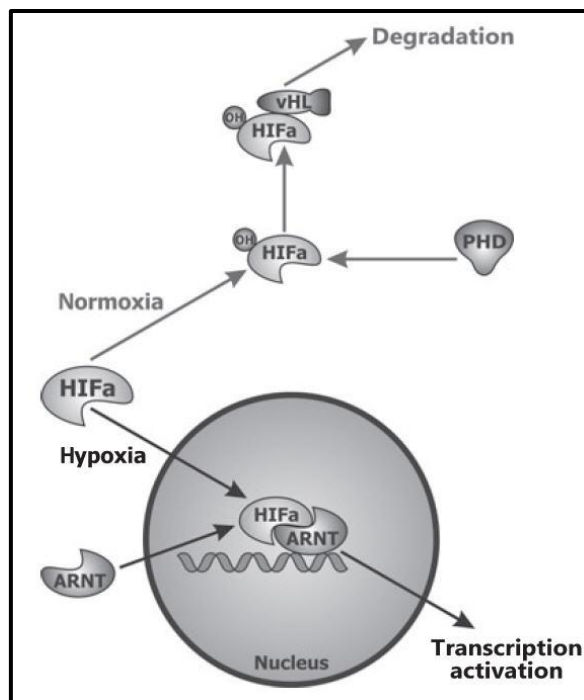




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ



Έκφραση των γονιδίων HIF και των
ρυθμιστών τους PHD και VHL
σε πλακούντες εγκύων με ενδομήτρια
υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη (FGR)

ΒΙΚΤΩΡΑΣ ΓΚΟΥΡΒΑΣ
Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ηράκλειο 2012

Επιβλέποντες καθηγητές:

Δημήτριος Α Σπαντίδος, Καθηγητής

Αναστασία Κωνσταντινίδου, Αναπληρώτρια καθηγήτρια

Αντώνιος Μακρυγιαννάκης, Επίκουρος καθηγητής

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	4
Σύντομο βιογραφικό σημείωμα	7
Περίληψη	19
Abstract	24
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
Εμβρυική υπολειπόμενη ανάπτυξη	29
Προεκλαμψία	44
Δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας	49
Πλακούντας	54
HIF, PHD, VHL και ANXA5	58
Οδηγές σκέψεις - υπόθεση - ερωτήματα	63
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68
Μέθοδοι και υλικά	69
Αποτελέσματα	87
Συζήτηση	103
Συμπεράσματα	110
Βιβλιογραφία	111

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Δημήτριο Σπαντίδο, που με εμπιστεύτηκε και με δέχτηκε στο εργαστήριό του από το 2^ο ακόμα έτος των βασικών σπουδών μου, δίνοντας μου τη δυνατότητα να έρθω σε επαφή με την εργαστηριακή ιατρική και μου ενέπνευσε την επιθυμία να ασχοληθώ με την έρευνα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Σταύρο Σηφάκη, ιατρό της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης, γιατί ήταν από τους βασικούς συντελεστές και συνοδοιπόρους στην επίτευξη αυτού του διδακτορικού. Ο βασικός κορμός του υλικού που επεξεργάστηκα στα πειράματα, αποτέλεσε προσωπική του συλλογή δειγμάτων.

Ξεχωριστή αναφορά θα ήθελα να κάνω και στον Επίκ. Καθηγητή Ιολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Γεώργιο Σουρβίνο. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί με καθοδήγησε, με βοήθησε και γενικά στάθηκε δίπλα μου όλα τα χρόνια της πορείας μου στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ επίσης την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Αναστασία Κωνσταντινίδου, για τη συμβολή της, αλλά και την πρώτη μύηση που είχα δίπλα της στο θαυμαστό κόσμο της Παθολογικής Ανατομικής, που τελικά ακολούθησα και ως ειδικότητα. Επίσης, ευχαριστώ τον Επίκ. Καθηγητή Μαιευτικής - Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης Αντώνη Μακρυγιαννάκη για τη βοήθειά του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής επίβλεψης του διδακτορικού αυτού.

