο του κνήματος, η αναζήτηση για το γενεσιουργό αίτιο της νόσου στράφηκε από πολύ νωρίς στο έμβρυο και στον πλακούντα. Ο τελευταίος, αποτελεί το όργανο που ανατομικά και λειτουργικά φέρνει σε επαφή και αλληλεπίδραση τα δυο βιολογικά συστήματα (μητέρα και έμβρυο) και προφανώς κατέχει κυρίαρχη θέση στην παθογένεια της νόσου.

Όπως ισχύει και για το έμβρυο, η ανάπτυξη του πλακούντα ρυθμίζεται εξίσου από γενετικούς και επιγενετικούς μηχανισμούς. Αν και στα πρώιμα στάδια της κύησης καθοριστική είναι η επάρκεια ορμονών στο ενδομήτριο προκειμένου να εμφυτευθεί επιτυχώς η βλαστοκύστη, η επακόλουθη ανάπτυξη και διατήρηση του πλακούντα εξαρτάται κυρίως από την επαρκή παρουσία αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών, πεπτίδια που παράγονται τοπικά και δρουν μέσω αυτοκρινών και παρακρινών μηχανισμών. Από την πληθώρα των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται, κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να κατέχει ο ορμονικός άξονας της πλακουντιακής αυξητικής

ορμόνης (Placental Growth Hormone, PGH) και του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα (Insulin-like Growth Factor I, IGF-I) (5). Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα γλυκόζης και θρεπτικών ουσιών στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και ουσιαστικά προσαρμόζουν το μεταβολισμό της μητέρας στην κύηση (6,7).

2) Ορισμός Προεκλαμψίας (PE)

Ως Προεκλαμψία (Preeclampsia, PE) ορίζεται η νόσος που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση υπέρτασης σε συνδυασμό με πρωτεϊνουρία μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης, σε γυναίκες με πρώτινως φυσιολογικές τιμές αρτηριακής πίεσης και πρωτεΐνης ούρων (8). Ως αρτηριακή υπέρταση ορίζεται συστολική αρτηριακή πίεση μεγαλύτερη ή ίση με 140 mmHg ή/και διαστολική αρτηριακή πίεση μεγαλύτερη ή ίση με 90 mmHg, σε δυο ξεχωριστές μετρήσεις με μεσοδιάστημα το λιγότερο 4-6 ωρών μεταξύ τους (1,9). Ως πρωτεϊνουρία ορίζεται η αποβολή πρωτεΐνης σε ούρα 24ωρου μεγαλύτερη ή ίση με 300 mgr (8,9). Αν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ούρα 24ώρου, τότε ως πρωτεϊνουρία μπορεί να αξιολογηθεί η συγκέντρωση πρωτεΐνης ούρων ίση ή μεγαλύτερη με 300 mgr/L ($\geq 1+$ on dipstick) για δυο τυχαίες δειγματοληψίες με μεσοδιάστημα μεταξύ τους το λιγότερο 4-6 ώρες. Προκειμένου να τεθεί η διάγνωση προεκλαμψίας, οι μετρήσεις της αρτηριακής πίεσης και της πρωτεΐνης ούρων δεν πρέπει να απέχουν μεταξύ τους πάνω από 7 ημέρες (9,10). Πρέπει να τονισθεί ότι τα άνωθεν δεν ισχύουν για εγκύους που εκδήλωσαν υπέρταση ή πρωτεϊνουρία πριν την 20^η εβδομάδα της κύησης, δεδομένου ότι στις πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης συντελούνται αλλαγές στο μητρικό αγγειακό σύστημα που μπορούν να δικαιολογήσουν παροδικά φαινόμενα αρτηριακής υπέρτασης και αυξημένης αποβολής πρωτεΐνης στα ούρα (1).

3) Κλινική ταξινόμηση Προεκλαμψίας

Ανάλογα με τη βαρύτητα εκδήλωσης η νόσος χαρακτηρίζεται ήπιας μορφής (ήπια PE) όταν η αρτηριακή πίεση (ΑΠ) δεν ξεπερνάει τα 160 mmHg η συστολική ΑΠ και τα 110 mmHg η διαστολική ΑΠ, καθώς και όταν η πρωτεϊνουρία είναι ήπιου βαθμού, δηλαδή η πρωτεΐνη ούρων 24ώρου δεν ξεπερνάει τα 5 gr/L. Είναι συχνή στο τελευταίο τρίμηνο της κύησης και στο 75% των περιπτώσεων εμφανίζεται κατά τον τοκετό (intrapartum). Σοβαρής μορφής προεκλαμψία (σοβαρή PE) διαγιγνώσκεται όταν η συστολική ΑΠ ξεπεράσει τα 160 mmHg ή/και η διαστολική ΑΠ τα 110 mmHg, ή/και όταν υπάρχει σοβαρού βαθμού πρωτεϊνουρία (πρωτεΐνη ούρων 24ώρου ≥ 5 gr/L ή $\geq 3+$

on dipstick, αν και για διάγνωση σοβαρής πρωτεϊνουρίας καλύτερα να μην χρησιμοποιείται dipstick) (10,11). Επίσης, σοβαρή PE μπορεί να υπάρξει με ήπια υπέρταση και ήπια πρωτεϊνουρία, εφόσον παρατηρηθεί πολυοργανική συμμετοχή στη νόσο. Η σοβαρής μορφής PE συναντάται κυρίως πριν την 34^η εβδομάδα (early-onset PE) και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά μητρικής και εμβρυϊκής θνητότητας και νοσηρότητας (12). Συστήματα που επηρεάζονται είναι συνήθως το αναπνευστικό (με εκδήλωση πνευμονικού οιδήματος), το κεντρικό νευρικό σύστημα [κεφαλαλγία, θόλωση της όρασης, τύφλωση έως και εκδήλωση εκλαμψίας με εγκεφαλοπάθεια και γενικευμένους τονικοκλονικούς σπασμούς-τύπος grand mal, κατάσταση που συνοδεύεται από υψηλό ποσοστό μητρικής και περιγεννητικής νοσηρότητας και θνητότητας (13)], οι νεφροί (ολιγουρία - οξεία νεφρική ανεπάρκεια), το αιμοποιητικό (θρομβοκυτταροπενία) και το ήπαρ. Ειδικότερα στο τελευταίο όργανο, οι εκδηλώσεις μπορεί να κυμαίνονται από πολύ ήπιες (παροδική άνοδος τρανσαμινασών) έως εξαιρετικά σοβαρές (υποκάψιο αιμάτωμα έως ρήξη της κάψας του ήπατος). Ωστόσο, πρωτεϊνουρία είναι δυνατόν να απουσιάζει σε ένα 10-15% των γυναικών που αναπτύσσουν σύνδρομο HELLP (Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets) και στο 38% εκείνων που θα εκδηλώσουν τελικά εκλαμψία (14,15). Σε τέτοιες “άτυπες” περιπτώσεις της νόσου, η διάγνωση βασίζεται στη λοιπή θορυβώδη συμπτωματολογία, περιλαμβάνοντας εμμένουσες νευρολογικές εκδηλώσεις (έντονη κεφαλαλγία, ναυτία-έμετο, τύφλωση, σπασμοί), διαλείπων έως εμμένων πόνος στο επιγάστριο ή/και δεξιό υποχόνδριο, ανωμαλίες θρομβοκυττάρων-υπερπηκτικότητα και διαταραχές των ηπατικών ενζύμων.

4) Παράγοντες Κινδύνου για εκδήλωση PE

Η αναζήτηση παραγόντων κινδύνου που ευνοούν την εκδήλωση της νόσου αποτελεί εξαιρετικής σημασίας βήμα για την έγκαιρη αναγνώριση και αντιμετώπιση μιας προεκλαμπτικής εγκύου. Η νόσος θεωρείται ετερογενής διαταραχή, με την παθογένεσή της να διαφέρει ανάμεσα σε γυναίκες με διαφορετικούς παράγοντες κινδύνου (σχήμα 1). Οι κυριότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες για τη νόσο αφορούν:

1) οικογενή προδιάθεση (μητέρα ή αδελφή με προεκλαμπτική κύηση),

2) προϋπάρχον νόσημα της μητέρας (1) (κυρίως καρδιαγγειακή ή νεφρική νόσος, σακχαρώδης διαβήτης, χρόνια υπέρταση και σε μικρότερο βαθμό ανοσολογικά νοσήματα όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα, συστηματικός ερυθματώδης λύκος, σκληροδερμία ή κάποιου είδους δυσλιπιδαιμία) (16,17)

3) θρομβοφιλία (18),

4) πρωτοτοκία (η προεκλαμψία θεωρείται συνήθως νόσος της πρώτης εγκυμοσύνης) (19,20)

- 5) υποβοηθούμενη αναπαραγωγή (1,21)
- 6) βεβαρυσμένο μαιευτικό ιστορικό (προηγούμενη προεκλαμπτική κύηση)
- 7) πολύδυμη κύηση (20)
- 8) παχυσαρκία (3,4)

Μικρότερης βαρύτητας παράγοντες κινδύνου αποτελούν η παρουσία λοιμώξεων στη μητέρα (κυρίως ο κυτταρομεγαλοϊός, ο HIV και χλαμυδιακές λοιμώξεις) (3), η αλλαγή σεξουαλικού συντρόφου (20), η διάγνωση μύλης κύησης, το κάπνισμα, τα ακραία ηλικιακά όρια της μητέρας (<16 και >35 ετών) (22) και σπανιότερα η εθνικότητα (μαύρη φυλή) (23). Επίσης, πιστεύεται ότι το μικρό χρονικό μεσοδιάστημα μεταξύ των κύσεων ευνοεί την εμφάνιση της νόσου σε μια γυναίκα διαθέτουσα έναν ή περισσότερους από τους παραπάνω επιβαρυντικούς παράγοντες (19). Αντίθετα, προστατευτική επίδραση φαίνεται να ασκούν η μέτρια φυσική άσκηση και η προγεννητική χορήγηση συμπληρωμάτων βιταμινών C και E. Στο σχήμα 1 συνοψίζονται οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση PE.

- Couple-related risk factors**

 - Limited sperm exposure^{35,36}
 - Primipaternity^{6,36,37}
 - Pregnancies after donor insemination, oocyte donation embryo donation^{6,38}
 - Protective effect of partner change in the case of previous pre-eclamptic pregnancy⁶
 - Maternal or pregnancy-related risk factors
 - Extremes of maternal age⁶
 - Multifetal gestation^{13,33,34}
 - Pre-eclampsia in a previous pregnancy^{13,35}
 - Chronic hypertension or renal disease^{13,14}
 - Rheumatic disease³⁹
 - Maternal low birthweight⁶
 - Obesity and insulin resistance⁴⁰⁻⁴²
 - Pregestational diabetes mellitus¹³
 - Maternal infections^{43,44}
 - Pre-existing thrombophilia³⁷⁻³⁹
 - Maternal susceptibility genes⁴⁵⁻⁴⁷
 - Family history of pre-eclampsia⁶
 - Smoking (reduced risk)⁶
 - Hydropic degeneration of placenta⁶

Σχήμα 1.

Παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση προεκλαμψίας. Από τη δημοσίευση των Sibai και συνεργατών “Pre-eclampsia, Lancet 2005; 365: 785–99”

5) Συνέπειες Προεκλαμψίας

5,1) Για το έμβρυο

Όπως προαναφέρθηκε, οι συνέπειες της προεκλαμψίας για το έμβρυο μπορεί να είναι αρκετά σοβαρές (σχήμα 2α). Το εμβρυϊκό σύνδρομο εκ προεκλαμψίας περιλαμβάνει ποκίλες εκδηλώσεις όπως ολιγοάμνιο, εμβρυϊκή υποξία με συνοδά νευρολογικά ελλείματα, εμβρυϊκό ύδρωπα, αποκόλληση του πλακούντα και προωρότητα (12). Ειδικότερα όταν η προεκλαμψία εκδηλώνεται πριν την 34^η εβδομάδα της κύησης (σοβαρή προεκλαμψία), είναι δυνατόν να παρατηρηθεί έως και ενδομήτριος θάνατος του εμβρύου (24). Η πιο συνηθισμένη ωστόσο μορφή εκδήλωσης του εμβρυϊκού προεκλαμπτικού συνδρόμου αφορά την εμφάνιση υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης (3,25), με όλες τις συνέπειες αυτής για τη μετέπειτα ζωή του παιδιού (βλέπε 3^ο κεφάλαιο, “Συνέπειες υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης”).

5,2) Για τη μητέρα

Η έγκυος δεν είναι άμοιρη των συνεπειών - επιπλοκών της προεκλαμψίας, τόσο κατά τη φάση της εγκυμοσύνης, όσο και αργότερα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2β η προεκλαμψία μπορεί να έχει ήπιες σχετικά επιπλοκές για μια κύηση, όπως πρόωρη αποκόλληση του πλακούντα και πρόωρο τοκετό. Μπορεί όμως να οδηγήσει και σε εκσεσημασμένες καταστάσεις όπως σύνδρομο HELLP (θρομβοκυτταροπενία, άνοδος τρανσαμινασών, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη) (26), οξύ πνευμονικό οίδημα, εκλαμψία (κεφαλαλγία, θόλωση όρασης, γενικευμένοι τονικοκλωνικοί σπασμοί τύπου grand mal) (27) και οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Για μια γυναίκα μια προεκλαμπτική κύηση αποτελεί βεβαρυμένο ιστορικό για το υπόλοιπο της ζωής της, προικίζοντάς την με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο για εμφάνιση αγγειακών θρομβοεμβολικών επεισοδίων (28) και στεφανιαίας καρδιακής νόσου (29).

Η έκβαση μιας προεκλαμπτικής εγκυμοσύνης και ο βαθμός που η νόσος θα επηρεάσει μητέρα και έμβρυο εξαρτάται, αφενός από την ηλικία της κύησης και το στάδιο της νόσου κατά το χρόνο της διάγνωσης, αφετέρου από την κατάσταση της υγείας της μητέρας και της παρουσίας ή μη παραγόντων κινδύνου σε αυτήν (1).

Neonatal complications

- Preterm delivery (15–67%)
- Fetal growth restriction (10–25%)
- Hypoxia-neurologic injury (<1%)
- Perinatal death (1–2%)
- Long-term cardiovascular morbidity associated with low birthweight (fetal origin of adult disease)

Σχήμα 2α. Συνέπειες PE στο έμβρυο/νεογνό

Maternal complications

- Abruptio placentae (1–4%)
- Disseminated coagulopathy/HELLP syndrome (10–20%)
- Pulmonary oedema/aspiration (2–5%)
- Acute renal failure (1–5%)
- Eclampsia (<1%)
- Liver failure or haemorrhage (<1%)
- Stroke (rare)
- Death (rare)
- Long-term cardiovascular morbidity

Σχήμα 2β. Συνέπειες PE στη μητέρα

Σχήμα 2.

Συνέπειες προεκλαμψίας για το νεογνό (2α) και τη μητέρα (2β). Από τη δημοσίευση των Sibai και συνεργατών “Pre-eclampsia, Lancet 2005; 365: 785–99”

6) Αίτια - Παθογένεια PE

6,1) Κλινική προσέγγιση - πιθανά παθογενετικά πρότυπα

Όπως προαναφέρθηκε, παρά το έντονο ενδιαφέρον και τις προσπάθειες της τελευταίας 20ετίας ως προς τη διαλεύκανση της παθοφυσιολογίας της νόσου, οι υποκείμενοι μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι. Η αδυναμία επαρκούς διερεύνησης οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στο γεγονός ότι η νόσος σχετίζεται με ατελή διείδυση των τροφοβλαστών και ανώμαλη

πλακουντοποίηση (όπως θα αναφερθεί αναλυτικά παρακάτω), γεγονότα που ξεκινούν και εξελίσσονται κατά το 1^ο τρίμηνο της κύησης. Αντίθετα, η ιατρική παρέμβαση είναι δυνατή κυρίως κατά το 2^ο τρίμηνο, οπότε και εκδηλώνεται κλινικά η νόσος (μητρική συμπτωματολογία). Αποτέλεσμα είναι η αδυναμία μελέτης των πρώιμων παθογενετικών διαδικασιών που οδηγούν στη νόσο (2).

Ποικιλία απόψεων έχουν κατά καιρούς διατυπωθεί. Δυο παθογενετικά πρότυπα έχουν τύχει ευρύτερης αποδοχής, το αγγειακό και το ανοσολογικό (1,2,4). Σύμφωνα με το πρώτο, προδιάθεση της μητέρας για αγγειακή νόσο σε συνδυασμό με πιθανές γενετικές διαταραχές του εμβρύου οδηγούν στην εμφάνιση πλακουντιακής ανεπάρκειας αγγειακής αιτιολογίας με επακόλουθη εμβρυϊκή δυσπραγία. Κατά το ανοσολογικό πρότυπο, η αδυναμία προσαρμογής του ανοσοποιητικού συστήματος της μητέρας στην κύηση (immune misadaptation hypothesis) και ειδικότερα η “αποδοχή” των πατρικής προέλευσης αντιγόνων του εμβρύου έχει σαν συνέπεια την πρόκληση ανοσολογικής φύσεως φλεγμονώδους απάντησης κατά του κυήματος. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι έκθεση στα πατρικά αντιγόνα σε προηγούμενη εγκυμοσύνη έχει προστατευτική επίδραση για τις επόμενες κυήσεις, εφόσον ο πατέρας παραμένει ο ίδιος. Αλλαγή της πατρότητας φαίνεται να οδηγεί σε απώλεια της “προστασίας” και αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης προεκλαμψίας (19,20). Σε αντίστοιχο συμπέρασμα καταλήγουν μελέτες που αφορούν μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Εκτιμήθηκε ότι γυναίκες που υποβλήθηκαν σε σπερματέγχυση έχουν τρεις φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν προεκλαμψία από ότι γυναίκες που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση και εμβρυομεταφορά (21). Φαίνεται ότι η εναπόθεση σπέρματος στο βλεννογόνο της γεννητικής οδού της γυναίκας, πυροδοτεί μια σειρά ανοσολογικών αντιδράσεων. Ως βασικός διαμεσολαβητής πιθανολογείται ο παράγων TGF- β του σπέρματος (30), ο οποίος συντελεί στην αλλαγή του ανοσοφαινότυπου των μητρικών λεμφοκυττάρων από Th1 (T κυτταροτοξικά) σε Th2 (T βοηθητικά), προκειμένου να αναπτυχθεί τοπικά ανοσοανοχή στα αντιγόνα του σπέρματος.