Ιδιαίτερη ευχαριστία οφείλω στο Νικόλαο Σουλιτζή, γιατί συμμετείχε ενεργά σε όλη τη διαδικασία του διδακτορικού μου, πειραματική και δημιουργική, ενώ χωρίς την υποστήριξή του στη στατιστική ανάλυση, το όλο πόνημα θα ήταν φτωχότερο. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους συναδέλφους και φίλους μου, προτιμώ να τους αποκαλώ φίλους γιατί είχαμε δημιουργήσει μια υπέροχη παρέα, του εργαστηρίου Ιολογίας της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ευχαριστώ τους Γιάννα Σούφλα, Βούλα Μπαριτάκη, Αλέξανδρο Ζαφειρόπουλο, Ιωάννα Διαλυνά και Δημήτρη Πανουτσόπουλο που ήταν και οι πρώτοι που με εισήγαγαν στα τεκταινόμενα του εργαστηρίου. Επίσης ευχαριστώ τους Γιώτα Δημητροπούλου, Ειρήνη Νεοφύτου, Μαρία Κιμούλη, Πέρσα Φραγκιαδάκη, Πέγκυ Κανέλου, Ξένια Γκατζόλη, Βίρνα Αμανατίδου, Δανάη Παπαδογιάννη, Απόστολο Ζαραβίνο, Βασίλη Μπαλή, Σταύρο Δέρδα, Χάρη Φιλιππάκη, Φίλιππο Πορίχη, Γιάννη Λυρώνη, Σταύρο Αποστολάκη, Κωνσταντίνα Βογιατζή και Μανώλη Συμβουλάκη, για το υπέροχο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο, μετατρέποντας τις ατέλειωτες ώρες πειραμάτων σε ευχάριστη εμπειρία (συγγνώμη αν ξεχνάω κάποιον).

Θα ήταν αμέλεια να μην ευχαριστήσω τους Ουρανία Κούκουρα και Δημήτρη Κουτρουλάκη, συναδέλφους από την Γυναικολογική-Μαιευτική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, για τη βοήθειά τους στη συλλογή των δειγμάτων και τη συγκέντρωση των δημογραφικών στοιχείων. Ειδικά η Ράνια με βοήθησε απλόχερα στα πρώτα βήματα του διδακτορικού μου και παραχώρησε ότι μπορούσε από ιστούς της δικής της συλλογής.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καινούργιους μου δασκάλους, τις διευθύντριές μου ως ειδικευόμενο του Γ.Ν.Θ. «Γ. Γεννηματάς», Ροδούλα Κωτακίδου και Κωνσταντίνα Παναγιωτοπούλου, αλλά και το συνάδελφό μου

Σωτήρη Λάκη, γιατί με στήριξαν και μου επέτρεψαν να έχω το χρόνο να ολοκληρώσω αυτό το διδακτορικό.

Τελευταίους, αλλά πιο σημαντικούς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη και τη στήριξη που μου προσφέρει σε όλους τους τομείς της ζωής μου. Θα ήθελα να αναφερθώ ξεχωριστά στη μητέρα μου, που με υποστήριζε πάντοτε, δείχνοντας εμπιστοσύνη στις επιλογές μου και μου έμαθε να εκτιμώ τις δυνάμεις μου και να πορεύομαι στον κόσμο. Τέλος, φυσικά ευχαριστώ την Πέπη, γιατί ποτέ της δε μου άφησε το χέρι, ενώ μου χάρισε τον μικρό Αχιλλέα που με διευκόλυνε να αντιληφθώ το νόημα όλων των προσπαθειών μου.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα	Βίκτωρας
Επώνυμο	Γκούρβας
Όνομα πατρός	Νικόλαος
Όνομα μητρός	Σοφία
Ημερομηνία γέννησης	22-10-1977
Οικογενειακή κατάσταση	Έγγαμος με ένα παιδί

Βασική Ιατρική Εκπαίδευση

Πτυχίο Ιατρικής, Σχολή Επιστ. Υγείας Πανεπιστημίου Κρήτης	Λίαν καλώς 7,4 (με πανελλήνιες εξετάσεις)
Ιατρική ειδικότητα	Παθολογική Ανατομική 2009-σήμερα Γ.Ν.Θ. «Γ. Γεννηματάς»

Παράλληλη Εκπαίδευση - Εμπειρία

Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας και Μοριακής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης - Υπεύθυνος καθ. Δ. Σπαντίδος 2002 - 2007	Εκπαίδευση σε Τεχνικές: - Western blotting, Immunostaining - In situ hybridization, Blasting - Primer designing - RNA/DNA/protein extraction - PCR, RT-PCR, Genotyping
Ινστιτούτο Φυσιολογίας Eberhard-Karls-Universitaet Tuebingen Γερμανίας - Υπεύθυνος καθ. Florian Lang Μάρ. - Ιούλ. 2006	Εκπαίδευση σε Τεχνικές: - cRNA injection in Xenopus oocytes - Ionic currents recording