6,2) Παθογενετικός ρόλος του πλακούντα

Από κλινικής άποψης, η προεκλαμψία θεωρείται νόσος που εξελίσσεται σε δύο στάδια (4). Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει το σύνολο των παθοφυσιολογικών διαδικασιών που οδηγούν σε ανώμαλη πλακουντοποίηση και χρονικά αντιστοιχεί στο πρώτο τρίμηνο της κύησης (υποκλινική φάση). Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο που αφορά τη γενικευμένη πλέον ενδοθηλιακή δυσλειτουργία στα αγγεία της μητέρας, οδηγώντας στην εμφάνιση πολυσυστηματικών εκδηλώσεων (κλινική φάση προεκλαμψίας) και κατατάσσεται χρονικά στο 2^ο και 3^ο τρίμηνο. Στον άνθρωπο, η μεγάλη χρονικά ενδομήτρια περίοδος που απαιτείται για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, καθιστά αναγκαία την

παρουσία ενός ιδιαίτερα εκτεταμένου πλακουντιακού δικτύου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, προκειμένου να δημιουργηθεί ο πλακούντας, τα τροφοβλαστικά κύτταρα εισβάλλουν στο ενδοθήλιο των σπειροειδών αρτηριών της μήτρας και το αντικαθιστούν, αλλάζοντας το φαινότυπό τους από επιθηλιακά σε ενδοθηλιακά κύτταρα, φαινόμενο γνωστό ως “ψευδοαγγειογένεση” (31). Ακολούθως διεισδύουν στο μυϊκό χιτώνα αυτών των αρτηριών και τον “καταστρέφουν”, αντικαθιστώντας τοπικά το μυϊκό και ελαστικό ιστό του αγγείου. Εν τέλει ενσωματώνονται στο αγγειακό τοίχωμα. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η πλήρης αναδόμηση του τοιχώματος των σπειροειδών αρτηριών και η μετατροπή τους από αγγεία μικρής χωρητικότητας-μεγάλης αντίστασης (αρχικά), σε αγγεία μεγάλης χωρητικότητας και μειωμένης αντίστασης. Στην προεκλαμψία, παρατηρείται ατελής διείσδυση των τροφοβλαστών στο ενδοθήλιο των σπειροειδών αρτηριών με αποτέλεσμα την ελλειμματική αναδόμησή τους (13). Απότοκος αυτής της διαταραχής είναι η εμφάνιση αγγειοσύσπασης και πλακουντιακής υποάρδευσης (13), με συνέπεια την ανάπτυξη πλακουντιακής ανεπάρκειας και περιβάλλοντος υποξίας για το έμβρυο.

7) Γονίδια και Προεκλαμψία

Στην εκδήλωση προεκλαμψίας σημαντικό ρόλο έχουν τόσο γονιδιακοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια μεγάλες μελέτες σε απογόνους οικογενειών έχουν αποφανθεί υπέρ ενός ισχυρού γενετικού υπόβαθρου της νόσου (32), χωρίς ωστόσο να είναι δυνατόν να καθορισθεί μέχρι στιγμής το ακριβές πρότυπο κληρονομικότητας (inheritance pattern). Επί του παρόντος, το πλέον αποδεκτό γενετικό μοντέλο για την προεκλαμψία υποστηρίζει ότι ο βαθμός επικινδυνότητας-προδιάθεσης (susceptibility) μιας γυναίκας για τη νόσο καθορίζεται από το γονιδίωμά της. Η κλινική εκδήλωση προεκλαμψίας σε έγκυο με δεδομένο βαθμό γενετικής προδιάθεσης εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο του κυήματος, δηλαδή από το γονιδιακό περιεχόμενο του εμβρύου και του πλακούντα με τη συνέργεια περιβαλλοντικών παραγόντων. Συνεπώς, δυο γυναίκες με την ίδια γενετική προδιάθεση μπορεί να διαφέρουν ως προς την κλινική εκδήλωση της νόσου, ανάλογα με το γενετικό φορτίο του κυήματος που φέρει η καθεμία και τις περιβαλλοντικές επιδράσεις μέσα στις οποίες εξελίσσεται η κάθε κύηση.

Γονίδια που έχουν μελετηθεί αφορούν τόσο το μητρικό όσο και το εμβρυϊκό γονιδίωμα (32). Στο μητρικό γονιδίωμα ενδιαφέρουν παρουσιάζουν κυρίως γονίδια ελέγχου αρτηριακής πίεσης και γονίδια αγγειακής νόσου, όπως για παράδειγμα γονίδια σχετιζόμενα με υπερλιπιδαιμία και θρομβοφιλία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνουν τα γονίδια που εκφράζονται στον πλακούντα, τα οποία πιστεύεται ότι κατέχουν καθοριστικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια της προεκλαμψίας και της υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης (2,4,32). Είναι αξιοσημείωτο ότι χρωμοσωμικές ανωμαλίες

ανιχνεύονται στο 7% των νεογνών που γεννιούνται με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (3). Επίσης, επί του συνόλου των IUGR κήσεων ανεξαρτήτως αιτιολογίας, στο 20% ανευρίσκεται παθολογικός εμβρυϊκός καρυότυπος (13). Παράλληλα, έχει διαπιστωθεί συσχέτιση στην εκδήλωση προεκλαμψίας με εμβρυϊκή τριπλοειδία, μύλη κήση και τρισωμία 13 (32), γεγονός που επιδεικνύει σαφώς την εμβρυϊκή συμμετοχή στο γενετικό υπόβαθρο της νόσου.

8) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

- 1) Baha Sibai, Gus Dekker, Michael Kupferminc. Pre-eclampsia. Lancet 2005, vol 365, pp 785-799
- 2) Roderick R. McInnes, Jacques Michaud. Developmental Biology: Frontiers for Clinical Genetics. The genetics of pre-eclampsia: a feto-placental or maternal problem? Clinical Genetics 2003;64:96-103
- 3) Zivanit Ergaz, Meytal Avgil, Asher Ornoy. Intrauterine growth restriction – etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models? Reproductive Toxicology 2005;20:301-322
- 4) Audrey F. Saftlas, Hind Beydoun, Elizabeth Triche. Immunogenetic Determinants of Preeclampsia and Related Pregnancy Disorders, a systematic review. Obstet Gynecol 2005;106:162-72
- 5) P. Cohen, R.G. Rosenfeld, Growth disorders. in: M. Sperling (Ed.), Textbook of Pediatric Endocrinology, second ed., 2002.
- 6) E. Alsat, J. Guibourdenche, A. Couturier, D. Evain-Brion. Physiological role of human placental growth hormone. Molecular and Cellular Endocrinology 1998;140:121-127
- 7) Ruvdeep Randhawa, Pinchaw Cohen. The role of insulin-like growth factor system in prenatal growth. Molecular Genetics and Metabolism 2005;86:84-90
- 8) Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. Obstet Gynecol 2003; 102: 181–92.
- 9) Report of the National High Blood Pressure Education Program. Working group report on high blood pressure in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000; 183: S1–22.
- 10) The Johns Hopkins Manual of Gynecology and Obstetrics, 4th edition, KJ Hurt, MW Guile, JL Bienstock, Lippincott Manual Series

- 11) Waugh JJS, Clark TJ, Divakaran TG, Khan KS, Kilby MD. Accuracy of urinalysis dipstick techniques in predicting significant proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2004; 103:769–77.
- 12) Gaugler-Senden IP, Huijssoon AG, Visser W, Steegers EA, de Groot CJ, Maternal and perinatal outcome of preeclampsia with an onset before 24 weeks' gestation. Audit in a tertiary referral center, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006 Sep-Oct;128(1-2):216-21.
- 13) John M. Davison, Volker Homuth, Arun Jeyabalan, Kirk P. Conrad, S. Ananth Karumanchi, Susan Quaggin, Ralf Dechend, Friedrich C.Luft. New Aspects in the Pathophysiology of Preeclampsia. *J Am Society of Nephrology* 2004;15:2440-2448
- 14) Douglas KA, Redman CWG. Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ* 1994; 309: 1395–400.
- 15) Zhang J, Meikle S, Trumble A. Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22: 203–12.
- 16) O'Brien TE, Ray JG, Chan WS. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology* 2003; 14:368–74.
- 17) Wolfberg AJ, Lee-Parritz A, Peller AJ, Lieberman ES. Association of rheumatic disease with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 1190–93.
- 18) Schlembach and co-workers. Aetiology of pre-eclampsia and thrombophilic genetic mutations. *Clinical Science* (2003) 105, 269–271
- 19) Dekker G, Robillard PY. The birth interval hypothesis—does it really indicate the end of the primipaternity hypothesis? *J Reprod Immunol* 2003; 59: 245–51.
- 20) Saftlas AF, Levine RJ, Klebanoff MA, et al. Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 1108–14.
- 21) Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, Norman RJ, Chan A, Dekker GA. Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia. *Lancet* 2002; 359: 673–74.
- 22) Christine V Newburn-Cook, Judee E Onyskiw, Is Older Maternal Age a Risk Factor for Preterm Birth and Fetal Growth Restriction? A Systematic Review, *Health Care for Women International* 2005, vol 26(9), pp 852 -875
- 23) Amy A. Goodwin and Brian M. Mercer, Does maternal race or ethnicity affect the expression of severe preeclampsia? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, Volume 193, Issue 3, Supplement , Pages 973-978, September 2005
- 24) Murphy DJ, Stirrat GM, Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia, *Hypertens Pregnancy* 2000;19(2):221-31.

- 25) David Monk, Gudrun E. Moore. Intrauterine growth restriction-genetic causes and consequences. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* (2004) 9, 371-378
- 26) Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of HELLP syndrome. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 981–91.
- 27) Witlin AG, Sibai BM. Randomized trials for prevention and treatment of eclamptic convulsions. In: Sibai BM, ed. *Hypertensive disorders in women*. Philadelphia: Saunders, 2001: 221–27.
- 28) Wilson BJ, Watson MS, Prescott GJ, et al. Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: results from cohort study. *BMJ* 2003; 326: 1–7.
- 29) Haukkamaa L, Salminen M, Laivuori H, et al. Risk for subsequent coronary artery disease after preeclampsia. *Am J Cardiol* 2004; 93:805–08.
- 30) Robertson SA, Ingman WV, O’Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. Transforming growth factor beta—a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol* 2002; 57: 109–28.
- 31) Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. *J Clin Invest* 1997; 99: 2152–64.
- 32) Augusta M.A.Lachmeijer, Guustaaf A.Dekkler, Gerard Pals, Jan G. Aarnoudse, Leo P. ten Kate, Reynir Arngrimsson. Searching for preeclampsia genes: the current position. *European J of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2002;105:94-113

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° : Εισαγωγή

Από όσα έχουν αναφερθεί στο γενικό μέρος του παρόντος συγγράμματος, γίνεται εμφανές ότι η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη και η προεκλαμψία αποτελούν παθολογικές καταστάσεις με σοβαρές συνέπειες για μητέρα και έμβρυο, τόσο άμεσα, όσο και μακροπρόθεσμα. Καταστάσεις ωστόσο οι οποίες μπορούν να αντιμετωπισθούν ως ένα βαθμό, αν διεγνωσθούν έγκαιρα. Στα πλαίσια της έγκαιρης διάγνωσης έχουν γίνει κατά καιρούς προσπάθειες για ανεύρεση μορίων - δεικτών που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον προγεννητικό έλεγχο, στα πλαίσια screening, για τα νοσήματα αυτά. Στο γενικό μέρος του παρόντος συγγράμματος αναλύθηκε εκτενώς η θετική συσχέτιση των μορίων του hPGH-IGF1 άξονα (δηλαδή της hPGH, του IGF-1 και των IGFBP-1 και IGFBP-3) με την προαγωγή της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Παράλληλα, στη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται εκτεταμένη αναφορά για την αρνητική επίδραση που έχει στην εμβρυϊκή ανάπτυξη η αναστολή του hPGH-IGF1 άξονα. Υπάρχει πλήθος μελετών αναφορικά με ποικίλες μεταβολές των συγκεντρώσεων στο αίμα των εγκύων και στο εμβρυϊκό διαμέρισμα σε περιπτώσεις κύσεων που επεπλάκησαν από IUGR, συνοδευόμενη ή όχι από ποικίλης βαρύτητας κλινική εκδήλωση προεκλαμψίας (1,2,3-13). Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη γενετική έκφραση των μορίων αυτών, σε επίπεδο γονιδιώματος, δηλαδή στα κύτταρα του IUGR πλακούντα. Πιστεύοντας και ταυτόχρονα ελπίζοντας στη συμβολή στην προσπάθεια για ανεύρεση νέων μορίων-δεικτών screening για IUGR και προεκλαμψία, επιχειρήθηκε να μελετηθεί ποιοτικά και ποσοτικά η έκφραση των γονιδίων της ανθρώπινης πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH), του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα (IGF-1) και των δεσμευτικών αυτού πρωτεϊνών ένα (IGFBP-1) και τρία (IGFBP-3), σε επίπεδο πλακούντα, σε περιπτώσεις IUGR κύσεων με ή χωρίς συνοδή προεκλαμψία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° : Σκοπός της μελέτης

Η διερεύνηση της έκφρασης στον ανθρώπινο πλακούντα των γονιδίων της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH), του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα ένα (IGF-1) και των δεσμευτικών αυτού πρωτεϊνών ένα (IGFBP-1) και τρία (IGFBP-3) σε κύσεις χαρακτηριζόμενες από ενδομήτρια υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη (IUGR ή FGR εξίσου συνώνυμοι όροι) συνοδευόμενη ή μη από (ποικίλης βαρύτητας) κλινική εκδήλωση προεκλαμψίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : Σχεδιασμός της μελέτης

3,1) Επιλογή υπό μελέτη πληθυσμών

Αρχικό στάδιο του ερευνητικού πρωτοκόλλου της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων hPGH, IGF-1, IGFBP-1 και IGFBP-3 σε πλακούντες IUGR κήσεων μη συνοδευόμενων από προεκλαμψία. Επιλέγησαν 47 IUGR κήσεις (ομάδα μελέτης, ονόματι εφ'εξής IUGR ή FGR group) και 37 κήσεις που κατέληξαν σε γέννηση υγιούς νεογνού με φυσιολογικό βάρος για το φύλο και την ηλικία της κήσης, κήσεις οι οποίες δεν επεπλάκησαν από καμία παθολογία καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (ομάδα ελέγχου, ονόματι εφ'εξής control group). Οι κήσεις που επιλέγησαν προς μελέτη υποβλήθηκαν σε περιοδική τακτική παρακολούθηση, καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, στη Μονάδα Εμβryo-Μητρικής Ιατρικής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης. Για την ομάδα μελέτης, ο εκτενής προγεννητικός έλεγχος δεν ανέδειξε κάποιο εμφανές/γνωστό αίτιο για IUGR (προεκλαμψία, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενδομήτρια λοίμωξη), με συνέπεια η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη στις κήσεις αυτές να θεωρηθεί ιδιοπαθούς αρχής (ιδιοπαθής IUGR).

3,2) Συλλογή υλικού

Οι κήσεις των ομάδων μελέτης και ελέγχου περατώθηκαν στη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης. Στο σύνολό τους πρόκειται για τελειόμηνες κήσεις. Κατά τον τοκετό, συλλέγησαν ιστοτεμάχια πλακούντα, έξι από κάθε εγκυμοσύνη, μεγέθους περίπου 5 mm³ έκαστο. Η κοπή του ιστοτεμάχιου έγινε από την εμβρυοπλακουντιακή επιφάνεια κατά τέτοιο τρόπο, ώστε κάθε ιστοτεμάχιο να περιλαμβάνει κυρίως τμήμα από το λαχνωτό χόριο και τις πλακουντιακές κοτυλιδόνες (chorionic villi) και σε μικρότερο βαθμό από τη βασική στοιβάδα του φθαρτού (deciduas basalis). Έγινε προσπάθεια αποφυγής περιοχών του πλακούντα που επιδείκνυαν εκφυλιστικές αλλοιώσεις, όπως αιμορραγικές εστίες, πλακουντιακά έμφρακτα και εστίες επασβέστωσης. Ακολούθησε άμεση κατάψυξη των δειγμάτων σε περιβάλλον -70° C, όπου και παρέμειναν μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας τους.

3,3) Διάγνωση ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης

Ο υπολογισμός της ηλικίας κύησης έγινε με συνδυασμό της ημερομηνίας τελευταίας εμμηνου ρύσης και διαδοχικών υπερηχογραφικών ευρημάτων στις 11-13 εβδομάδες της κύησης. Οι έγκυες της ομάδας μελέτης (FGR group) δεν επέδειξαν κλινική, υπερηχογραφική, εργαστηριακή ή άλλη ένδειξη προεκλαμψίας. Από τη μελέτη επίσης αποκλείστηκαν περιπτώσεις κύσεων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου, κύσεις με πιθανή ενδομήτρια λοίμωξη (ιδίως της ομάδας STORCH), κύσεις με διαταραχές στο μεταβολισμό του σακχάρου από μέρους της εγκύου (σακχαρώδης διαβήτης κύησης ή παθολογική καμπύλη σακχάρου), κύσεις με θρομβοφιλία, αυτοάνοσο ή άλλο χρόνιο νόσημα της εγκύου. Τέλος, κριτήριο αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν η χορήγηση κορτικοστεροειδών στην έγκυο σε οποιοδήποτε στάδιο της κύησης, ακόμα και περιγεννητικά λόγω κινδύνου προωρότητας. Η προκύπτουσα ομάδα μελέτης περιέλαβε IUGR κύσεις μη-αναγνωρίσιμου αιτίου, ιδιοπαθούς πιθανά αρχής.

Ο υπολογισμός της Εκατοστιαίας Θέσης (ΕΘ) για το βάρος σώματος κατά τη γέννηση με τη χρήση λογισμικού υπολογιστή, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στον ιστοτόπο www.gestation.net (14). Το συγκεκριμένο λογισμικό χρησιμοποιεί παραμέτρους όπως το βάρος σώματος, το φύλο και την ηλικία της κύησης, καθώς και στοιχεία που αφορούν τη μητέρα (εθνικότητα, βάρος προ και κατά την κύηση, ύψος, τοκία), προκειμένου να υπολογίσει εξατομικευμένα για κάθε νεογνό την ΕΘ του βάρους γέννησης.

Η διάγνωση της υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης [βάρος γέννησης <5^η ΕΘ για το φύλο και την ηλικία της κύησης, με αναπροσαρμογή για τα σωματομετρικά δεδομένα της μητέρας (14)], έγινε με διαδοχικούς υπερηχογραφικούς ελέγχους.