Συμμετοχή σε σεμινάρια

- Ioannina University Courses in Pathology on Liver Pathology - Oncology Part I & II, 24-27 April, 2012, Ioannina
- Ioannina University Courses in Pathology on Uterus and Ovaries Pathology-Oncology, May 31 - June 3 2011, Ioannina
- Μαθήματα Παθολογικής Ανατομικής - Η ώρα του ειδικευόμενου «Γενική Παθολογική Ανατομική», Ακαδ. Έτος 2010-2011, Ε.Ε.Π.Α. Θεσσαλονίκη.
- Μάιος - Ιούνιος 2005, Συμμετοχή ως εκπαιδευτής σε 2 Σεμινάρια Βασικής Υποστήριξης της Ζωής (BLS), Ηράκλειο Κρήτης
- "Modern Light Microscopy Techniques in Biomedical Research", Επιμορφωτικό Σεμινάριο του «Ελληνικού Δικτύου Φωτονικής Μικροσκοπίας», Ηράκλειο, Νοέμβριος 2005
- ESO Course Oncology for Medical Students September 5-11, 2004, Ioannina, Greece

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

- Gourvas V, Dalpa E, Konstantinidou A, Vrachnis N, Spandidos DA, Sifakis S. Angiogenic factors in placentas from pregnancies complicated by fetal growth restriction (Review). Mol Med Report. 2012 Jul;6(1):23-7. doi: 10.3892/mmr.2012.898. Epub 2012 May 2.
- Fasoulas K, Beltsis A, Katsinelos T, Dimou E, Arvaniti M, Charsoula A, Gourvas V, Atmatzidis S, Chatzimavroudis G, Katsinelos P. Efficacy of colchicine in the treatment of mesenteric panniculitis in a young patient. J Gastroenterol. 2012 Mar-Apr;18(2):146-8.

- Gourvas V, Sifakis S, Dalpa E, Soulitzis N, Koukoura O, Spandidos DA. "Reduced placental prolyl hydroxylase 3 mRNA expression in pregnancies affected by fetal growth restriction". *BJOG* 2010; 117(13):1635-42
- Kimouli M, Gourvas V, Konstantoudaki X, Basta M, Miyakis S, Spandidos DA. "The effect of an exon 12 polymorphism of the human thromboxane synthase (CYP5A1) gene in stroke patients" *Med Sci Monit.* 2009 Jan;15(1):BR30-5.
- Dalpa E, Gourvas V, Baritaki S, Miyakis S, Samaras V, Barbatis C, Sourvinos G, Spandidos DA. "High prevalence of Human Herpes Virus 8 (HHV-8) in patients with Warthin's tumors of the salivary gland.". *Journal of Clinical Virology, J Clin Virol.* 2008 Jun;42(2):182-5. Epub 2008 Mar 14.
- Baritaki S, Pizos E, Zafiroopoulos A, Soufla G, Gourvas V, Krambovitis E and Spandidos DA. "Lack of association between Schizophrenia and Dopamine (DRD3) or Serotonin (HTR2) receptor gene mutant Variants in the Greek Population". *Eur J Hum Genet.* 2004 Jul;12(7):535-41

Συγγραφικό έργο σε επιστημονικά συγγράματα

Victor Gourvas, Efterpi Dalpa, Nikos Vrachnis and Stavros Sifakis (2012). *Placental Angiogenesis and Fetal Growth Restriction, From Preconception to Postpartum*, Dr. Stavros Sifakis (Ed.), ISBN: 978-953-51-0353-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/from-preconception-to-postpartum/placental-angiogenesis-and-fetal-growth-restriction>.

Δημοσιεύσεις σε ελληνικά περιοδικά

- Karimponis P, Kamargiannis N, Tigiroglou E, Blioskas S, Gourvas V, Katsakas O. Maxillary sinus Plasmacytoma - a case report.
Otorhinolaryngologia - Head and Neck Surgery Issue 46, 2011 p45-48

Εργασίες σε συνέδρια

- Προδρόμου Κ, Πατουλιάς Ι, Φειδάντσης Θ, Γκούρβας Β, Μητρούδη Μ, Κουτσούμης Γ, Παπανικολάου Α. Η ΜΙΚΡΟΛΙΘΙΑΣΗ ΟΡΧΕΩΝ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ-ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ. 10^ο Συνέδριο της Χειρουργικής Εταιρείας Βορείου Ελλάδος, Δεκέμβριος 2011, Θεσσαλονίκη
- Γκούρβας Β., Σουλιτζής Ν., Δάλπα Ε., Κούκουρα Ο., Φραγκιαδάκη Π., Κωνσταντινίδου Α., Σπαντίδος Δ.Α., Σηφάκης Σ. Ελαττωμένη έκφραση της πρωτεΐνης της annexin V σε πλακούντες κυήσεων με προεκλαμψία. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Οκτώβριος 2011, Αθήνα.
- Λάκης Σ, Παπαμήτσου Θ, Παναγιωτοπούλου Κ, Γκούρβας Β, Κωτακίδου Ρ, Δημητριάδης Γ, Ραδόπουλος Δ. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΚΤΗ CLAUDIN-7 ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΧΡΩΜΟΦΟΒΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ-ΟΓΚΟΚΥΤΩΜΑΤΟΣ. 20^ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 2010, Κύπρος
- Σ. Λάκης, Β. Γκούρβας, Ρ. Κωτακίδου, Κ. Παναγιωτοπούλου, Χ. Τουτζιάρης. ΘΗΛΩΔΕΣ ΚΥΣΤΑΔΕΝΩΜΑ ΕΠΙΔΙΔΥΜΙΔΑΣ (ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ). 12^ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ, Θεσσαλονίκη 2010
- Β. Γκούρβας, Σ. Λάκης, Κ. Παναγιωτοπούλου, Ρ. Κωτακίδου, Γ. Γκότσος, Α. Παπανικολάου. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ:

ΛΕΙΟΜΥΟΣΑΡΚΩΜΑ ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟΥ ΤΟΝΟΥ. 12ο ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΟ
ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ, Θεσσαλονίκη 2010

- Γκούρβας Β, Σηφάκης Σ, Δάλπα Ε, Σουλιτζής Ν, Κουτρουλάκης Δ, Κούκουρα Ο, Κωνσταντινίδου Α, Σπαντίδος ΔΑ. "ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΥΠΟΞΙΑΣ (*HIF-1a*, *HIF-2a*, *HIF-b* & *PHD-3*) ΣΕ ΚΥΗΣΕΙΣ ΜΕ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΤΟΜΕΝΗ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ". 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής. Σεπτέμβριος 2009. Θεσσαλονίκη
- V. Gourvas, E. Dalpa, N. Soulitzis, O. Koukoura, P. Fragiadaki, A. Konstantinidou, S. Sifakis and D.A. Spandidos. REDUCED EXPRESSION OF ANNEXIN V IN PLACENTAS OF PREGNANCIES WITH PREECLAMPSIA. 14th World Congress on Advances in Oncology and 12th International Symposium on Molecular Medicine, October 2009, Loutraki, Greece
- Konstantinidou AE, Gourvas V, Sifakis S, Dalpa E, Dertinger S, Anninos H, DiMauro S, Patsouris E. "Placental Involvement in Glycogen Storage Disease Type IV: Histological Findings". Abstract. Placenta 2008 Aug;29(8):A24
- Konstantinidou A, Tsekoura E, Gourvas V, Sifakis S, Dalpa E, Spanakis N, Tsakris A, Patsouris E, Antsaklis A. "Adenovirus Genome in the Placenta: Association with Premature Labor, Villitis and Chorioamnionitis". Abstract. Placenta 2008 Aug;29(8):A55
- Sifakis S, Papadopoulou E, Gourvas V, Konstantinidou A, Giahnakis E, Dalpa E, Fragouli Y, Karkavitsas N, Kalmanti M. "Human Placental Growth Hormone is Increased in Amniotic Fluid of Pregnancies Affected by Down Syndrome". Abstract. Placenta 2008 Aug;29(8):A25