Έγινε λεπτομερής λήψη και καταγραφή δημογραφικών στοιχείων, αφ' ενός των εγκύων γυναικών (τοκία, δείκτης μάζας σώματος, μέγιστη απόκτηση βάρους κατά την κύηση, ηλικία, κάπνισμα, πλήρες γυναικολογικό και παθολογικό ιστορικό), αφ' ετέρου στοιχεία που αφορούσαν την έκβαση της κύησης (φύλο νεογνού, βάρος γέννησης, ηλικία κύησης κατά τον τοκετό, είδος τοκετού δηλαδή φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή, περιγεννητικό ιστορικό). Η Επιτροπή Έρευνας και Ηθικής-Δεοντολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης ενέκρινε το παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο. Όλες οι συμμετέχουσες έγκυες δήλωσαν ενυπόγραφα τη συγκατάθεσή τους.

3,4) Μοριακή επεξεργασία δειγμάτων

3,4,1) Εξαγωγή ολικού RNA από πλακουντιακό ιστό

Το βιολογικό υλικό (δείγματα πλακούντα) διατηρήθηκε στους -70°C μέχρι περαιτέρω επεξεργασία του. Αρχικό στάδιο της μοριακής επεξεργασίας των δειγμάτων αποτέλεσε η εξαγωγή ολικού RNA από πλακουντιακό ιστό έπειτα από ομογενοποίηση με το αντιδραστήριο Trizol®, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (Invitrogen, Carlsband,CA). Και στις δυο ομάδες (IUGR και controls) το προς επεξεργασία δείγμα ιστού για κάθε κύηση προέκυψε ως εξής. Τα έξι ιστοτεμάχια πλακούντα που αναλογούν σε κάθε εγκυμοσύνη συγκεντρώθηκαν σε ενιαίο δοχείο, έτσι ώστε να γίνει συγκέντρωση-τυχαιοποίηση (pooling) του διαθέσιμου για κάθε εγκυμοσύνη πλακουντιακού ιστού. Ακολούθως, έγινε τυχαία λήψη ιστού συνολικής μάζας 1 mg από το pooling, το οποίο και αποτέλεσε το αντιπροσωπευτικό δείγμα πλακούντα για κάθε εγκυμοσύνη. Σε κάθε αντιπροσωπευτικό δείγμα 1 mg έγινε προσθήκη 1 mg αντιδραστηρίου Trizol® και το μίγμα ακολούθως υποβαλλόταν σε διαδικασία ομογενοποίησης, με τη χρήση ομογενοποιητή μεγάλης ισχύος. Καθ' όλη τη διάρκεια της ομογενοποίησης το μίγμα βρισκόταν εμβυθισμένο σε δοχείο με πάγο, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση της θερμότητας από τις δυνάμεις τριβής, στο περιεχόμενο RNA του μίγματος. Ακολούθησε παραμονή του ομογενοποιημένου μίγματος στους -70°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προσετέθη 0.2 ml χλωροφόρμιο και έγινε φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 15 λεπτά. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με φάσεις διαδοχικής έκπλυσης της υπερκείμενης στοιβάδας που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση, αρχικά με ισοπροπανόλη και εν συνεχεία με 75% αιθανόλη και τελικά εξαγωγή-απομόνωση ολικού RNA από το δείγμα. Επόμενο βήμα ήταν η φωτομέτρηση του προκύπτουντος RNA (απορρόφηση στα 260 nm) σε UV σπεκτροφωτόμετρο για έλεγχο της συγκέντρωσης και της καθαρότητάς του.

3,4,2) Αντίστροφη μεταγραφή, εφαρμογή qRT-PCR

Η ανεύρεση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων επιτεύχθηκε με αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA και εφαρμογή ποσοτικής Real Time PCR (qRT-PCR) με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR®Green I. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πακέτο αντιδραστηρίων RETROscript first strand synthesis kit (AMBION, Austin, TX). Για την ποσοτική επαύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (primers), οι

οποίοι σχεδιάστηκαν με στόχο την επιλεκτική αναγνώριση αλληλουχιών-στόχων στα υπό μελέτη γονίδια (Πίνακας 1).

Γονίδιο	Ζεύγος εκκινητών (5' - 3')	Προϊόν (bp)
<i>hPGH</i>	(F) AGAACCCCCAGACCTCCCT (R) TGCGGAGCAGCTCTAGGTTAG	96
<i>IGF-1</i>	(F) CCTCCTCGCATCTCTTCTACCTG (R) CTGCTGGAGCCATACCCTGTG	166
<i>IGFBP-1</i>	(F) TAACTGAGGAGGAGCTCCTGGATA (R) TTTGGAAATTTCTTCTCCTGATGTC	215
<i>IGFBP-3</i>	(F) AAGACAGCCAGCGCTACAAAG (R) TACGGCAGGGACCATATTCTG	102
<i>GAPDH</i>	(F) GGAAGGTGAAGGTCCGGAGTCA (R) GTCATTGATGGCAACAATATCCACT	101
<i>RPL13A</i>	(F) CCTGGAGGAGAAGAGGAAA (R) TGAGGACCTCTGTCTATTTGTC	125

Πίνακας 1. Οι αλληλουχίες και τα μοριακά βάρη (bp) των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην ποσοτική real time RT-PCR.

Ως υπονήφια γονίδια αναφοράς για την RT-PCR επιλέχθηκαν το γονίδιο της GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) και το γονίδιο της ριβοσωμιακής πρωτεΐνης RPL13A. Έπειτα από συγκριτικές μετρήσεις και βελτιστοποίηση των συγκεντρώσεων των primers κάθε γονιδίου ως προς τα υπό μελέτη γονίδια, η *GAPDH* θεωρήθηκε πιο σταθερό - αξιόπιστο γονίδιο και χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Από 0.5 µg ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξαμερή ως amplification primers. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση του συστήματος Mx3000P real-time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA). Οι τιμές των επιπέδων έκφρασης συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Mx3000P real-time PCR software version 2.00, Build 215 Schema 60 (Stratagene La Jolla, CA). Έπειτα από αρχική αποδιάταξη των νουκλεοτιδικών αλύσεων του DNA στους 95 °C για 10 min, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε 40 κύκλους εκλεκτικής νουκλεοτιδικής επαύξεσης (amplification). Κάθε κύκλος περιελάμβανε: φάση αποδιάταξης του DNA στους 95 °C για 30 sec, ακολούθως φάση ανόδου και ταχείας πτώσης της θερμοκρασίας (σε τιμή συγκεκριμένη για κάθε γονίδιο) (annealing phase) διάρκειας 30 sec και τέλος φάση επιμήκυνσης-επαύξεσης του DNA στους 72°C για 30 sec. Οι τιμές της θερμοκρασίας όπου πραγματοποιήθηκε το annealing για κάθε γονίδιο ήταν: 60 °C για τα *IGF-1*, *hPGH*, *IGFBP-3* και *GAPDH*, 53°C για το *RPL13A* και 55°C για το *IGFBP-1*. Σε κάθε κύκλο, τις φάσεις επαύξεσης και

επιμήκυνσης (amplification and elongation) ακολουθούσε μια ανάλυση της καμπύλλης τήξης (melt curve analysis), οπότε η θερμοκρασία άφανε από τους 55°C στους 95°C με γραμμικό ρυθμό αύξησης 0.2 °C/sec. Συλλογή δεδομένων κατά την πραγματοποίηση της RT-PCR γινόταν τόσο κατά τη φάση της ανόδου της θερμοκρασίας, όσο και κατά τη φάση του αναδιπλασιασμού-επαύξεσης του DNA, και πάντα εντός της φάσης της καμπύλλης σύντηξης. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα από την melt curve analysis, τα προϊόντα της RT-PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε 2% gel αγαρόζης με προσθήκη βρωμιούχου αιθύδιου και εμφανίστηκαν σε UV light transilluminator. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων υπολογίστηκαν σύμφωνα με συναφείς παλαιότερες δημοσιεύσεις (15).

Η μεταβολή επί δυο (πολλαπλασιασμός ή υποδιπλασιασμός) της τιμής έκφρασης ενός γονιδίου θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή (αύξηση ή ελάττωση αντίστοιχα) της έκφρασης για το συγκεκριμένο γονίδιο. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν εις διπλούν με στόχο την ποσοτική ανίχνευση της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων.

3,5) Στατιστική ανάλυση

Μεταβλητές της μελέτης που μπορούσαν να πάρουν ως τιμή απόλυτο αριθμό εκφράστηκαν με κυβοειδή διαγράμματα (boxblots) ως μέση και διάμεση τιμή και ως εύρος κατανομής. Και στις δυο ομάδες πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης κάθε γονιδίου με ένα σύνολο κλινικών παραμέτρων (Pearson's bivariate correlation coefficient). Ακολούθησε μη-παραμετρική ανάλυση συσχέτισης (Spearman's bivariate correlation-coefficient test) των επιπέδων έκφρασης όλων των γονιδίων μεταξύ τους ανά δυο, για ανεύρεση πιθανών προτύπων συνέκφρασης ανάμεσα στα υπό μελέτη γονίδια. Ως στατιστικά σημαντικές αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις με $P < 0.01$ για τις IUGR και με $P < 0.05$ για τις φυσιολογικές κήσεις (control). Επιπλέον, το πρότυπο συνέκφρασης μεταξύ δυο γονιδίων θεωρήθηκε ως στατιστικά ισχυρό, όταν $P < 0.001$. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση του συστήματος SPSS v.15 (SPSS Inc.Chicago,IL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : Αποτελέσματα μελέτης

4,1) Δημογραφικά στοιχεία

Στους πίνακες 2 και 3 παρουσιάζονται τα κλινικά χαρακτηριστικά των εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη καθώς και κλινικά στοιχεία σχετικά με την έκβαση των αντιστοίχων κυήσεων. Διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων στατιστικά σημαντικές αναγράφονται με τονισμένη γραφή (bold).

Αναφορικά με τις κλινικές παραμέτρους από την πλευρά της μητέρας, το μόνο χαρακτηριστικό που βρέθηκε να διαφοροποιείται σημαντικά ανάμεσα σε IUGR και φυσιολογικές κυήσεις ήταν το κάπνισμα. Προέκυψε ότι οι έγκυες που γέννησαν ένα IUGR παιδί κάπνιζαν στατιστικά περισσότερο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης από ότι εκείνες που γέννησαν παιδιά με φυσιολογικό βάρος (πίνακας 2, $P < 0.004$).

Πίνακας 2. Κλινικά χαρακτηριστικά εγκύων που συμμετείχαν στη μελέτη.

Κλινικά χαρακτηριστικά εγκύων γυναικών	IUGR κυήσεις N=47	Φυσιολογικές κυήσεις N=37	Τιμή P
Ηλικία σε έτη: μέσος όρος (εύρος κατανομής)	28.34 (19-43)	28.62 (18-44)	0.831 ^(α)
Πρωτοτοκία: n (%)	25 (53.1)	20 (54.0)	0.662 ^(β)
Κάπνισμα: n (%)	14 (29.7)	10 (27.02)	0.004 ^(β)
Δείκτης Μάζας Σώματος σε kg/m ² : μέσος όρος (±SD)	23.74 (±4.78)	22.15 (±2.85)	0.107 ^(α)

SD (Standart Deviation) : Σταθερή Απόκλιση

^(α) : t-test για δυο ανεξάρτητες μεταβλητές

^(β) : χ^2 test

Από την πλευρά των παραμέτρων που αφορούσαν το νεογνό και γενικότερα την έκβαση της κύησης, στατιστικά αξιόλογες διαφορές προέκυψαν για το είδος του τοκετού και την ηλικία της κύησης. Η δεύτερη βρέθηκε σημαντικά μικρότερη στις IUGR κυήσεις (πίνακας 3, $P < 0.001$), γεγονός αναμενόμενο. Παράλληλα, η καισαρική τομή προέκυψε ως ο συχνότερος τύπος τοκετού για την ομάδα μελέτης (πίνακας 3, $P < 0.001$).

Πίνακας 3. Κλινικά στοιχεία σχετιζόμενα με την έκβαση της κύησης.

Έκβαση της κύησης	IUGR κυήσεις N=47	Φυσιολογικές κυήσεις N=37	Τιμή P
Ηλικία κύησης κατά τη γέννηση σε ημέρες: μέσος όρος (\pm SD)	251.54 (\pm 27.37)	271.13 (\pm 9.91)	<0.001 ^(α)
Νεογνό άρρεν: n (%)	18 (38.2)	22 (61.1)	0.109 ^(β)
Καισαρική τομή: n (%)	34 (72.3)	10 (27)	<0.001 ^(β)

SD (Standart Deviation) : Σταθερή Απόκλιση

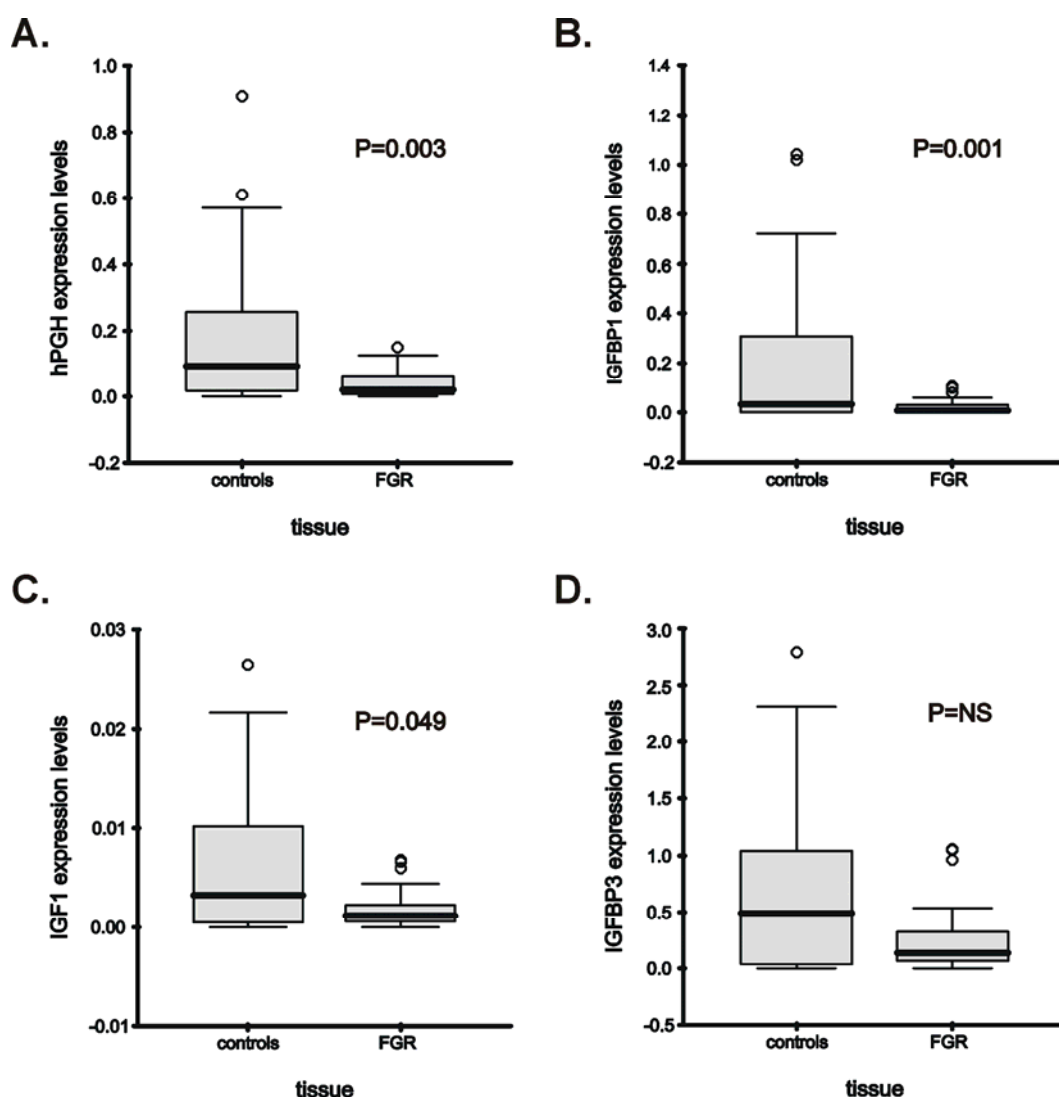
^(α) : t-test για δυο ανεξάρτητες μεταβλητές

^(β) : χ^2 test

4,2) Έκφραση στον πλακούντα

Τα αποτελέσματα της RT-PCR παραθέτονται στον πίνακα 4. Τα επίπεδα έκφρασης τριών από τα τέσσερα γονίδια που μελετήθηκαν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά ελαττωμένα στους πλακούντες των IUGR κυήσεων συγκριτικά με τις φυσιολογικές κυήσεις. Πρόκειται για τα γονίδια της hPGH ($P=0.003$), του IGF-1 ($P=0.049$) και της IGFBP-1 ($P=0.001$) (πίνακας 4). Τα επίπεδα έκφρασης της IGFBP-3 ήταν επίσης ελαττωμένα στις IUGR κυήσεις, χωρίς ωστόσο οι διαφορές να θεωρούνται στατιστικά σημαντικές ($P=0.129$).

Πίνακας 4. Τα επίπεδα έκφρασης στον πλακούντα των γονιδίων hPGH, IGF-1, IGFBP-1 και IGFBP-3 στην ομάδα μελέτης (FGR κήσεις) και στην ομάδα ελέγχου (controls, δηλαδή κήσεις με φυσιολογικό βάρος γέννησης νεογνού). Τα κυβοειδή διαγράμματα (boxblots) αντιπροσωπεύουν το πλήθος των δειγμάτων οι τιμές των οποίων περικλείονται μεταξύ του 25% και του 75% των υπολογιζόμενων τιμών έκφρασης για κάθε γονίδιο. Η τονισμένη μαύρη γραμμή σε κάθε κυβοειδές διάγραμμα αντιπροσωπεύει τη διάμεσο τιμή (median). Οι ακραίες οριζόντιες γραμμές αντιπροσωπεύουν τα δείγματα με ελάχιστη και μέγιστη τιμή σε κάθε ομάδα.