- Koukoura O, Soufla G, Sifakis S, Koutroulakis D, Gourvas V, Dalpa E, Konstantinidou AE, Spandidos DA. "Differences in Annexin V mRNA and Protein Placental Expression in Pregnancies Complicated With Intrauterine Growth Restriction". Abstract. *Placenta* 2008 Aug;29(8):A28
- Β. Γκούρβας, Α. Βαλαχής, Χ. Νεοφύτου, Σ. Φραγκίσκου. "Αξιολόγηση της γνώσης σχετικά με τη λοίμωξη HIV/AIDS και της σεξουαλικής συμπεριφοράς των φοιτητών της πόλης του Ηρακλείου". Ελεύθερη ανακοίνωση στο 13^ο Επιστημονικό συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Απρίλιος 2007, Αθήνα
- V. Gourvas, E. Dalpa, G. Sourvinos, S Baritaki, S. Miyakis, V. Samaras, C. Barbatis, D.A. Spandidos. "HUMAN HERPES VIRUS-8 INFECTION IS IMPLICATED IN SALIVARY GLAND CARCINOMA". 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine, October 2006, Hersonissos, Crete.
- Baritaki S, Pizos E, Zafiropoulos A, Soufla G, Gourvas V, Krambovitis E and Spandidos DA. "Lack of association between Schizophrenia and Dopamine (DRD3) or Serotonin (HTR2) receptor gene mutant Variants in the Greek Population". 8th World Congress on Advances in Oncology and 6th International Symposium on Molecular Medicine, October 2003, Hersonissos, Crete.
- Αργυρού, Βαλλού, Βασάλλου, Βρακάς, Γιακουμάκη, Β.Γκούρβας, Γούβας, Γουμενάκης, Δαλιάνη, Δερμιτζάκη, Διακονής, Κακουλάκη, Καστρινάκης, Κιαγιαδάκη, Κοκολάκης, Κολτσιδα, Κυριαζής, Λεβεντάκος, Μάμμας, Μανουσάκης, Μαραγάκη, Μπιζάκη, Μπίλιου, Μπιμπάκη, Νικολέρου, Νινιός, Νούλη, Πανανάκη, Παπαδέδες, Σολιδάκης, Στεφανάκης, Τζανάκη, Φόρτης, Ψαρολογάκης. "Πληροφόρηση των σπουδαστών λυκείων Ηρακλείου για το AIDS - εμπειρίες και προτάσεις τους".

Ελεύθερη ανακοίνωση στο 8^ο Επιστημονικό συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος, Απρίλιος 2002, Ιωάννινα

Διακρίσεις - Βραβεία

- Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης. "ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΥΠΟΞΙΑΣ (*HIF-1a*, *HIF-2a*, *HIF-b* & *PHD-3*) ΣΕ ΚΥΗΣΕΙΣ ΜΕ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ". 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής. Θεσσαλονίκη 2009
- Υποτροφία Μανασάκη στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Επιστημών Υγείας, 2008-2009
- Οικονομική Ενίσχυση Ιδρύματος «Μιλτιάδου Εμπειρικού» ύψους 17.000 Ευρώ. «Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *HIF-1,2,3* και της ρύθμισης της λειτουργίας τους από τα γονίδια *PHD-1,2,3* και *VHL* σε πλακουντιακό ιστό εγκύων που εμφάνισαν ενδομήτρια υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη με ή χωρίς προεκλαμψία. Διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης με τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της νόσου». 2007
- 'B Βραβείο Αναρτημένης Ανακοίνωσης Επιδημιολογικής Έρευνας. "Αξιολόγηση της γνώσης σχετικά με τη λοίμωξη HIV/AIDS και της σεξουαλικής συμπεριφοράς των φοιτητών της πόλης του Ηρακλείου". Συνέδριο ΕΕΦΙΕ, Αθήνα 2007

Συμμετοχές σε συνέδρια

- 16th World Congress on Advances in Oncology και του 14th International Symposium on Molecular Medicine. 6-8 Οκτωβρίου 2011, Rhodes Palace, Ρόδος
- 21^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη Νοέμβριος 2010
- 15th World Congress on Advances in Oncology και του 13th International Symposium on Molecular Medicine. Οκτώβριο 2010, Poseidon Palace, Λουτράκι.
- 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Θεσσαλονίκη Ιούνιος 2010
- 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής. Σεπτέμβριος 2009, Θεσσαλονίκη.
- 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής & Γυναικολογίας, Αθήνα, Μάιος 2009
- 14th World Congress on Advances in Oncology και του 12th International Symposium on Molecular Medicine. Οκτώβριος 2009, Poseidon Palace, Λουτράκι.
- 13th World Congress on Advances in Oncology και του 11th International Symposium on Molecular Medicine. Οκτώβριο 2008, Creta Maris Hotel, Χερσόνησος, Κρήτη
- "3rd Neutropenia Network Conference", September 2008, Heraklion, Crete.
- IFPA Meeting 2008/12th EPG Conference, 10-13 September 2008, Graz, Austria.
- «10^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Χειρουργικής Ογκολογίας», Μάιος 2008, Ηράκλειο, Κρήτη.