Αναλυτικά, η μέση mRNA έκφραση (και το αντίστοιχο εύρος κατανομής) για το γονίδιο της hPGH ήταν 0.06 (0.0004–0.95) στο control group και 0.03 (0.0002–0.15) στο FGR group, με

στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δυο group $P=0.003$ (πίνακας 4, γράφημα A). Για τις φυσιολογικές κήσεις, η μέση mRNA έκφραση (και εύρος κατανομής) για τα γονίδια IGF-1 και IGFBP-1 υπολογίστηκε σε 0.002 (7×10^{-6} –0.026) και 0.01 (0.0001–1.03) αντίστοιχα. Οι ανάλογες τιμές για τις παθολογικές FGR κήσεις ήταν αντίστοιχα 0.002 (1.1×10^{-5} –0.008) και 0.01 (0.0001–0.18), με στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δυο group $P=0.049$ για τον IGF-1 και $P=0.001$ για την IGFBP-1 (πίνακας 4, γράφημα C και B αντίστοιχα). Στην περίπτωση του γονιδίου της IGFBP-3, παρόλο που η μέση mRNA έκφραση ήταν ελαττωμένη στις FGR κήσεις 0.12 (0.0002–1) σε σύγκριση με τις φυσιολογικές 0.5 (0.0003–2.73), το αποτέλεσμα δεν πέτυχε ικανοποιητικό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($P=0.129$) (πίνακας 4, γράφημα D).

Οι διαφορές που προέκυψαν στην έκφραση των γονιδίων στον πλακούντα ανάμεσα στις δυο ομάδες κήσεων, παρέμειναν στατιστικά σημαντικές ακόμα και μετά από βελτιστοποίηση - αναπροσαρμογή των αποτελεσμάτων για την ηλικία της κύησης και για τον παράγοντα κάπνισμα. Κατά συνέπεια, το πειραματικό σκέλος της παρούσας διατριβής έδειξε ότι στους πλακούντες των IUGR κήσεων ιδιοπαθούς αιτιολογίας η γενετική έκφραση των γονιδίων hPGH, IGF-1 και IGFBP-1 είναι στατιστικά σημαντικά ελαττωμένη συγκρινόμενη με την έκφρασή τους σε πλακούντες κήσεων με ομαλή έκβαση που κατέληξαν σε γέννηση νεογνού με φυσιολογικό βάρος και ανάπτυξη.

4,3) Ανάλυση συσχέτισης - Πρότυπα γονιδιακής συνέκφρασης

Τόσο στις IUGR όσο και στις φυσιολογικές κήσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson (Pearson's bivariate correlation coefficient test) των επιπέδων έκφρασης κάθε γονιδίου με μια σειρά από κλινικές παραμέτρους όπως ηλικία μητέρας, τοκία, κάπνισμα, δείκτης μάζας σώματος, ηλικία κύησης, φύλο νεογνού και εκατοστιαία θέση σύμφωνα με το βάρος κατά τη γέννηση. Δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

Ακολούθησε μη-παραμετρική ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης όλων των γονιδίων μεταξύ τους ανά δυο (non-parametric Spearman's bivariate correlation coefficient test), για ανεύρεση πιθανών προτύπων συνέκφρασης ανάμεσα στα υπό μελέτη γονίδια (πίνακας 5). Ως στατιστικά σημαντικές αξιολογήθηκαν οι συσχετίσεις με $P<0.01$ για τις IUGR και με $P<0.05$ για τις φυσιολογικές κήσεις (control). Επιπλέον, το πρότυπο συνέκφρασης μεταξύ δυο γονιδίων θεωρήθηκε ως στατιστικά ισχυρό, όταν $P<0.001$. Για την ομάδα των IUGR κήσεων αναδείχθηκαν μια σειρά από στατιστικά σημαντικά θετικά πρότυπα συνέκφρασης μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων που μελετήθηκαν (Πίνακας 5), ενώ ιδιαίτερα στατιστικά ισχυρό θετικό πρότυπο συνέκφρασης ($P<0.001$) προέκυψε στα ζεύγη: IGF1-IGFBP3, hPGH-IGFBP1, hPGH-IGFBP3 και IGFBP1-

IGFBP3. Για την ομάδα φυσιολογικών κυήσεων στατιστικά σημαντικό ($P=0.012$) πρότυπο συνέκφρασης αναδείχθηκε μόνο ανάμεσα στην hPGH και IGFBP3. Βελτιστοποίηση - αναπροσαρμογή των αποτελεσμάτων σύμφωνα με την ηλικία της κύησης και για τον παράγοντα κάπνισμα δεν μετέβαλλε την ισχύ των προτύπων συνέκφρασης.

Πίνακας 5. Πρότυπα γονιδιακής συν-έκφρασης των γονιδίων hPGH, IGF-1, IGFBP-1 και IGFBP-3 στις ομάδες μελέτης (IUGR κυήσεις) και ελέγχου (φυσιολογικές κυήσεις). Η συσχέτιση συνέκφρασης θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική όταν $P<0.01$ (α) ή όταν $P<0.05$ (β) και αναγράφονται με έντονη γραφή. [P: επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. CC: συντελεστής συσχέτισης (Correlation Coefficient)].

IUGR κυήσεις		IGF-1	IGFBP-1	IGFBP-3	hPGH
IGF-1	CC	1.000			
	P				
IGFBP-1	CC	0.506	1.000		
	P	0.002 ^(α)			
IGFBP-3	CC	0.667	0.827	1.000	
	P	<0.001 ^(α)	<0.001 ^(α,β)		
hPGH	CC	0.506	0.677	0.773	1.000
	P	0.002 ^(α)	<0.001 ^(α,β)	<0.001 ^(α,β)	
Φυσιολογικές κυήσεις		IGF-1	IGFBP-1	IGFBP-3	hPGH
IGF-1	CC	1.000			
	P				
IGFBP-1	CC	0.153	1.000		
	P	0.352			
IGFBP-3	CC	0.026	0.017	1.000	
	P	0.877	0.915		
hPGH	CC	0.021	0.066	0.376	1.000
	P	0.899	0.673	0.012 ^(β)	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° : Συμπεράσματα, Συζήτηση

Με τη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος του ορμονικού άξονα «hPGH - IGF1» στην εκδήλωση υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης ιδιοπαθούς αιτιολογίας. Η ερευνητική αυτή προσέγγιση επιχειρήθηκε με την μελέτη της πλακουντιακής έκφρασης τεσσάρων ταυτόχρονα γονιδίων, των *hPGH*, *IGF-1*, *IGFBP-1* και *IGFBP-3*, τα οποία θεωρούνται ότι άμεσα ή έμμεσα προάγουν ή ελέγχουν την αύξηση και διαφοροποίηση των κυττάρων και επομένως ευοδώνουν την ανάπτυξη των ιστών (16,17). Με την παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε για πρώτη φορά – και με συγκριτικά μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων - η μελέτη της πλακουντιακής έκφρασης καθώς και η διερεύνηση τυχόν προτύπων συνέκφρασης του συνόλου του «κορμού» των γονιδίων που σχετίζονται με τη δράση της Πλακουντιακής Αυξητικής Ορμόνης – η οποία παράγεται αποκλειστικά στη διάρκεια της εγκυμοσύνης και που έχει βασικό ρόλο στην προσαρμογή του μεταβολισμού της μητέρας στην κατάσταση της κύησης, προς όφελος της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Βρήκαμε ελαττωμένη πλακουντιακή έκφραση για των *hPGH*, *IGF-1* and *IGFBP-1*, μαζί με θετικά πρότυπα συνέκφρασης σε κυήσεις που εκδήλωσαν ιδιοπαθή IUGR. Στον πίνακα 6 παρουσιάζεται η επί του παρόντος υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον ανθρώπινο πλακούντα για τα γονίδια *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1* και *IGFBP-3* σε IUGR κυήσεις με χρήση της ποσοτικής quantitative RT-PCR. Με την εξαίρεση της μελέτης των Trollmann και συνεργατών, όλες οι υπόλοιπες αναφερόμενες μελέτες αφορούν IUGR κυήσεις ιδιοπαθούς αιτιολογίας. Γίνεται αισθητό ότι τα μέχρι σήμερα στοιχεία από γενωμικές μελέτες ποσοτικής έκφρασης των εν λόγω γονιδίων στον ανθρώπινο πλακούντα IUGR κυήσεων είναι εξαιρετικά περιορισμένα (περιλαμβάνουν μικρό πλήθος δειγμάτων) και ενίοτε αλληλοσυγκρουόμενα.

Πίνακας 6. Επί του παρόντος υπάρχουσα βιβλιογραφία σχετικά με μελέτες γονιδιακής έκφρασης στον ανθρώπινο πλακούντα των γονιδίων hPGH, IGF-I, IGFBP-1 και IGFBP-3 σε IUGR κήσεις με χρήση της ποσοτικής quantitative RT-PCR. Με την εξαίρεση της μελέτης των Trollmann και συνεργατών, όλες οι άλλες μελέτες αφορούν IUGR κήσεις ιδιοπαθούς αιτιολογίας.

Συγγραφέας, Έτος (Αναφορά #)	δείγματα (n)		hPGH	IGF-1	IGFBP-1	IGFBP-3
	IUGR	controls				
Abu-Amero et al, 1998 (18)	9	9		NS		
Calvo et al, 2004 (19)	31	42		↓ P=0.008		
Street et al, 2006 (12)	16	20		NS	NS	
Okamoto et al, 2006 (20)	4	4			↑	
Trollmann et al, 2007 (21)	6/22*	28	NS	NS		
Barrio et al, 2009 (22)	50	50	NS			
Struwe et al, 2010 (23)	27	35			↑	
Tschoppe et al, 2009 (24)	14	15			NS	
Koutsaki et al, 2011 (Παρούσα μελέτη) (25)	47	37	↓ P=0.003	↓ P=0.049	↓ P=0.001	NS

↓ : Στατιστικά σημαντική ελάττωση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου

↑ : Στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου

NS : Στατιστικά μη σημαντική μεταβολή στην έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου

P : Τιμή P

* : σύνολο 22 κυήσεων που επιδεικνύουν χρόνια πλακουντιακή υποξία, εκ των οποίων 6 με IUGR ιδιοπαθούς αιτιολογίας

Μελέτες σε περιφερικό αίμα εγκύων γυναικών έχουν δείξει ελαττωμένα επίπεδα hPGH και IGF-1 σε IUGR κυήσεις, οφειλόμενη σε πλακουντιακή ανεπάρκεια (4,10,11,26). Αναφορικά με τον IGF-1, βρήκαμε ελαττωμένη πλακουντιακή έκφραση στους IUGR πλακούντες (25), εύρημα που φαίνεται να συμφωνεί με την μελέτη των Calvo et al. (2004) (19), μια εφάμιλλου μεγέθους μικρή cohort μελέτη ιδιοπαθούς FGR (19, πίνακας 6). Σε αντίθεση με άλλους ερευνητές (21,22,πίνακας 6) βρήκαμε ελαττωμένη πλακουντιακή έκφραση για την hPGH (25). Οι Barrio et al. (2009) έδειξαν πτωτική τάση των επιπέδων της hPGH στον πλακούντα, χωρίς ωστόσο το αποτέλεσμα να αγγίζει στατιστική σημαντικότητα (22). Σε μελέτες in situ υβριδισμού ή ανοσοϊστοχημείας αντικρουόμενα αποτελέσματα αναφέρουν άλλωτε αύξηση (27-29) και άλλωτε μείωση (30) της μεταγραφής των hPGH και IGF-1. Τα δικά μας ευρήματα έρχονται σε αντίθεση με την από άλλους ερευνητές ευρισκόμενη αυξημένη έκφραση της IGFBP-1 σε IUGR πλακούντες (20,23, πίνακας 6). Επιπρόσθετα, τα IGFBP-1 επίπεδα τόσο στη μητρική όσο και στην εμβρυϊκή κυκλοφορία συσχετίζονται αντίστροφα με το βάρος γέννησης (6,10,11,31). Στη δική μας μελέτη πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά εκτίμηση της πλακουντιακής έκφρασης της IGFBP-3 σε IUGR κυήσεις και βρήκαμε μη-στατιστικά σημαντική ελάττωση αυτής (56). Υπάρχουν ωστόσο αναφορές για αυξημένες συγκεντρώσεις στο μητρικό ορό σε ποικίλης αιτιολογίας IUGR κυήσεις (10,11).

Επί του παρόντος, μόνο εικασίες μπορούν να γίνουν προκειμένου κανείς να δικαιολογήσει την πληθώρα και την έντονη ανομοιογένεια, ενίοτε επιφανειακά αγεφύρωτη, που επιδεικνύουν τα υπό μελέτη μόρια στο αίμα και στον πλακούντα των κυήσεων με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη. Κατ' αρχάς, σημαντικός περιοριστικός παράγοντας για τις γενωμικές μελέτες του πλακούντα θεωρείται η μεγάλη ανομοιογένεια - ποικιλομορφία των υπό μελέτη εκάστοτε πληθυσμών σε ότι αφορά την αιτιολογία - παθογένεια της IUGR (32). Παράλληλα, η ηλικία της κύησης όταν γίνεται η δειγματοληψία (ορός, αμνιακό υγρό, πλακούντας) καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τα εξαγόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, οι Tzschoppe και συνεργάτες (2010) απέδειξαν ότι η περιοχή δειγματοληψίας πάνω στο δίσκο του πλακούντα παίζει καθοριστικό ρόλο, συμβάλλοντας στην μεγάλη ανομοιογένεια των αποτελεσμάτων στις γενωμικές μελέτες του πλακούντα (33). Ο πλακούντας IUGR κύησης αποτελεί ιστό με χαρακτηριστικές, ενίοτε έντονες, εκφυλιστικές αλλοιώσεις, οι οποίες δεν είναι πάντοτε μακροσκοπικά εμφανείς (33). Παράλληλα, και τα τέσσερα υπό μελέτη μόρια, πιστεύεται ότι υπόκεινται σε άλλωτε άλλο βαθμό σε μετα-μεταγραφικές ή/και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ενδεχομένως να επηρεάζουν τα κυκλοφορούντα στον

ορό επίπεδά τους και να τα διαφοροποιούν σημαντικά από την πλακουντιακή τους έκφραση (27,34,35). Οι τροποποιήσεις αυτές πιθανώς επιφέρουν αλλαγές, στην πλειονότητά τους απρόβλεπτες από τον εξωτερικό παρατηρητή, στη δομική σταθερότητα του πρωτεϊνικού μορίου στον ορό, πιθανές μεταβολές στο μηχανισμό απελευθέρωσης - εξωκυττάρωσης της ορμόνης ή ακόμα και μειωνεκτική μεταφορά της πρωτεΐνης εντός του πλακουντιακού ιστού (35). Επιπρόσθετα, αλλαγές στα κυκλοφορούντα επίπεδα στον ορό πλακουντιακής προέλευσης μορίων όπως η hPGH και η PAPP-A έχουν παρατηρηθεί μεταξύ της υποκλινικής φάσης της νόσου και της κλινικής εγκατάστασης συμπτώματολογίας που σχετίζεται με εμβρυϊκή υποξία, υπολειπόμενη ανάπτυξη και πλακουντιακή ανεπάρκεια (1,2,4,11,26,36). Τέλος, η ποικιλομορφία - ετερογένεια των ρόλων που διαδραματίζουν οι IGFBP-1 και IGFBP-3, περιλαμβάνοντας IGF-1 εξαρτώμενες και IGF-1 ανεξάρτητες δράσεις, πιστεύεται ότι μπορεί να ευθύνεται συν των προαναφερθέντων για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα της μελέτης μας (25), τουλάχιστον σε ότι αφορά την IGFBP-1.

Η μελέτη μας ανέδειξε στατιστικά σημαντικά πρότυπα συνέκφρασης μεταξύ και των τεσσάρων γονιδίων στο FGR group. Θεωρούμε ότι η θετική συσχέτιση hPGH και IGF-1 ουσιαστικά επιβεβαιώνει τον ήδη γνωστό ρόλο της hPGH ως ρυθμιστή της δράσης του IGF-1 (37,38), ανεξαρτήτως της ηλικίας της κύησης ή της παρουσίας επιπλοκών της κύησης (4,26). Σε παρόμοια συμπεράσματα έχουν φτάσει αναδρομικές και cross-sectional μελέτες με μεγάλο αριθμό υγιών και FGR κυήσεων (11,16,26,37). Άξιο σχολιασμού είναι το προκύπτουν από τη μελέτη μας ισχυρό πρότυπο γονιδιακής συνέκφρασης μεταξύ IGFBP-3 και IGF-I στο FGR group, το οποίο έχει επίσης βρεθεί σε μελέτη σε ομφαλικό αίμα σε FGR κυήσεις (13). Η IGFBP-3 είναι πρωταρχικός ρυθμιστής της IGF-I δράσης στην κυκλοφορία, καθορίζοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του (39). Αρκετοί δε είναι αυτοί που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της IGFBP-3 αποτελούν δείκτη της λειτουργικότητας του άξονα hPGH-IGF1 κατά τη μη-έγκυο κατάσταση (40). Τέλος, η μελέτη μας ανέδειξε στατιστικά ισχυρό πρότυπο συσχέτισης-συνέκφρασης ανάμεσα σε IGFBP-3 και hPGH στις FGR κυήσεις, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τις μελέτες και άλλων ερευνητών (11). Μάλιστα, η συσχέτιση μεταξύ των δυο μορίων διατηρήθηκε και στις υγιείς κυήσεις (control group), ως το μοναδικό σε αυτές πρότυπο γονιδιακής συνέκφρασης μεταξύ των τεσσάρων υπό μελέτη γονιδίων.

Το κύριο συμπέρασμα που προκύπτει από την παρούσα μελέτη είναι η ελαττωμένη έκφραση στον πλακούντα της hPGH και του IGF-1, βασικών ρυθμιστικών παραγόντων της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Κατά πόσο οι αλλαγές αυτές αποτελούν πρωτογενή αίτια που οδηγούν ή συμβάλλουν στην εκδήλωση IUGR ή αν συνοδεύουν άλλους υποκείμενους μηχανισμούς παθολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω έρευνας. Η πιθανή προβλεπτική ή διαγνωστική αξιοποίηση των ευρημάτων αυτών απαιτεί επίσης τη διενέργεια μεγαλύτερων κλινικών ερευνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° : Μελλοντικές προοπτικές

Η ερευνητική προσπάθεια συνεχίζεται με στόχο πάντα τη μελέτη της πλακουντιακής έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος (hPGH, IGF-1, IGFBP-1 και IGFBP-3), σε περιπτώσεις IUGR κυήσεων συνοδευόμενες από προεκλαμψία. Για το σκοπό αυτό γίνεται ήδη συλλογή και επεξεργασία υλικού από προεκλαμπτικούς πλακούντες και εξαγωγή ολικού RNA. Θα ακολουθηθεί ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο (εξαγωγή ολικού RNA, αντίστροφη μεταγραφή για παραγωγή cDNA και εφαρμογή qRT-PCR με χρήση φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green). Ως ομάδες μελέτης θα επιλεγούν 30 προεκλαμπτικές κυήσεις με συνοδή IUGR (IUGR και PE) καθώς και 10 προεκλαμπτικές κυήσεις χωρίς συνοδή IUGR (PE alone). Το ερευνητικό πρωτόκολλο που μόλις περιγράφηκε βρίσκεται σε εξέλιξη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7° : Βιβλιογραφία Ειδικού Μέρους

- 1) E. Papadopoulou, S. Sifakis, E. Giahnakis, et al., Increased human placental growth hormone at midtrimester pregnancies may be an index of intrauterine growth retardation related to preeclampsia, *Growth Horm. IGF Res.* 16 (2006) 290–296.
- 2) P. Mittal, J. Espinoza, S. Hassan, et al., Placental growth hormone is increased in the maternal and fetal serum of patients with preeclampsia, *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* 20 (2007) 651–659.
- 3) C. Lassarre, S. Hardouin, F. Daffos, F. Forestier, F. Frankenne, M. Binoux, Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in subjects with intrauterine growth retardation, *Pediatr. Res.* 29 (1991) 219–225.