- «1^ο Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής Γυναικολογίας», Απρίλιος 2008, Ηράκλειο, Κρήτη.
- "New Trends on Controlled Ovarian Stimulation and Ovulation Induction", Mediterranean Conference for reproductive medicine. Hersonissos, Crete, 3-4 May 2008
- "18^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο", Χερσόνησος, Μάρτιος 2008
- 12th World Congress on Advances in Oncology και του 10th International Symposium on Molecular Medicine. Οκτώβριο 2007, Creta Maris Hotel, Χερσόνησος, Κρήτη
- "25^ο Παγκόσμιο Παιδιατρικό Συνέδριο", Αθήνα, Αύγουστος 2007
- "45^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο", Χαλκιδική, Μάιος 2007
- "17^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο", Χερσόνησος, Μάρτιος 2007
- "2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδομητρίωσης", Ηράκλειο, Νοέμβριος 2006
- 13^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο. 9-12 Νοεμβρίου 2006 Candia Maris, Ηράκλειο, Κρήτη
- 14^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας. 25-29 Οκτωβρίου, Terra Maris, Χερσόνησος, Κρήτη 2006
- 1^η Πανελλήνια Φοιτητική Συνάντηση : *Σύγχρονες εξελίξεις στην Κλινική Ογκολογία*. 27-28 Οκτωβρίου, Terra Maris, Χερσόνησος, Κρήτη 2006
- Ημερίδα: *Προγεννητικός έλεγχος και Γενετική προσέγγιση Σκελετικών Δυσπλασιών*. 21 Οκτωβρίου 2006, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης.
- 11th World Congress on Advances in Oncology και του 9th International Symposium on Molecular Medicine. 12-14 Οκτωβρίου 2006, Creta Maris Hotel, Χερσόνησος, Κρήτη

- 16^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο. 11-12 Μαρτίου 2006, *Creta Maris Hotel*, Χερσόνησος, Κρήτη
- 10th World Congress on Advances in Oncology και του 8th International Symposium on Molecular Medicine. 13-15 Οκτωβρίου 2005, *Creta Maris Hotel*, Χερσόνησος, Κρήτη
- 1^ο Νευροχειρουργικό Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης «Υδροκέφαλος - Διάγνωση και Θεραπεία». 3-4 Ιουνίου 2005, Ηράκλειο
- The 2nd Neutropenia Network Conference. 22-23 Απριλίου 2005, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης
- 15^ο Παγκρήτιο Πανεπιστημιακό Παιδιατρικό Συμπόσιο. 2-3 Απριλίου 2005, *Creta Maris Hotel*, Χερσόνησος, Κρήτη
- 1^ο Πολυθεματικό Συνέδριο Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης. 27-29 Ιανουαρίου 2005
- 9th World Congress on Advances in Oncology και του 7th International Symposium on Molecular Medicine. 14-16 Οκτωβρίου 2004, *Creta Maris Hotel*, Χερσόνησος, Κρήτη
- Γενετική Συμβουλευτική & Προγεννητικός Έλεγχος. 18-19 Ιουνίου 2004, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης
- 42^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο. 28-30 Μαΐου 2004, *Creta Maris*, Χερσόνησος, Κρήτη
- 8th World Congress on Advances in Oncology και του 6th International Symposium on Molecular Medicine. 16-18 Οκτωβρίου 2003, *Creta Maris Hotel*, Χερσόνησος, Κρήτη
- 9^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας. 9-11 Μαΐου 2003, Αθήνα
- 1^ο Συμπόσιο Βιοιατρικής Έρευνας Πανεπιστημίου Κρήτης. 8-9 Νοεμβρίου 2002, Ιατρική Σχολή, Ηράκλειο

- Γενετική Συμβουλευτική & Προγεννητικός Έλεγχος. 17-19 Μαΐου 2002, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Οργανωτική εμπειρία - Μέλος Εταιριών

- Μέλος της Ελληνικής Εταιρίας Παθολογικής Ανατομικής 2010 - σήμερα
- Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "15th World Congress on Advances in Oncology" και "13th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2010, Λουτράκι
- Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "14th World Congress on Advances in Oncology" και "12th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2009, Λουτράκι
- Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "13th World Congress on Advances in Oncology" και "11th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2008, Χερσόνησος, Κρήτη
- Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "12th World Congress on Advances in Oncology" και "10th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2007, Χερσόνησος, Κρήτη
- Μέλος της τοπικής οργανωτικής επιτροπής των συνεδρίων "10th World Congress on Advances in Oncology" και "8th International Symposium on Molecular Medicine", Οκτώβριος 2005, Χερσόνησος, Κρήτη
- Απρίλιος 2005, Διοργάνωση Δ.Σ. της Ελληνικής Επιτροπής Διεθνών Σχέσεων και Ανταλλαγών Φοιτητών Ιατρικής, Ηράκλειο, Κρήτη
- Συμμετοχή στη Γενική Συνέλευση της IFMSA (International Federation of Medical Students' Associations) ως αντιπρόσωπος της ελληνικής αποστολής, Αντάλια, Τουρκία, Μάρτιος 2005