- 4) V. Mirlesse, F. Frankenne, E. Alsat, M. Pouchalet, G. Hennen, D. Evain-Brion, Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation, *Pediatr. Res.* 34 (1993) 439–442.
- 5) K. Langford, W. Blum, K. Nicolaidis, J. Jones, A. McGregor, J. Miell, The pathophysiology of the insulin-like growth factor axis in fetal growth failure: a basis for programming by under nutrition? *Eur. J. Clin. Invest.* 24 (1994) 851–856.
- 6) L.C. Giudice, F. de Zegher, S.E. Gargosky, et al., Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and pre-term human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 1548–1555.
- 7) K.S. Langford, K.H. Nicolaidis, J. Jones, A. Abbas, A.M. McGregor, J.P. Miell, Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) levels and IGFBP-3 protease activity in normal, abnormal and multiple human pregnancy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 21–27.
- 8) J.A. Spencer, T.C. Chang, J. Jones, S.C. Robson, M.A. Preece, Third trimester fetal growth and umbilical venous blood concentrations of IGF-I, IGFBP-1 and growth hormone at term, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 73 (1995) F87–F90.
- 9) J. Leger, J.F. Oury, M. Noel, et al., Growth factors and intrauterine growth retardation. I. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein 3 levels in normally grown and growth-retarded human fetuses during the second half of gestation, *Pediatr. Res.* 40 (1996) 94–100.
- 10) R. Holmes, R. Montemagno, J. Jones, M. Preece, C. Rodeck, P. Soothill, Fetal and maternal plasma insulin-like growth factors and binding proteins in pregnancies with appropriate or retarded fetal growth, *Early Hum. Dev.* 49 (1997) 7–17.
- 11) H.D. McIntyre, R. Serek, D.L. Crane, et al., Placental growth hormone (GH), GH Binding Protein and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded, and diabetic pregnancies: correlations with fetal growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 1143–1150.
- 12) M.E. Street, P. Seghini, S. Fieni, et al., Changes in interleukin-6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls, *Eur. J. Endocrinol.* 155 (2006) 567–574.
- 13) R. Verkauskiene, J. Beltrand, O. Claris, et al., Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age, *Eur. J. Endocrinol.* 157 (2007) 605–612.
- 14) J. Gardosi, A. Francis, Software program for the calculation of customized birth weight percentiles8 Version 6.2, 2000-2007, , 15 April, 20108 Available at: [http:// ww.gestation.net](http://ww.gestation.net). Retrieved.

- 15) A. Zaravinos, J. Bizakis, D.A. Spandidos, RKIP and BRAF aberrations in human nasal polyps and the adjacent turbinate mucosae, *Cancer Lett.* 264 (2008) 288–298.
- 16) J. Fuglsang, P. Ovesen, Aspects of placental growth hormone physiology, *Growth Horm. IGF Res.* 16 (2006) 67–85.
- 17) R. Monzavi, P. Cohen, IGFs and IGFBPs: role in health and disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 16 (2002) 433–447
- 18) S.N. Abu-Amero, Z. Ali, P. Bennett, J.I. Vaughan, G.E. Moore, Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: a comparison between normal and IUGR births, *Mol. Reprod. Dev.* 49 (1998) 229–235.
- 19) M.T. Calvo, A. Romo, J.J. Gutiérrez, E. Relaño, E. Barrio, A. Ferrández Longás, Study of genetic expression of intrauterine growth factors IGF-I and EGFR in placental tissue from pregnancies with intrauterine growth retardation, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 17 (2004) 445–450.
- 20) A. Okamoto, H. Endo, B. Kalionis, et al., IGFBP1 and Follistatin-like 3 genes are significantly up-regulated in expression profiles of the IUGR placenta, *Placenta* 27 (2006) 317–321.
- 21) R. Trollmann, K. Klingmüller, R.L. Schild, W. Rascher, J. Dötsch, Differential gene expression of somatotrophic and growth factors in response to in vivo hypoxia in human placenta, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197 (2007) 601.e1–601.e6.
- 22) E. Barrio, M.T. Calvo, M.D. Miramar, et al., Study of apoptosis and related proteins, CRH and hPGH in placentas of newborns small for gestational age (SGA), *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 6 (2009) 337–342.
- 23) E. Struwe, G. Berzl, R. Schild, et al., Microarray analysis of placental tissue in intrauterine growth restriction, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 72 (2) (2010) 241–247.
- 24) A. Tzschope, E. Struwe, H. Blessing, et al., Placental 11beta-HSD2 gene expression at birth is inversely correlated with growth velocity in the first year of life after intrauterine growth restriction, *Pediatr. Res.* 65 (2009) 647–653.
- 25) M Koutsaki, S Sifakis, A Zaravinos et al., Decreased placental expression of hPGH, IGF-I and IGFBP-1 in pregnancies complicated by fetal growth restriction, *GH IGF Res* 21 (2011) 31–36.
- 26) A. Caufriez, F. Frankenne, G. Hennen, G. Copinschi, Regulation of maternal IGF-I by placental GH in normal and abnormal human pregnancies, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 265 (1993) E572–E577.

- 27) S. Sheikh, P. Satoskar, D. Bhartiya, Expression of insulin-like growth factor-1 and placental growth hormone mRNA in placentae: a comparison between normal and intrauterine growth retardation pregnancies, *Mol. Hum. Reprod.* 7 (2001) 287–292.
- 28) H. Dalçık, M. Yardimoğlu, B. Vural, et al., Expression of insulin-like growth factor in the placenta of intrauterine growth-retarded human fetuses, *Acta Histochem.* 103 (2001) 195–207.
- 29) S. Ozkan, B. Vural, C. Dalçık, A. Taş, H. Dalçık, Placental expression of insulin-like growth factor-I, fibroblast growth factor-basic and neural cell adhesion molecule in pregnancies with small for gestational age fetuses, *J. Perinatol.* 28 (2008) 468–474.
- 30) J.A. Chowen, D. Evain-Brion, J. Pozo, E. Alsat, L.M. García-Segura, J. Argente, Decreased expression of placental growth hormone in intrauterine growth retardation, *Pediatr. Res.* 39 (1996) 736–739.
- 31) H.S. Wang, J. Lim, J. English, L. Irvine, T. Chard, The concentration of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human umbilical cord serum at delivery: relation to fetal weight, *J. Endocrinol.* 129 (1991) 459–464.
- 32) E.K. Pallotto, H.W. Kilbride, Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction, *Clin. Obstet. Gynecol.* 49 (2006) 257–269.
- 33) A.A. Tzschoppe, E. Struwe, H.G. Dörr, et al., Differences in gene expression dependent on sampling site in placental tissue of fetuses with intrauterine growth restriction, *Placenta* 31 (3) (2010) 178–185.
- 34) M.L. Brizot, E. Jauniaux, A.T. Mckie, F. Farzaneh, K.H. Nicolaides, Placental expression of alpha and beta subunits of human chorionic gonadotrophin in early pregnancies with Down's syndrome, *Hum. Reprod.* 10 (1995) 2506–2509.
- 35) M.L. Brizot, J.A. Hyett, A.T. Mckie, N.A. Bersinger, F. Farzaneh, K.H. Nicolaides, Gene expression of human pregnancy-associated plasma protein-A in placenta from trisomic pregnancies, *Placenta* 17 (1996) 33–36.
- 36) K. Spencer, C.K. Yu, M. Savvidou, A.T. Papageorghiou, K.H. Nicolaides, Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler ultrasonography and maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A, free beta-human chorionic gonadotropin, activin A and inhibin A at 22+0 to 24+6 weeks' gestation, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 27 (2006) 658–663.
- 37) M. Chellakooty, K. Vangsgaard, T. Larsen, T. Scheike, J. Falck-Larsen, J. Legarth, et al., A longitudinal study of intrauterine growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 384–391.

38) M.C. Lacroix, J. Guibourdenche, J.L. Frendo, F. Muller, D. Evain-Brion, Human placental growth hormone — a review, *Placenta* 23 (2002) S87–S94.

39) R. Randhawa, P. Cohen, The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth, *Mol. Genet. Metab.* 86 (2005) 84–90.

40) A. Juul, K.W. Kastrup, S.A. Pedersen, N.E. Skakkebaek, Growth hormone (GH) provocative retesting of 108 young adults with childhood-onset GH deficiency and the diagnostic value of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 1195–1201.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο : Δημοσιεύσεις, ανακοινώσεις, τιμητικές διακρίσεις με βάση τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής

1) Δημοσιεύσεις σε διεθνή peer-review ιατρικά περιοδικά

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Decreased placental expression of *hPGH*, *IGF-I* and *IGFBP-1* in pregnancies complicated by fetal growth restriction

Maria Koutsaki^a, Stavros Sifakis^b, Apostolos Zaravinos^a, Dimitrios Koutroulakis^b, Ourania Koukoura^b, Demetrios A. Spandidos^{a,*}

^a Laboratory of Clinical Virology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2010

received in revised form 14 November 2010

accepted 5 December 2010

Available online 5 January 2011

Keywords:

Fetal growth

Fetal growth restriction

Human Placental Growth Hormone

Insulin-like Growth Factor-1

IGF-binding Protein 1

IGF-binding Protein 3

ABSTRACT

Objective: The human Placental Growth Hormone (*hPGH*) and the Insulin-like Growth Factor (*IGF*) system are implicated in fetal development. This study aimed to evaluate the expression of *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1* and *IGFBP-3* genes in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction (*FGR*).

Design: The study group was comprised of term placentas from 47 *FGR*-complicated pregnancies of no recognizable cause. Thirty-seven placentas from normal pregnancies with appropriate for gestational age birth weight were used as controls. The expression status of the genes was evaluated by quantitative real-time PCR.

Results: *hPGH*, *IGF-I* and *IGFBP-1* exhibited significantly lower expression compared to the controls ($p = 0.003$, $p = 0.049$ and $p = 0.001$, respectively). Numerically, lower *IGFBP-3* expression was also demonstrated in the *FGR*-affected group, without however reaching statistical significance ($p = 0.129$). Significant co-expression patterns were detected among the study genes in both the *FGR* and normal pregnancies.

Conclusion: Decreased placental expression levels of *hPGH*, *IGF-I* and *IGFBP-1* were demonstrated in pregnancies with *FGR*. Whether these alterations are a causative factor of *FGR* or accompany other pathogenetic mechanisms requires further investigation.

© 2010 Growth Hormone Research Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fetal growth restriction (*FGR*) is an important obstetric complication affecting 5% of pregnancies [1]. This condition represents an in utero shift from the expected pattern of fetal growth potential into reduced birth weight leading to increased risk for intrauterine compromise, stillbirth, iatrogenic preterm birth and adverse perinatal and long-term outcomes [2]. The pathophysiological mechanisms leading to *FGR* remain unknown in particular in the absence of any antenatally recognizable cause – a condition called idiopathic *FGR* [1].

Human placental growth hormone (*hPGH*) and the insulin-like growth factor (*IGF*) system are implicated in normal fetal development [3–6]. *hPGH* is the product of the *GH-V* gene [7] specifically expressed in the syncytiotrophoblast layer of the human placenta [8] and gradually replaces pituitary *GH* in the maternal circulation. *hPGH* is also detectable in the fetal compartment according to recent studies in cord blood and amniotic fluid [9–11]. *hPGH* has important implications for physiological adjustment to gestation by increasing nutrient availability for the fetoplacental unit [4,5]. This action is

exercised indirectly, probably by regulating the maternal levels of the insulin-like growth factor 1 (*IGF-I*) [4,5,12]. Furthermore, the presence of *hPGH* receptors in extravillous trophoblast suggests that its physiological role also includes a direct influence upon placental development and function via an autocrine and/or paracrine mechanism [13].

IGF-I is a strong mitogen that promotes cell proliferation and differentiation, possessing a critical role in mediating fetal and postnatal growth [6,14,15]. The actions of *IGF-I* in the circulation and the extracellular matrix are modulated by the presence of the insulin-like growth factor-binding proteins, mainly 1 and 3 (*IGFBP-1* and *IGFBP-3*) [14,15]. The human *IGFBP-1* and *IGFBP-3* genes are contiguous and located on chromosome 7 [16]. *IGFBP-3* is the most abundant *IGFBP* in the circulation and prolongs *IGF* half-life in plasma providing an *IGF* reservoir for target tissues. *IGFBP-1* and *IGFBP-3* also show *IGF*-independent actions, such as inhibition of growth and stimulation of apoptosis [14,15].

Several studies have demonstrated altered concentrations of *hPGH*, *IGF-I* and *IGFBPs* in the maternal circulation and fetal compartment in pregnancies with *FGR* [9,10,12,17–27]. Little is known, however, about the actual expression profile of these molecules in the human placenta of *FGR*-affected pregnancies. Our study aimed to evaluate the expression status of the *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1* and *IGFBP-3* genes in placentas from human *FGR* pregnancies of no apparent etiology.

* Corresponding author. Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, P.O. Box 2208, Heraklion 71003, Crete, Greece. Tel.: +30 210 722 7809; fax: +30 210 725 2922.

E-mail address: spandidos@spandidos.gr (D.A. Spandidos).

2. Materials and methods

2.1. Participants

Our study group was comprised of term placentas from 47 pregnancies complicated by FGR of no apparent etiology. A panel of 37 placentas from pregnancies that resulted in the birth of healthy neonates with birth weight appropriate for gestational age and gender was used as the control group. The gestational age, for both FGR and control pregnancies, was calculated by last menstrual period dates and sonographic assessment at 11–13 weeks of pregnancy. Patients in the FGR group did not display clinical, sonographic or laboratory evidence of preeclampsia or other antenatally recognizable causes of FGR, such as congenital abnormalities or chromosomal aberrations of the fetus, and intrauterine infections by the STORCH group. They were recruited among pregnant women who were followed up for FGR at the Division of Maternal Fetal Medicine, 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.

Birth weight was expressed as a percentile corrected for gestation at delivery and included variables such as sex, maternal racial origin, weight, height and parity. The newborn was considered to be intra utero growth restricted if the birth weight percentile was less than 5% [28]. Demographic data of the mothers were recorded prior to and after birth (age, parity, previous medical and gynaecological history, potential pregnancy-associated complications, weight and maximal weight gained at pregnancy, height, body mass index (BMI), duration of gestation, mode of delivery, smoking and ethnicity of both parents). None of the pregnant women included in the study were diabetic, and the glucose tolerance test during pregnancy was normal in all the participants. At birth, clinical data concerning the newborns and the perinatal outcome were recorded.

2.2. Tissue collection and RNA extraction

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 mm³ 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 processed. Total RNA was extracted from each specimen using a power homogenizer and the TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsband, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were calculated after measuring its absorbance (260 nm) and absorbance ratio (260/280 nm), respectively, on a UV spectrophotometer.

2.3. Reverse transcription and real-time PCR

Reverse transcription was performed using the RETROscript first strand synthesis kit (AMBION, Austin, TX), from 0.5 µg of total RNA. Random hexamers were used as amplification primers. Real-time PCR was applied to quantify the mRNA expression of all four genes (*PGH*, *IGF-1*, *IGFBP-1* and *IGFBP-3*). The reactions were carried out using the Mx3000P real-time PCR system (Stratagene, La Jolla, CA) with the application of the SYBR[®] Green I Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA), according to the manufacturer's instructions. Data were collected and analyzed using Mx3000P real-time PCR software version 2.00, Build 215 Schema 60 (Stratagene La Jolla, CA). Primer pair sequences and PCR product sizes are listed in Table 1. GAPDH and RPL13A genes were used as internal controls. However, normalization of the gene expression levels was determined with GAPDH, the most stable housekeeping gene. The primer pairs were designed to span at least

Table 1

Primer sequences used for quantitative real-time RT-PCR.

Gene	Primer pair sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>IGF-1</i>	CCTCTCCGCATCTCTTACCTG CTGCTGGAGCCATACCTGTG	166
<i>IGFBP-1</i>	TAACTGAGGAGGAGCTCTGGATA TTTGGAAATTTCTCTCTGATGTC	215
<i>IGFBP-3</i>	AAGACAGCCAGCCCTACAAG TACGGCAGGGACCATAITCTG	102
<i>hPGH</i>	AGAACCCTCCAGACTCCCT TGGCAGCAGCTCTAGGTTAG	96
<i>GAPDH</i>	GGAAGCTGAAGTCCGACTCA GTCTTGTATGGCAACATATGCACT	101
<i>RPL13A</i>	CCTGGAGGAGAAGAGAAA TGAGGACCTCTGTCTATTTGTC	125

one intron in order to avoid amplification of the contaminating genomic DNA along with cDNA.

One µL cDNA from normal or FGR-complicated placental samples, respectively, was amplified in a PCR reaction with 2× Brilliant SYBR[®] Green QPCR Master Mix (containing 2.5 mM MgCl₂), 300 nM of each primer and 30 µM Rox passive reference dye in a final volume of 20 µL. After initial denaturation at 95 °C for 10 min, samples were subjected to 40 amplification cycles comprising denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at a specific temperature for each gene for 30 s, and elongation at 72 °C for 30 s. Annealing temperatures for each gene, were as follows: 60 °C for *IGF-1*, *hPGH*, *IGFBP-3* and *GAPDH*; 53 °C for *RPL13A* and 55 °C for *IGFBP-1*. Amplification and elongation steps were followed by a melt curve analysis in which the temperature was increased from 55 °C to 95 °C at a linear rate of 0.2 °C/s. Data collection was performed during both annealing and extension, with two measurements at each step and at all times during melt curve analysis. To verify the results of the melt curve analysis, PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed on a UV light transilluminator. Two negative controls were included in each PCR reaction, one with no cDNA template and one with no reverse transcription treatment. Gene transcription levels were calculated as previously reported [29].

A 2-fold increased or decreased expression was considered to be significant (over-expression or down-regulation, respectively). All samples were treated in duplicate.

2.4. Statistical analysis

Numerical values were expressed as the median (range). Differences between FGR and control samples were calculated using Mann–Whitney U test. Correlation analysis between the mRNA levels of the genes was performed using Pearson's bivariate-correlation coefficient test. *P*-values <0.05 were considered as statistically significant. Analyses were performed using SPSS v.15 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Demographic characteristics

Table 2 summarizes the main clinical data of both mothers and neonates. No statistically significant difference was detected between the study and control groups, except for cigarette smoking that was more frequent in the FGR group. With regard to pregnancy outcome, the FGR-affected pregnancies exhibited shorter gestational age at delivery compared to the controls, and higher caesarean section rate, as anticipated (*p* < 0.001).

3.2. Expression in the placenta

The Real-Time PCR results are shown in Fig. 1. The median (range) mRNA expression for *hPGH* was 0.06 (0.0004–0.95) in the control

Table 2
Main characteristics of the women enrolled in the study and the outcome of normal and FGR complicated pregnancies.

Maternal characteristics	FGR pregnancies	Normal pregnancies	p value
	N=47	N=37	
Age in years: mean (range)	28.34 (19–43)	28.62 (18–44)	0.831 ^a
Primiparity: n (%)	25 (53.1)	20 (54.0)	0.662 ^b
Cigarette smoker: n (%)	14 (29.7)	10 (27.0)	0.004 ^b
BMI in kg/m ² : mean (±SD)	23.74 (±4.78)	22.15 (±2.85)	0.107 ^a
Pregnancy outcome			
Fetal gender: male: n (%)	18 (38.2)	22 (61.1)	0.109 ^b
Gestational age at delivery in days: mean (±SD)	251.54 (±27.37)	271.13 (±9.91)	<0.001 ^a
Caesarean section: n (%)	34 (72.3)	10 (27)	<0.001 ^b

BMI: Body Mass Index; SD: Standard Deviation.

^a t-test for two independent samples.

^b Chi-square test.

group and 0.03 (0.0002–0.15) in the FGR group, with a statistically significant difference between the two groups ($p=0.003$). The median (range) mRNA expression for *IGF-I* and *IGFBP-1* in the control group was 0.002 (7×10^{-6} –0.026) and 0.01 (0.0001–1.03) respectively. The corresponding values for the FGR-affected group were 0.002 (1.1×10^{-5} –0.008) and 0.01 (0.0001–0.18), respectively, with a statistically significant difference between the two groups, $p=0.049$ for *IGF-I* and $p=0.001$ for *IGFBP-1*. In the case of *IGFBP-3*, although the median expression was lower in the FGR group 0.12 (0.0002–1) compared with the controls 0.5 (0.0003–2.73), the difference was not statistically significant ($p=0.129$). The differences in the expression of the examined genes in the groups of comparison remained statistically significant after adjustment for age and smoking. Hence,

we found that in 3 out of 4 of the genes studied, the expression in FGR placentas was statistically significantly lower compared with control placentas obtained from normal pregnancies.

3.3. Correlation analysis

Correlations between the mRNA expression levels of each gene and clinical information, including maternal age, parity, smoking, BMI, gestational age at delivery, fetal gender and birth weight percentile were examined. No significant correlation was produced. In the FGR group, significant co-expression patterns were detected among all of the genes studied pairwise (Table 3). In addition, a strong positive correlation was revealed between the genes of *hPGH* and *IGFBP-1* ($p<0.001$), *hPGH* and *IGFBP-3* ($p<0.001$), *IGFBP-1* and *IGFBP-3* ($p<0.001$) and *IGF-I* and *IGFBP-3* ($p<0.001$). In the control group, *hPGH* and *IGFBP-3* was the unique couple of genes that correlated positively ($p=0.012$). Adjustment for age and smoking did not change the co-expression patterns.

4. Discussion

As *hPGH* and the IGF axis have a critical role in fetal and postnatal growth [5,15] we focused concomitantly on the expression profile of 4 genes *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1* and *IGFBP-3*. We found decreased placental expression of *hPGH*, *IGF-I* and *IGFBP-1*, along with positive gene co-expression patterns, in pregnancies demonstrating idiopathic FGR. Table 4 displays the results of similar studies by the use of qRT-PCR, which included a relatively limited number of examined cases.

Decreased maternal serum levels of *hPGH* and *IGF-I* have been observed in pregnancies with impaired fetal growth attributed to placental insufficiency [12,18,24,25]. Regarding the placental expression of these molecules, we found decreased expression of *IGF-I*, in

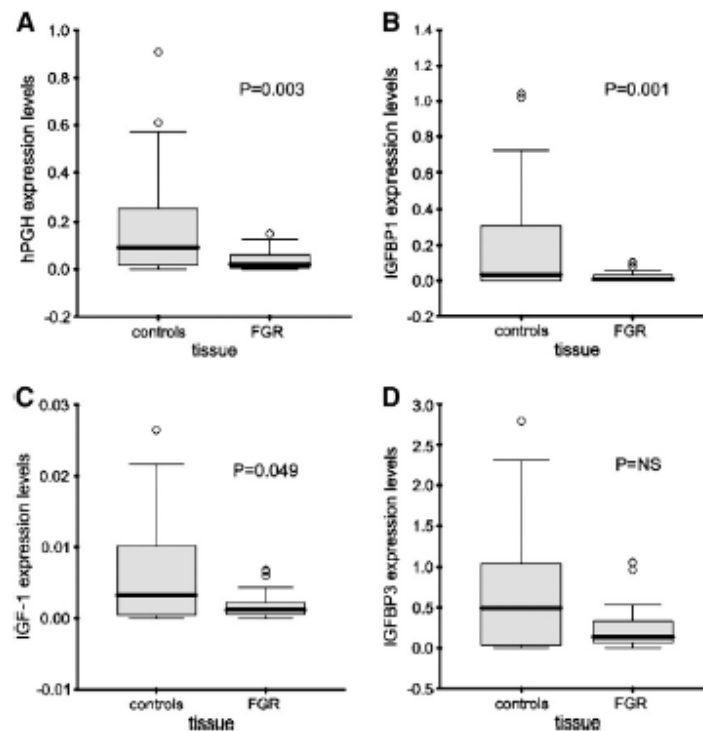


Fig. 1. Placental *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1* and *IGFBP-3* gene expression levels in pregnancies demonstrating fetal growth restriction and control samples. Boxplots show the 25th, 50th (median), and 75th percentile values. Whiskers show the minimum and maximum values.

Table 3
Correlations of the placental expression of the *IGF-I*, *IGFBP-1*, *IGFBP-3* and *hPGH* in FGR and control pregnancies.

FGR pregnancies		<i>IGF-I</i>	<i>IGFBP-1</i>	<i>IGFBP-3</i>	<i>hPGH</i>
<i>IGF-I</i>	CC				
	P				
<i>IGFBP-1</i>	CC	0.506			
	P	0.002^a			
<i>IGFBP-3</i>	CC	0.667	0.827		
	P	<0.001^a	<0.001^{a,b}		
<i>hPGH</i>	CC	0.506	0.677	0.773	
	P	0.002^a	<0.001^{a,b}	<0.001^{a,b}	
Control pregnancies		<i>IGF-I</i>	<i>IGFBP-1</i>	<i>IGFBP-3</i>	<i>hPGH</i>
<i>IGF-I</i>	CC				
	P				
<i>IGFBP-1</i>	CC	0.153			
	P	0.352			
<i>IGFBP-3</i>	CC	0.026	0.017		
	P	0.877	0.915		
<i>hPGH</i>	CC	0.021	0.066	0.376	
	P	0.899	0.673	0.012^b	

Bold writing implies statistically significant correlations; CC: Correlation Coefficient.

^a Correlation is significant at the level of $P < 0.01$ (2-tailed).

^b Correlation is significant at the level of $P < 0.05$ (2-tailed).

agreement with a previous report by Calvo et al. (2004) [31] in a comparable small cohort of idiopathic FGR pregnancies (Table 4). We also found decreased *hPGH* expression, contrary to other reports where no differences were reported between FGR-affected and normal pregnancies ([33,34], Table 4). Barrio et al. (2009) showed that placental mRNA levels of *hPGH* exhibited a tendency towards a down-regulation [34]. In a number of studies using in situ hybridization or immunohistochemistry conflicting results showed that the transcription of *hPGH* and *IGF-I* was either increased [37–39] or decreased [40]. Our results contradict the increased *IGFBP-1* placental expression shown by others ([32,35], Table 4). Furthermore, *IGFBP-1* levels in both fetal and maternal circulations are inversely correlated with birth weight [20,24,25,41]. Our study is the first one assessing the placental expression of *IGFBP-3* in FGR pregnancies and found no differences between affected and normal pregnancies, while increased circulating levels have been reported in pregnancies demonstrating FGR [24,25]. Further investigation is required for the evaluation of both the transcription and the circulating levels of *IGFBP-1* and *IGFBP-3* in pregnancies complicated with impaired fetal growth.

Only speculations can be given for the discrepancies in the assessment of *hPGH* and IGF-axis genes in the placenta and the

maternal circulation of FGR-affected pregnancies. Firstly, the differences in the examined population due to the large heterogeneity and the diversity of the underlying causes of FGR [2] as well as the variety in the gestational age of maternal sampling or placental biopsies. In particular, Tzschoppe et al. (2010) showed that differences in the sampling site may contribute to variability in gene expression across the placental disk in placentas from FGR-affected pregnancies. Since these placentas represent diseased tissue and show characteristic hypoxic/ischemic changes, it may result in more dramatic changes in gene expression levels [42]. Secondly, posttranscriptional and/or posttranslational modifications may affect the measured levels of the hormones/proteins in the circulation, not always corresponding to the placental expression [37,43,44]. These modifications are associated with protein stability, alterations in the release mechanism of the protein, impaired protein transport across the placenta or modified serum stability of the hormones [44]. Furthermore, a change in the circulating levels of placental origin hormones/proteins, such as *hPGH* and PAPP-A, has been shown between the preclinical stage and the clinical manifestation of conditions associated with retarded fetal growth and placental insufficiency [9,10,12,18,25,45]. Lastly, the multiple roles of the *IGFBP-1* and *IGFBP-3* in placental development and fetal growth that includes both *IGF-I*-dependent and independent actions [14,15] may have an impact on the results obtained in the particular assessment.

The above observations and speculations might partly explain the absence of correlation between mRNA expression levels and the birth weight percentiles in the FGR pregnancies. However, limitations of this study such as the lack of measurements of maternal serum concentrations of the proteins, the placental weights, and the protein expression in the placenta do not allow further elucidation at this point. Despite the differences in mRNA placental expression between the growth restricted and the control group it remains to be elucidated whether the downregulation of *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1* genes comprises part of the underlying pathogenetic mechanisms or is an unrelated observation.

We revealed significant positive co-expression patterns between all of the genes studied in the FGR group. It is considered that *IGF-I* is probably regulated by *hPGH* [3,4] independent of the gestational age [12,18]. Furthermore, several studies have found a positive correlation between serum *hPGH* and *IGF-I* values in cross-sectional and longitudinal studies both in normal and FGR pregnancies [3,5,12,25]. The co-expression pattern of the placental expression of *hPGH* and *IGF-I* in our study supports these findings. We observed a strong correlation between *IGFBP-3* and *IGF-I* in the FGR group, which has also been shown in a study assessing cord blood in FGR pregnancies [27]. *IGFBP-3* is the primary binding protein that extends the half-life of *IGF-I* in the circulation [6] and could be considered as an index of

Table 4

Placental expression of *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1*, and *IGFBP-3* in human pregnancies complicated by FGR, using qRT-PCR. With the exception of the study by Trollmann et al., all studies include FGR-affected pregnancies unrelated to any known pathology.

Author, year (Ref. #)	Samples (n)		<i>hPGH</i>	<i>IGF-I</i>	<i>IGFBP-1</i>	<i>IGFBP-3</i>
	FGR	Controls				
Abu-Amero et al., 1998 [30]	9	9		NS		
Calvo et al., 2004 [31]	31	42		↓ $P = 0.008$		
Street et al., 2006 [26]	16	20		NS	NS	
Okamoto et al., 2006 [32]	4	4			↑	
Trollmann et al., 2007 [33]	6/22*	28	NS	NS		
Barrio et al., 2009 [34]	50	50	NS			
Struwe et al., 2010 [35]	27	35			↑	
Tzschoppe et al., 2009 [36]	14	15			NS	
present study	47	37	↓ $P = 0.003$	↓ $P = 0.049$	↓ $P = 0.001$	NS

↓: Statistically significant down-regulation in the expression of the particular gene;

↑: Statistically significant up-regulation in the expression of the particular gene;

NS: Non-significant variation in the expression;

*: 22 pregnancies complicated by chronic placental hypoxia including idiopathic FGR (6 cases), preeclampsia (8 cases), birth weight <10th centile (5 cases), gestational diabetes (2 cases), and nicotine abuse (1 case).

the functionality of the growth hormone-IGF-I axis in the nonpregnant state [46]. We also found a strong correlation between *IGFBP-3* and *hPGH* in the FGR group, which is in concordance with other investigators [25]. Interestingly, this co-expression pattern was the only one maintained in the control group.

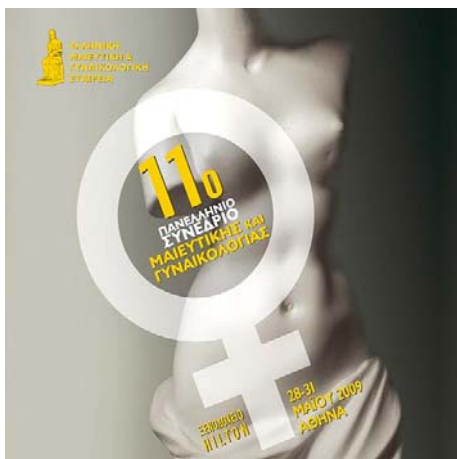
A drawback of this study may be the lack of gestational age-matched controls that would offer more appropriate groups for comparison. There are no studies to show changes in the placental expression of *hPGH*, and *IGFBP-3* throughout the last weeks of normal pregnancy. In a study by Street et al. (2006) the expression of *IGF-I* and *IGFBP-1* gene in the placenta decreases from 35–37 weeks to 38–40 weeks [47]. In pregnancies complicated with preterm delivery decreased levels of *IGFBP-1* in placental extracts [48] increased levels of *IGFBP-1* in cervical secretion, and the amniotic fluid [49–51] and decreased *IGFBP-3* concentrations in the maternal circulation [52] have been found. This may reflect changes in the placental expression of these genes, which, however, has not yet been investigated. As preterm delivery may be the consequence of pathological conditions of the pregnancy with unknown effects on the gene expression in the placenta, we opted to include in the normal group placentas from uncomplicated pregnancies ending in term delivery. Despite the difference in the gestational age of sampling (35.9±3.9 vs. 38.7±1.4 weeks, Table 2), we consider that the results of our study retain their value in the evaluation of the expression of *hPGH*, *IGF-I*, *IGFBP-1* and *IGFBP-3* genes in the third trimester placentas of FGR-affected pregnancies. Furthermore, the difference in the mode of delivery between the studied groups probably had no effect on the obtained results. No differences have previously been found in the concentration of *hPGH* in the maternal blood and the amniotic fluid in respect to caesarean section or vaginal delivery [53,54]. Despite the lack of data regarding the particular genes of this study, it has been shown that gene expression in a near term placenta is not significantly altered by labor, suggesting that the mode of delivery has no major implication in the interpretation of results of genomic studies on placenta [55].

Additional studies are required to elucidate whether the decreased placental expression of *hPGH*, *IGF-I* and *IGFBP-1* in pregnancies with idiopathic FGR is etiologically related to this condition or accompanies other pathogenetic mechanisms.