- Συμμετοχή στη Γενική Συνέλευση της IFMSA (International Federation of Medical Students' Associations) ως αντιπρόσωπος της ελληνικής αποστολής, νήσος Μαργαρίτα, Βενεζουέλα, Μάρτιος 2004
- Οκτώβριος 2001 - Ιούλιος 2007, Μέλος της Ελληνικής Επιτροπής Διεθνών Σχέσεων & Ανταλλαγών Φοιτητών Ιατρικής - HELMSIC (IFMSA member)
 - 2004-6 Μέλος του Δ.Σ. (Ταμίας)
- Οκτώβριος 2001 - Ιούλιος 2007, Σύλλογος Φοιτητών Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης
 - 2002-3 Μέλος Επιτροπής Φοιτητικής Μέριμνας
 - 2003-4 Μέλος Επιτροπής Προπτυχιακών Σπουδών
 - 2004-5 Μέλος Συγκλήτου Πανεπιστημίου Κρήτης
 - 2002-6 Μέλος Γενικής Συνέλευσης Τμήματος Ιατρικής
- Ιούνιος 2002 - Ιούλιος 2007, Μέλος της Επιστημονικής Εταιρείας Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας (ΕΕΦΙΕ)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός του προτεινόμενου ερευνητικού έργου αποτέλεσε η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της έκφρασης παραγόντων σχετιζόμενων με υποξικές καταστάσεις σε πλακούντες από τελειόμηνες εγκυμοσύνες με εμβρυική υπολειπόμενη ανάπτυξη (ΕΥΑ) σε έδαφος ή μη προεκλαμψίας.

Η ενδομήτρια υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη (ΕΥΑ) είναι ένα σύνθετο πρόβλημα στη σύγχρονη μαιευτική. Η αποτυχία του εμβρύου να φτάσει στο γενετικά καθορισμένο αναπτυξιακό του πρότυπο, συνδέεται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα, ενώ παράλληλα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα καρδιαγγειακών παθήσεων και μεταβολικών διαταραχών στην ενήλικη ζωή. Πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για την ΕΥΑ, ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις είτε η πρωτοπαθής ανώμαλη πλακουντοποίηση είτε η δευτεροπαθής βλάβη του πλακούντα είναι υπεύθυνη για την ανεπαρκή προσφορά θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου στο έμβρυο που οδηγεί στην επιβράδυνση της ανάπτυξής του. Επομένως, στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό φαίνεται να συμμετέχει η υποξία, η οποία επίσης συσχετίζεται με μια σειρά παθολογικών καταστάσεων της κύησης συμπεριλαμβανομένης της προεκλαμψίας.

Η προεκλαμψία εμφανίζεται στο 4-6% των κυήσεων και μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία της μητέρας και στην ανάπτυξη του εμβρύου. Πρόκειται για μία νόσο που χαρακτηρίζεται από αύξηση της αρτηριακής πίεσης μετά την 20η εβδομάδα της κύησης σε συνδυασμό με πρωτεϊνουρία ή/και οίδημα. Με βάση μελέτες της τελευταίας δεκαετίας, αποκαλύπτεται ότι σημαντική συμμετοχή στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας έχει η διαταραχή στην ισορροπία των κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων sFlt-1 (soluble vascular endothelial growth factor receptor-1), VEGF1 (vascular endothelial growth factor-1) και PlGF (placenta

growth factor), που οδηγεί σε ανωμαλίες του ενδοθηλίου των αγγείων και σε δεύτερο χρόνο στα κλινικά συμπτώματα της νόσου (θεωρία δύο σταδίων). Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζονται από διάφορες παραμέτρους, σημαντική εκ των οποίων, είναι και η υποξία.

Μία από τις βασικότερες διαδικασίες κατά την εξέλιξη μιας κύησης είναι η φυσιολογική δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας, που ξεκινάει με τη διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στο ενδομήτριο, ενώ στη συνέχεια ολοκληρώνεται με τη συνένωση με τα μητριάια σπειροειδή αγγεία. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής απαιτούνται δομικές αλλαγές τόσο στο ενδομήτριο που υποδέχεται την κυτταροτροφοβλάστη, όσο και στα μυϊκά κυρίως τοιχώματα των μητριάιων σπειροειδών αρτηριών με σκοπό τη δημιουργία των χοριακών λαχνών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη μετάβαση από συνθήκες υποξίας σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης σε κυτταρικό επίπεδο και επομένως απαιτεί τη σημαντική συμμετοχή των επαγόμενων από την υποξία ρυθμιστικών παραγόντων HIF.