References

- [1] A. Romo, R. Carceller, J. Tobajas, Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology, *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 6 (2009) 332–336.
- [2] E.K. Palotto, H.W. Kilbride, Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction, *Clin. Obstet. Gynecol.* 49 (2006) 257–269.
- [3] M. Chellakoty, K. Vanggaard, T. Larsen, T. Schelke, J. Falck-larsen, J. Legarth, et al., A longitudinal study of intrauterine growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor 1 axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 384–391.
- [4] M.C. Lacroix, J. Guibourdenche, J.L. Frendo, F. Müller, D. Evain-Brion, Human placental growth hormone – a review, *Placenta* 23 (2002) S87–S94.
- [5] J. Fuglsang, P. Ovesen, Aspects of placental growth hormone physiology, *Growth Horm. IGF Res.* 16 (2006) 67–85.
- [6] R. Kandhava, P. Cohen, The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth, *Mol. Genet. Metab.* 86 (2005) 84–90.
- [7] F. Franke, M.L. Scippo, J. Van Breenen, A. Igout, G. Hennen, Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 7 (1990) 15–18.
- [8] F. Franke, F. Remer-Debrue, M.L. Scippo, J. Marsal, G. Hennen, Expression of the growth hormone variant gene in human placenta, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64 (1987) 635–637.
- [9] E. Papadopoulou, S. Sifakis, E. Giannakis, et al., Increased human placental growth hormone at midtrimester pregnancies may be an index of intrauterine growth retardation related to preeclampsia, *Growth Horm. IGF Res.* 16 (2006) 290–296.
- [10] A.A. Tzschoppe, E. Struwe, H.G. Dörr, et al., Differences in gene expression dependent on sampling site in placental tissue of fetuses with intrauterine growth restriction, *Placenta* 31 (3) (2010) 178–185.
- [11] M.L. Britoz, E. Jauniaux, A.T. Mckie, F. Farzaneh, K.H. Nicolaides, Placental expression of alpha and beta subunits of human chorionic gonadotropin in early pregnancies with Down's syndrome, *Hum. Reprod.* 10 (1995) 2506–2509.
- [12] M.L. Britoz, J.A. Hyett, A.T. Mckie, N.A. Bersinger, F. Farzaneh, K.H. Nicolaides, Gene expression of human pregnancy-associated plasma protein-A in placenta from trisomic pregnancies, *Placenta* 17 (1996) 33–36.
- [13] K. Spencer, C.K. Yu, M. Savvidou, A.T. Papageorgiou, K.H. Nicolaides, Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler ultrasonography and maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A free beta-human chorionic gonadotropin, activin A and inhibin A at 22+0 to 24+6 weeks' gestation, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 27 (2006) 658–663.
- [14] A. Juul, K.W. Kastrup, S.A. Pedersen, N.E. Skakkebaek, Growth hormone (GH) provocative retesting of 108 young adults with childhood-onset GH deficiency and the diagnostic value of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-binding protein-3, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 1195–1201.
- [15] M.E. Street, P. Seghini, M.A. Ziveri, et al., Interleukin-6 and insulin-like growth factor system relationships and differences in the human placenta and fetus from the 35th week of gestation, *Growth Horm. IGF Res.* 16 (2006) 365–372.
- [16] F. Franke, E. Alsat, M.L. Scippo, A. Igout, G. Hennen, D. Evain-Brion, Evidence for the expression of growth hormone receptors in human placenta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182 (1992) 481–486.
- [17] M.M. Kechler, D.R. Clemmons, Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins, *Trends Endocrinol. Metab.* 9 (1998) 176–183.
- [18] R. Montzavi, P. Cohen, IGFs and IGFBPs: role in health and disease, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 16 (2002) 433–447.
- [19] P.D. Lee, L.C. Giudice, C.A. Conover, D.R. Powell, Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 216 (1997) 319–357.
- [20] C. Lassarre, S. Hardouin, F. Daffos, F. Forestier, F. Franke, M. Binoux, Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in subjects with intrauterine growth retardation, *Pediatr. Res.* 29 (1991) 219–225.
- [21] V. Mirlesse, F. Franke, E. Alsat, M. Pouchet, G. Hennen, D. Evain-Brion, Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation, *Pediatr. Res.* 34 (1993) 439–442.
- [22] K. Langford, W. Blum, K. Nicolaides, J. Jones, A. McGregor, J. Miell, The pathophysiology of the insulin-like growth factor axis in fetal growth failure: a basis for programming by under nutrition? *Eur. J. Clin. Invest.* 24 (1994) 851–856.
- [23] L.C. Giudice, F. de Zegher, S.E. Gargosky, et al., Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and pre-term human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 1548–1555.
- [24] K.S. Langford, K.H. Nicolaides, J. Jones, A. Abbas, A.M. McGregor, J.P. Miell, Serum insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) levels and IGFBP-3 protease activity in normal, abnormal and multiple human pregnancy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 21–27.
- [25] J.A. Spencer, T.C. Chang, J. Jones, S.C. Robson, M.A. Preece, Third trimester fetal growth and umbilical venous blood concentrations of IGF-I, IGFBP-1 and growth hormone at term, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 73 (1995) 187–190.
- [26] J. Leger, J.F. Oury, M. Noel, et al., Growth factors and intrauterine growth retardation. I. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein 3 levels in normally grown and growth-retarded human fetuses during the second half of gestation, *Pediatr. Res.* 40 (1996) 94–100.
- [27] R. Holmes, R. Montemagno, J. Jones, M. Preece, C. Rodeck, P. Soothill, Fetal and maternal plasma insulin-like growth factors and binding proteins in pregnancies with appropriate or retarded fetal growth, *Early Hum. Dev.* 49 (1997) 7–17.
- [28] J.L.D. McIntyre, R. Senek, D.L. Crane, et al., Placental growth hormone (GH), GH-binding protein and insulin-like growth factor axis in normal, growth-retarded, and diabetic pregnancies: correlations with fetal growth, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 1143–1150.
- [29] M.E. Street, P. Seghini, S. Heni, et al., Changes in interleukin 6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls, *Eur. J. Endocrinol.* 155 (2006) 567–574.
- [30] R. Veikskiene, J. Beltrand, O. Claris, et al., Impact of fetal growth restriction on body composition and hormonal status at birth in infants of small and appropriate weight for gestational age, *Eur. J. Endocrinol.* 157 (2007) 605–612.
- [31] J. Gardos, A. Francis, Software program for the calculation of customized birth weight percentiles, Version 6.2, 2000–2007, 15 April 2010, Available at: <http://www.gestation.net>. Retrieved.
- [32] A. Zaravinos, J. Bizakis, D.A. Spandidos, RBP and BRAF aberrations in human nasal polyps and the adjacent turbinate mucosae, *Cancer Lett.* 264 (2008) 288–298.
- [33] S.N. Abu-Amero, Z. Ali, P. Bernmet, J.L. Vaughan, G.E. Moore, Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in term placentas: a comparison between normal and IUGR births, *Mol. Reprod. Dev.* 49 (1998) 229–235.
- [34] M.T. Galvo, A. Romo, J.J. Gutiérrez, E. Reliño, E. Barrio, A. Ferrández Longás, Study of genetic expression of intrauterine growth factors IGF-I and IGF-II in placental tissue from pregnancies with intrauterine growth retardation, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 17 (2004) 445–450.
- [35] A. Okamoto, H. Endo, B. Kallman, et al., IGFBP1 and IGF-like 3 genes are significantly up-regulated in expression profiles of the IUGR placenta, *Placenta* 27 (2006) 317–321.
- [36] R. Trollmann, K. Klingmüller, R.L. Schild, W. Rascher, J. Dötsch, Differential gene expression of somatotropic and growth factors in response to in vivo hypoxia in human placenta, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197 (2007) 601.e1–601.e6.
- [37] E. Barrio, M.T. Galvo, M.D. Miramar, et al., Study of apoptosis and related proteins, GH and hPGH in placentas of newborns small for gestational age (SGA), *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 6 (2009) 337–342.
- [38] E. Struwe, G. Berál, R. Schild, et al., Microarray analysis of placental tissue in intrauterine growth restriction, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 72 (2) (2010) 241–247.
- [39] A. Tzschoppe, E. Struwe, H. Hiesing, et al., Placental 11beta-HSD2 gene expression at birth is inversely correlated with growth velocity in the first year of life after intrauterine growth restriction, *Pediatr. Res.* 65 (2009) 647–653.
- [40] S. Sheikh, P. Satoskar, D. Bhartiya, Expression of insulin-like growth factor-1 and placental growth hormone mRNA in placenta: a comparison between normal and intrauterine growth retardation pregnancies, *Mol. Hum. Reprod.* 7 (2001) 287–292.
- [41] H. Dalçık, M. Yardioglu, B. Vural, et al., Expression of insulin-like growth factor in the placenta of intrauterine growth-retarded human fetuses, *Acta Histochem.* 103 (2001) 195–207.
- [42] S. Özkan, B. Vural, C. Dalçık, A. Taş, H. Dalçık, Placental expression of insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor-basic and neural cell adhesion molecule in pregnancies with small for gestational age fetuses, *J. Perinatol.* 28 (2008) 468–474.
- [43] J.A. Chowen, D. Evain-Brion, J. Pozo, E. Alsat, L.M. García-Segura, J. Argente, Decreased expression of placental growth hormone in intrauterine growth retardation, *Pediatr. Res.* 39 (1996) 736–738.
- [44] H.S. Wang, J. Lim, J. English, L. Irvine, T. Chard, The concentration of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human umbilical cord serum at delivery: relation to fetal weight, *J. Endocrinol.* 129 (1991) 459–464.
- [45] A.A. Tzschoppe, E. Struwe, H.G. Dörr, et al., Differences in gene expression dependent on sampling site in placental tissue of fetuses with intrauterine growth restriction, *Placenta* 31 (3) (2010) 178–185.
- [46] M.L. Britoz, E. Jauniaux, A.T. Mckie, F. Farzaneh, K.H. Nicolaides, Placental expression of alpha and beta subunits of human chorionic gonadotropin in early pregnancies with Down's syndrome, *Hum. Reprod.* 10 (1995) 2506–2509.
- [47] M.L. Britoz, J.A. Hyett, A.T. Mckie, N.A. Bersinger, F. Farzaneh, K.H. Nicolaides, Gene expression of human pregnancy-associated plasma protein-A in placenta from trisomic pregnancies, *Placenta* 17 (1996) 33–36.
- [48] K. Spencer, C.K. Yu, M. Savvidou, A.T. Papageorgiou, K.H. Nicolaides, Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler ultrasonography and maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A free beta-human chorionic gonadotropin, activin A and inhibin A at 22+0 to 24+6 weeks' gestation, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 27 (2006) 658–663.
- [49] A. Juul, K.W. Kastrup, S.A. Pedersen, N.E. Skakkebaek, Growth hormone (GH) provocative retesting of 108 young adults with childhood-onset GH deficiency and the diagnostic value of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and IGF-binding protein-3, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 1195–1201.
- [50] E.A. Hills, L.K. Gum, P. Hardiman, S. Thamaratnam, T. Chard, IGFBP-1 in the placenta, membranes and fetal circulation: levels at term and preterm delivery, *Early Hum. Dev.* 44 (1996) 71–76.
- [51] M. Kekki, T. Kurki, T. Kirikkäinen, V. Hilesmaa, J. Paavonen, E.M. Rutanen, Insulin-like growth factor-binding protein-1 in cervical secretion as a predictor of preterm delivery, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 80 (2001) 546–551.
- [52] H.M. Tamir, T. Sener, Z. Yildiz, Cervical phosphorylated insulin-like growth factor binding protein-1 for the prediction of preterm delivery in symptomatic cases with intact membranes, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 35 (2009) 66–72.
- [53] S.E. Lee, B.D. Han, I.S. Park, R. Romero, B.H. Yoon, Evidence supporting proteolytic cleavage of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) protein in amniotic fluid, *J. Perinat. Med.* 36 (2008) 316–323.
- [54] S.M. Cooley, J.C. Donnelly, C. Collins, M.P. Geary, C.H. Rodeck, P.C. Hindmarsh, The relationship between maternal insulin-like growth factors 1 and 2 (IGF-1, IGF-2) and IGFBP-3 to gestational age and preterm delivery, *J. Perinat. Med.* 38 (2010) 255–259.
- [55] J. Fuglsang, P. Sandager, N. Møller, S. Fisker, H. Orskov, P. Ovesen, Kinetics and secretion of placental growth hormone around parturition, *Eur. J. Endocrinol.* 154 (2006) 449–457.
- [56] P. Mittal, S.S. Hassan, J. Espinoza, et al., The effect of gestational age and labor on placental growth hormone in amniotic fluid, *Growth Horm. IGF Res.* 18 (2008) 174–179.
- [57] V. Straz, R.H. Paulsen, H. Granas, A. Värtan, C. Acharya, Gene expression profile in labouring and non-labouring human placenta near term, *Mol. Hum. Reprod.* 14 (2008) 61–65.

2) Ανακοινώσεις σε συνέδρια



Μελέτη της έκφρασης στον πλακούντα των γονιδίων της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH), του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα-1 (IGF-1) και των δεσμευτικών του πρωτεϊνών 1 (IGFBP-1) και 3 (IGFBP-3) σε κήσεις με ενδομήτρια υπολειπομένη ανάπτυξη

Κουτσάκη Μ¹, Σηφάκης Σ², Ζαραβίνος Α¹, Κουτρουλάκης Δ², Κούκουρα Ο², Σπαντίδος Δ¹.

(1) Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο

(2) Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης

Σκοπός: η παθοφυσιολογία και οι υποκείμενοι αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί της ενδομήτριας υπολειπόμενης εμβρυικής ανάπτυξης (IUGR) παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Η πλακουντιακή αυξητική ορμόνη (hPGH) και μια σειρά από αυξητικοί παράγοντες συμμετέχουν στη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη ενώ μεταβολές των συγκεντρώσεών τους στη μητρική ή εμβρυϊκή κυκλοφορία έχουν παρατηρηθεί σε IUGR κήσεις. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η διερεύνηση της έκφρασης στον πλακούντα των γονιδίων της hPGH, του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-I) και των δεσμευτικών του πρωτεϊνών 1 (IGFBP-1) και 3 (IGFBP-3) σε κήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Υλικό και Μέθοδος: εξετάσθηκαν ιστοτεμάχια πλακούντα από 52 κήσεις με IUGR (ομάδα μελέτης) μη σχετιζόμενης με προεκλαμψία, γενετικά νοσήματα ή λοιμώξεις καθώς και από 42 κήσεις με ομαλή έκβαση και φυσιολογικού βάρους γέννησης νεογνά (ομάδα ελέγχου). Η διάγνωση της ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης (βάρος σώματος <5^η ΕΘ για την ηλικία κύησης) έγινε με διαδοχικούς υπερηχογραφικούς ελέγχους. Τα δείγματα πλακούντα διατηρήθηκαν στους -70^ο C μέχρι την επεξεργασία τους. Μετά την εκχύλιση των δειγμάτων και την εξαγωγή mRNA ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου RT-PCR με τη χρησιμοποίηση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (primers), με στόχο την ποσοτική ανίχνευση της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων.

Αποτελέσματα: Τα επίπεδα έκφρασης τριών από τα γονίδια που μελετήθηκαν βρέθηκαν ελαττωμένα στους πλακούντες των κήσεων με IUGR συγκριτικά με τις φυσιολογικές κήσεις: hPGH (P=0.003), IGF1 (P=0.049) και IGFBP1 (P=0.001). Τα επίπεδα έκφρασης της IGFBP3 ήταν επίσης ελαττωμένα στις IUGR κήσεις, χωρίς ωστόσο οι διαφορές να είναι στατιστικά σημαντικές. Ανάλυση συσχέτισης (non-parametric Spearman's bivariate correlation-coefficient test) έδειξε στατιστικά σημαντική

παρουσία προτύπου συνέκφρασης (co-expression pattern) των υπό εξέταση γονιδίων, τόσο στις IUGR κυήσεις ($P=0.01$) όσο και στις φυσιολογικές ($P=0.05$). Δεν αναγνωρίστηκαν ωστόσο στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων τόσο μεταξύ τους όσο και με μια σειρά από κλινικές παραμέτρους (ηλικία κύησης, ΔΜΣ, βάρος γέννησης κ.ά).

Συζήτηση: σε κυήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης παρατηρούνται ελαττωμένα επίπεδα hPGH - ορμόνης που προάγει την προσαρμογή του μητρικού μεταβολισμού στην εγκυμοσύνη και ρυθμίζει έμμεσα την εμβρυϊκή ανάπτυξη μέσω του ελέγχου της μεταφοράς οξυγόνου, γλυκόζης και αμινοξέων από τον πλακούντα καθώς και μέσω άλλων μηχανισμών. Οι παραπάνω επιδράσεις της hPGH ευοδώνονται μέσω της ρύθμισης των επιπέδων του IGF1, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης στον πλακούντα βρέθηκαν επίσης ελαττωμένα στη μελέτη μας. Κατά πόσο οι αλλαγές αυτές αποτελούν πρωτογενή αίτια που οδηγούν σε IUGR ή συνοδεύουν άλλους υποκείμενους μηχανισμούς παθολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω έρευνας.



The Fetal Medicine
Foundation

137 Harley Street London W1G 6BG
TEL +44 (0) 20 7034 3070
FAX +44 (0) 20 7034 3071
E-MAIL fmf@fetalmedicine.com
WEB www.fetalmedicine.com

Professor K Nicolaides

8th World Congress in Fetal Medicine

Portorose 28 June - 2 July 2009

This is to certify that the abstract

**'Placental mRNA expression of human Placental
Growth Hormone (hPGH), Insulin-like-Growth
Factor 1 (IgF-1), and IgF-binding proteins
-1 and -3 in pregnancies complicated by
intrauterine growth restriction'**

**M. Koutsaki, S. Sifakis, A. Zaravinos,
D. Koutroulakis, O. Koukoura, D.A. Spandidos**

was accepted and delivered as a poster presentation

Kypros Nicolaides



Placental mRNA expression of human Placental Growth Hormone (hPGH), Insulin-like-Growth Factor 1 (IGF-1), and IGF-binding proteins -1 and -3 in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction

Koutsaki M¹, Sifakis S², Zaravinos A¹, Koutroulakis D², Koukoura O², Spandidos DA¹

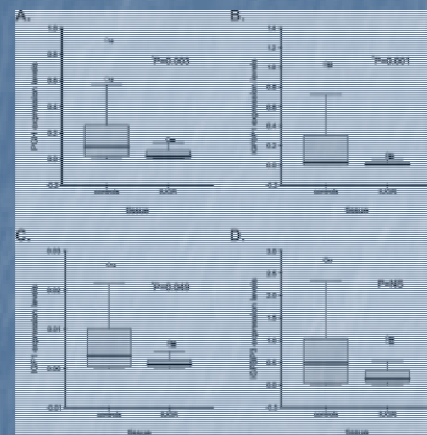
(1): Laboratory of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece
(2): Department of Obstetrics & Gynecology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Introduction: The pathophysiologic mechanisms leading to deterioration of intrauterine growth are until today poorly understood. Placental growth hormone (hPGH) and a variety of growth factors are implicated in normal fetal development and there are reports suggestive of altered concentrations of these molecules in the maternal and fetal circulation in IUGR cases. However, little is known about the actual expression profile of the genes encoding these proteins in the IUGR-affected human placenta. The aim of our study was to evaluate the genetic expression of hPGH, IGF-1, IGFBP-1 and IGFBP-3 genes in placentas from human pregnancies complicated by IUGR

Materials & Methods: We collected term placentas from 47 pregnancies diagnosed with IUGR that was not related to preeclampsia, chromosomal anomalies or intrauterine infections of the fetus (study group). As control group, we collected 37 placentas from pregnancies that resulted in the birth of healthy singleton children with birth weight appropriate for gestational age and gender. Intrauterine Growth Retardation (IUGR, primarily defined as birth weight below the 5th percentile for gestational age and gender) was diagnosed after a series of ultrasounds from midgestation. The placental samples were collected at delivery in both groups and were immediately frozen at -70°C until processed. After homogenisation of the samples with Trizol Reagen, total cellular mRNA was extracted. We precipitated with cDNA synthesis. Finally, RT-PCR was applied to quantify the expression of the genes of interest. To do this, we used primer pairs that we designed to specifically recognize and enhance reverse transcription of these particular genes.

Results: We found that in 3 out of 4 of the genes studied, the expression in IUGR placentas was statistically significantly lower compared with controls. These were the genes of hPGH (P=0.003), IGF-1 (P=0.049) and IGFBP-1 (P=0.001). The expression of IGFBP-3 gene was also lower in IUGR cases, but the difference when compared with controls reached no statistical significance. No significant correlation was found between the expression levels of each gene and clinical characteristics such as maternal age, parity, smoking, BMI, gestational age at delivery and fetal gender. Non-parametric Spearman's bivariate correlation-coefficient analysis revealed co-expression patterns between the genes studied in both the IUGR group (P<0.01) and the control group (P<0.05).

main characteristics of the women enrolled in the study	IUGR group N=47	Control group N=37	P value
Age in years : mean (range)	28.34 (19-43)	28.62 (18-44)	0.831*
Nulliparous : n (%)	25 (53.1)	20 (54.0)	0.662**
Smoking : n (%)	14 (29.7)	10 (27.02)	0.004***
Body mass index in kg/m ² : mean (±SD)	23.74 (±4.78)	22.15 (±2.85)	0.107*



pregnancy outcome characteristics	IUGR group N=47	Control group N=37	P value
Gestational age at delivery in days: mean (±SD)	251.54 (±27.37)	271.13 (±9.91)	<0.001*
Fetal gender male: n (%)	18 (38.2)	22 (61.1)	0.109**

Discussion: Human Placental Growth Hormone (hPGH) is the primary (and from midgestation and beyond the unique) growth hormone in human gestation. It is an essential mitogen, leading to cell proliferation, differentiation and finally organ formation. What is more, it promotes oxygen, glucose, nutrient and substrate transfer from the mother to the fetus across the placenta. Most of the actions of hPGH are exercised indirectly, through regulation of IGF-1 activity. hPGH and IGF-1 form an endocrine axis that controls fetal growth and enables maternal metabolism adjust to gestation in favor of the fetus. The present study has demonstrated decreased expression levels of both hPGH and IGF-1 in placentas from pregnancies affected by retardation of intrauterine growth. Whether these findings are the cause of the deterioration of growth in utero or whether they accompany other pathogenetic mechanisms of IUGR needs to be further investigated.

15th World Congress on Advances in Oncology & 13th International Symposium on Molecular Medicine

*A unique venue for basic
and clinical research*

October 7-9, 2010

Hotel Poseidon Resort, Loutraki, Greece

*Organized by the Medical School University of Crete,
International Journal of Oncology,
Oncology Reports,
International Journal of Molecular Medicine,
Molecular Medicine Reports,
Experimental and Therapeutic Medicine
and Oncology Letters*



POSTERS

302. Decreased hPGH and IGF-1 expression levels in IUGR-associated placentas. **M. Koutsaki**, **A. Zaravinos**, S. Sifakis, D. Koutroulakis, D.A. Spandidos (Heraklion, Greece)
303. Expression analysis of the Rho kinases in urinary bladder cancer. D. Volanis, **A. Zaravinos**, T. Kadiyska, V. Zoumpourlis, D. Delakas, D.A. Spandidos (Heraklion; Athens, Greece)
313. Semi-automated micronucleus-centromere scoring in assessing cellular damage in patients exposed to low doses of ionizing radiation. A. Baeyens, J.P. Slabbert, R. Swanson, H. Thierens, P. Willem, **A. Vral** (Somerset West; Johannesburg, South Africa; Ghent, Belgium)
319. Biological effects of potassium tellurite in *Corynebacterium diphtheriae* strains. L.S. Dos Santos, P.S. Sabbadini, D.L.R. Gomes, G.A. Batista, C.S. Dos Santos, M.C. Souza, L. De O. Moreira, A.C. Rosa, G.A. Pereira, R.H. Junior, L.M.B. De O. Asad, **A.L. De Mattos-Guaraldi** (Rio de Janeiro, Brazil)
320. Molecular and phenotypic characterization of *Corynebacterium diphtheriae* strains at a comprehensive cancer center. C.A. De Souza Martins, G.A. Pereira, G.A. Batista, L.S. Dos Santos, M.C. De Souza, C.S. Dos Santos, D.L.R. Gomes, L.M.D. De Faria, R.H. Júnior, **A.L. De Mattos-Guaraldi** (Rio de Janeiro, Brazil)
321. Effects of meloxicam, lornoxicam, alone and in combination with chemotherapeutic agents on the RAF/MEK/ERK pathway in Raji cells. **H.I. Onen**, A. Yilmaz, E. Alp, A.S. Yar, E. Konac, S. Menevse (Ankara, Turkey)
322. The pan deacetylase inhibitor panobinostat inhibits growth of human Burkitt's lymphoma cell line (Raji). **H.I. Onen**, I. Dogan, V. Ergin, E. Konac, A. Ekmekci, A. Menevse (Ankara, Turkey)
323. Investigating apoptotic and epigenetic effects of mevastatin and 5-aza-2'-deoxycytidine in HL-60 cell line. **A. Yilmaz**, E. Alp, E. Konac, S. Menevse (Ankara, Turkey)
324. Investigating anti-angiogenic and apoptotic effects of Bevacizumab in breast cancer cell line. E. Alp, **A. Yilmaz**, E. Konac, S. Menevse (Ankara, Turkey)
325. Mithramycin-mediated induction of K562 cell erythroid differentiation is associated with inhibition of the mTOR-C1 pathway. N. Bianchi, A. Finotti, C. Zuccato, E. Fabbri, M. Borgatti, **R. Gambari** (Ferrara, Italy)
326. A *Saccharomyces cerevisiae* model suitable for screening of correctors of stop-codon mutations. M. Borgatti, A. Finotti, F. Salvatori, M. Lipucci, G. Breveglieri, C. Zuccato, N. Altamura, **R. Gambari** (Ferrara; Pisa; Bari, Italy)
327. Surface plasmon resonance imaging (SPR-I), peptide nucleic acid (PNA) probes and nanoparticle-enhancement for PCR-free ultrasensitive detection of β -thalassemia mutations in human genomic DNA. R. D'Agata, G. Breveglieri, L. Zanolì, M. Borgatti, G. Spoto, **R. Gambari** (Catania; Ferrara, Italy)
328. Inhibition of microRNA 210 biological activity with an anti-miR-210 peptide nucleic acid. E. Fabbri, N. Bianchi, E. Brognara, A. Finotti, G. Breveglieri, M. Borgatti, A. Manicardi, R. Corradini, R. Marchelli, **R. Gambari** (Ferrara; Parma, Italy)
329. Generation and molecular characterization of a transgenic mouse line carrying a mutated human IVS-I-6 thalassemia β -globin gene. A. Finotti, G. Breveglieri, I. Mancini, N. Bianchi, I. Lampronti, F. Salvatori, G. Feriotto, C. Zuccato, M. Borgatti, G. Carandina, C. Melandri, F. Altruda, S. Fagoonee, M. Iannicella, L. Breda, S. Rivella, **R. Gambari** (Ferrara; Turin, Italy; New York, NY, USA)
334. MSM suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis in breast cancer. **Y.M. Yang**, E.-J. Lim, J.-H. Park, Y.-H. Joung, F. Kwon (Seoul, Korea)
337. mRNA expression profile of the *Akt* family genes, *SDF1* and *CXCR4*, in human brain gliomas. **R. Lymbouridou**, G. Soufla, A.M. Chatzinikola, A. Vakis, D.A. Spandidos (Heraklion, Greece)

301

GEO computational analysis regarding the expression of Yin Yang 1 in human tumors

A. Zaravinos and D.A. Spandidos
Department of Clinical Virology, University of Crete, School of Medicine, Heraklion, Crete, Greece

INTRODUCTION: Yin Yang 1 (YY1) is a ubiquitous and multifunctional zinc-finger, transcription factor that can act as a transcriptional repressor, activator, or initiator element binding protein. YY1 is involved in the transcriptional control of a large number of mammalian genes, approximately 10% of the total mammalian gene set. Consequently, YY1 plays important roles in a number of biological processes, including cell cycle control, embryogenesis, viral infection, programmed cell death, oncogenesis, Polycomb Group (PcG) function and B-cell development. Since it is a general transcription factor involved in many pathways, the expression levels of YY1 must be tightly monitored for the survival of cells and organisms.

MATERIALS AND METHODS: In the present study, computational analysis was performed to further understand whether differences in YY1 transcript levels occur in different cancer types when compared with the relative normal tissue, benign tumor or its metastatic counterpart. Forty-nine publicly available Gene Expression Omnibus (GEO) datasets were analyzed. Gene expression patterns of YY1 in 19 different primary tumor types, benign and/or metastatic, as well as the corresponding normal counterparts were extracted from the normalized datasets. The results were expressed as mean levels of the log₂ intensity and were statistically compared by the Mann-Whitney U test.

RESULTS: This analysis showed that, in the majority of the tumors studied, YY1 transcript levels were significantly higher than in the relative normal counterparts for each cancer type analyzed. Moreover, in many human cancer types YY1 expression levels were significantly elevated in the metastatic tumor compared to its primary counterpart. In the cases of prostate, colon and liver cancer, the benign tumors always exhibited significantly higher relative expression rates compared to the normal tissues. However, these rates were lower than the corresponding rates in their metastatic counterparts. In contrast, in the reviewed datasets, melanomas expressed significantly decreased YY1 relative expression rates, versus both benign nevi and normal tissues. Moreover, metastatic malignant melanomas exhibited significantly lower expression rates compared to malignant melanomas. Similarly, YY1 transcription levels decreased in pediatric osteosarcomas versus normal human osteoblasts.

DISCUSSION: These results suggest a dual role of YY1 in cancer development, either through over-expression or under-expression, depending on the tumor type.

302

Decreased hPGH and IGF-1 expression levels in IUGR-associated placentas

M. Koutsaki¹, A. Zaravinos¹, S. Sifakis², D. Koutroulakis², D.A. Spandidos¹

¹Laboratory of Clinical Virology, University of Crete, School of Medicine, Heraklio, Crete, Greece

²Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Introduction: The pathophysiologic mechanisms leading to deterioration of intrauterine growth are poorly understood. hPGH and a variety of growth factors are implicated in normal fetal development. hPGH is the primary (and from midgestation and beyond the unique) growth hormone in human gestation. It is an essential mitogen, leading to cell proliferation, differentiation and finally organ formation. It also promotes oxygen, glucose, nutrient and substrate transfer from the mother to the fetus across the placenta. Most of the actions of hPGH are exercised indirectly, through regulation of IGF-1 activity. hPGH and IGF-1 form an endocrine axis that controls fetal growth and enables maternal metabolism to adjust to gestation in favor of the fetus.

Aim of study: To evaluate the expression of hPGH, IGF-1, IGFBP-1 and IGFBP-3 genes in placentas from human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction (IUGR).

Materials and methods: Our study group was comprised of term placentas from 47 IUGR pregnancies not related with preeclampsia, chromosomal anomalies or intrauterine infections of the fetus. As control group, we used 37 placentas from pregnancies that resulted in the birth of healthy singleton children with birth weight appropriate for gestational age and gender. qRT-PCR was applied for the evaluation of the gene expression status. The expression status of the genes of interest was compared with 8 previously published databases.

Results: The mRNA expression levels of the genes hPGH, IGF-1 and IGFBP-1 were significantly lower than those of the controls ($p=0.003$, $p=0.049$ and $p=0.001$, respectively). All of the genes of interest exhibited a significant co-expression pattern, both in IUGR ($p<0.01$) and the controls ($p<0.05$).

Conclusion: We demonstrated hPGH and IGF-1 mRNA down-regulation in IUGR-associated placentas. Whether these findings are the cause of the deterioration of growth *in utero* or whether they accompany other pathogenetic mechanisms of IUGR requires further investigation.

303

Expression analysis of the Rho kinases in urinary bladder cancer

D. Volanis^{1,2}, A. Zaravinos¹, T. Kadiyska³, V. Zoumpourlis³, D. Delakas³, D.A. Spandidos¹

¹Department of Clinical Virology, University of Crete, School of Medicine, Heraklion, Crete, Greece

²Department of Urology, Asklepieio General Hospital, Voula, Athens, Greece

³National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Introduction: Bladder cancer is the most common malignancy of the urinary tract and the fifth most common malignancy in the Western world. Rho proteins seem to be involved in key processes that occur during the development and progression of cancer, such as alterations in cell shape, polarity and motility, as well as cell to cell and cell to matrix interactions.

Objectives: To analyze the gene expression pattern of the kinases RhoA, RhoB, RhoC, Cdc42 and Rac1, in bladder cancer and compare them with the corresponding levels in normal urothelium.

Materials and Methods: A total of 77 bladder cancer samples with their corresponding adjacent normal urothelium were analyzed for the expression of the above-mentioned genes using microarrays and real-time PCR. The gene expression was confirmed at the protein level using Western blotting. The overall survival analysis, in correlation with the expression levels of the genes of interest, was performed using the Kaplan-Meier test.

Results: Microarrays and real-time PCR expression analysis showed significantly lower RhoB expression levels in bladder cancer, compared to levels in the normal tissues ($p=0.01$, Mann-Whitney U test). In contrast, the RhoA, RhoC, Cdc42 and Rac1 genes had significantly higher levels of expression in the bladder cancer compared to levels in the normal tissues ($p=0.01$, Mann-Whitney U test). The results were confirmed by measurements at the protein level ($p<0.001$, Mann-Whitney U test). Patients with >1.5 -fold RhoB expression demonstrated a longer survival ($p=0.023$, Gehan-Breslow-Wilcoxon test) versus those with <1.5 -fold RhoB expression.

Conclusion: The RhoA, RhoB, RhoC, Cdc42 and Rac1 genes, play a fundamental role in the development and progression of bladder cancer. Their expression levels represent potential diagnostic markers for bladder cancer.

304

In vitro activity of a new class MMP-I in a three dimensional pancreatic cancer cell model

Alexandra Pries, Harald Tschesche, Hans-Peter Bruch, Marie-Luise Kruse and Matthias Kapischke
Klinik St. Georg, Lohmuehlenstrasse 5, 20099 Hamburg, Germany
E-mail: mkapischke@web.de

The use of MMP-Inhibitors is a persisting therapy option against pancreatic cancer. A new compound (Triazin 17-2) was developed on the basis of a triazine backbone as a well known and well tolerated chemical scaffold.

Materials and methods: The inhibitory constant (K_i) was tested in a cell free assay. Protein expression and MMP activity in the well described human pancreatic cancer cell line PancTu-1 was tested. Toxicity of the substance was tested in a system with three dimensional cell aggregates (spheroids). Drug resistance was tested in presence and absence of stroma cells (fibroblasts) in this three dimensional system.

Results: Triazin has K_m and K_i values for MMP7, and MMP2 and MMP9. As spheroids there are no adverse effects up to 3mM Triazin. The presence of fibroblasts has no influence on the drug resistance of the pancreatic tumor cells. Also in high concentrations Triazin does not kill the tumor cells but inhibits effectively and reversibly the tumor cell invasion.

Conclusion: Spheroid model is a good approach for MMP-I testing in vitro. Spheroids show a high resistance against drug toxicity. Cocultivation with stroma cells has neither protective nor sensitizing effects on the pancreatic cancer cells.

3) Τιμητικές Διακρίσεις



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Μέλος της FIGO

**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΚΡΙΣΕΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΟΙ
ΟΠΟΙΕΣ ΥΠΕΒΛΗΘΗΣΑΝ ΠΡΟΣ ΒΡΑΒΕΥΣΗ ΣΤΗ
ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΤΟΥ 11ου ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟΥ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ & ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Πρόεδρος
Ι.Ε.ΜΕΣΣΗΝΗΣ
Καθηγητής Παν. Θεσσαλίας

Αθήνα, Ξενοδοχείο Hilton, 31 Μαΐου 2009

Αντιπρόεδρος
Ε. ΚΟΥΜΑΝΤΑΚΗΣ
Καθηγητής Παν. Κρήτης

Τα μέλη της Επιτροπής κρίσης, κκ.:

Κουρούνης Εμμανουήλ
Κουμαντάκης Ευγένιος
Μαρούλης Γεώργιος
Καλογερόπουλος Αχιλλέας
Καρπάθιος Σακελλάρης
Βασιλόπουλος Παναγιώτης
Χαϊδόπουλος Δημήτριος
Γκριμπίζης Γρηγόριος

Γεν. Γραμματέας
Ι.ΤΖΑΦΕΤΤΑΣ
Καθηγητής Παν. Θεσ/κης

Ειδικ. Γραμματέας
Γ.ΜΑΡΟΥΔΗΣ
Καθηγητής Παν. Θράκης

Ταμίας
Β.ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ
Διδάκτωρ Παν. Αθηνών

κατόπιν διεξοδικής συζήτησης κατέληξαν στη βράβευση των δύο καλύτερων εργασιών οι οποίες ήταν οι κάτωθι:

Μέλη
Α. ΑΝΤΣΑΚΛΗΣ
Καθηγητής Παν. Αθηνών
Γ.ΚΟΥΡΟΥΝΗΣ
Καθηγητής Παν. Πατρών
Β. ΣΩΤΗΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ
Διδάκτωρ Παν. Αθηνών
Β.ΤΑΡΑΑΤΖΗΣ
Καθηγητής Παν. Θεσ/κης

1. Επιτυχής εφαρμογή του διευρυσμένου προγεννητικού ελέγχου (extended prenatal panel-εpp) για τη διερεύνηση μικροελλείψεων και αναδιπλασιασμών που συνδέονται με παθολογικό φαινότυπο (ΕΑ06)

Πάγκαλος Κ., Hagnefelt Β., Σεβαστίδου Σ., Καραπάνου Σ., Καράμπελα Μ., Κονιάλης Χ. (βραβείο 5000 ευρώ).

2. Μελέτη της έκφρασης στον πλακούντα των γονιδίων της πλακουντιακής αυξητικής ορμόνης (hPGH), του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα-1 (IGF-1) και των δεσμευτικών του πρωτεϊνών 1 (IGFBP- 1) και 3 (IGFBP-3) σε κνήσεις με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (ΕΑΙ07)

Κουτσάκη Μ., Σηφάκης Σ., Ζαραβίνος Α., Κουτρουλάκης Α., Κούκουρα Ο., Σπαντίδος Δ. (έπαινος 2000 ευρώ).

Αθήνα, 31 Μαΐου 2009

Ο Γεν. Γραμματέας της
Ελληνικής Μαιευτικής &
Γυναικολογικής Εταιρείας

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΑΛΚΑΙΟΥ 10, ΑΘΗΝΑ 115 28
ΑΦΜ: 0901650059 - ΔΟΥ: 18' ΑΘΗΝΩΝ
ΤΗΛ: 210 77 74 607

Ι. Τζαφettaς
Καθ. Παν. Θεσσαλονίκης

Ο Πρόεδρος της
Ελληνικής Μαιευτικής &
Γυναικολογικής Εταιρείας

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ
ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΑΛΚΑΙΟΥ 10, ΑΘΗΝΑ 115 28
ΑΦΜ: 0901650059 - ΔΟΥ: 18' ΑΘΗΝΩΝ
ΤΗΛ: 210 77 74 607

Ι. Ε. Μεσσήνης
Καθ. Παν. Θεσσαλίας

ΑΛΚΑΙΟΥ 10 • ΑΘΗΝΑ 11528 • ΤΗΛ:210774607 & FAX: 210774609

e-mail: helobgyn@otenet.gr • www.hsog.gr