Ο παράγοντας HIF-1 κατέχει βασικό ρόλο στο μηχανισμό «απάντησης» του κυττάρου σε καταστάσεις υποξίας. Δρα στον πυρήνα του κυττάρου επάγοντας την έκφραση πολλών πρωτεϊνών που διαδραματίζουν ρόλο στην αγγειογένεση, τον κυτταρικό κύκλο και το μεταβολισμό. Παρόμοια λειτουργία φαίνεται να διαδραματίζει και ο HIF-2, ενώ για τον HIF-3 τα δεδομένα είναι ελλιπή.

Ο τρόπος ρύθμισης των HIF φαίνεται να μη σχετίζεται μόνο με την επαγωγή/αναστολή της έκφρασής τους, αλλά και μετα-μεταφραστικά (post-translationally) με την αποδόμηση των HIF-α υπομονάδων τους, στην οποία ρόλο έχουν οι παράγοντες PHD-1, 2 και 3, καθώς και ο VHL. Σε υποξικές καταστάσεις όμως, η χαμηλή P_{O_2} αναστέλλει την υδροξυλίωση της HIF-α υπομονάδας από τους PHD και την ακόλουθη πρωτεασωματική αποδόμησή της

με τη συμμετοχή του VHL, με συνέπεια τη σταθεροποίησή της και τη δημιουργία του ετεροδιμερούς HIF μετά από την ένωση με τον HIF-b (ARNT) και τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Ο καταρράκτης (cascade) γεγονότων που ακολουθεί είναι κρίσιμος, αν συνυπολογίσει κανείς τον αριθμό και το ρόλο των γονιδίων στόχων των HIF (αγγειογένεση, κυτταρικός κύκλος, μεταβολισμός).

Φαίνεται λοιπόν ότι οι παραπάνω παράγοντες (HIF, PHD, VHL), ρυθμίζονται ανάλογα με τη μερική τάση του οξυγόνου, γεγονός που τους συνδέει άμεσα με καταστάσεις υποξίας, όπως πιθανότατα συμβαίνει στην εμβρυοπλακουντιακή κυκλοφορία σε εγκυμοσύνες με ΕΥΑ και προεκλαμψία.

Η αννεξίνη V (ANXA5) είναι μία άλλη πρωτεΐνη, η έκφραση της οποίας φαίνεται να είναι σημαντική στην εμβρυοπλακουντιακή κυκλοφορία. Η αντιθρομβωτική της δράση, την καθιστά αναγκαία στη διατήρηση της καλής αιματικής κυκλοφορίας, ενώ μειωμένα επίπεδα μπορεί να αποτελέσουν παράγοντα θρομβωτικών επεισοδίων στα αγγεία του χοριακού πλέγματος.

Στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκε η έκφραση των παραπάνω γονιδίων (HIF-1, HIF-2, HIF-3, ARNT, PHD-1, PHD-2, PHD-3, VHL και ANXA5) σε πλακουντιακό ιστό από 49 κυήσεις που εμφάνισαν ΕΥΑ σε έδαφος προεκλαμψίας ή ανεξάρτητα από αυτήν και από 30 κυήσεις με ομαλή πορεία και γέννηση ικανοποιητικού βάρους για την ηλικία κύησης νεογνού. Η παρουσία προεκλαμψίας και η ΕΥΑ επιβεβαιώθηκαν με κλινικά-εργαστηριακά και υπερηχογραφικά κριτήρια αντίστοιχα, ενώ αποκλείστηκαν οι περιπτώσεις ΕΥΑ που αποδόθηκαν σε συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα (θρομβοφιλία, ανοσολογικά και γενετικά αίτια, λοιμώξεις κ.ά). Όλοι οι πλακούντες εξετάστηκαν ιστοπαθολογικά. Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων έγινε αρχικά εξαγωγή εκχυλίσματος RNA από τα δείγματα και στη συνέχεια Real Time PCR. Επίσης επιλεκτικά έγινε εξαγωγή

εκχυλίσματος πρωτεϊνών από τα δείγματα και στη συνέχεια western blotting με φθορίζοντα αντισώματα. Για την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση έγινε μονιμοποίηση των δειγμάτων σε παραφίνη και μετά ανοσοϊστοχημική χρώση με ειδικά για την πρωτεΐνη μονοκλωνικά αντισώματα. Η ανάλυση για την εξαγωγή στατιστικής σημαντικότητας πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS και την εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης με τη χρήση μη παραμετρικών δοκιμασιών (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test).

Τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων έδειξαν σημαντική μείωση για τα γονίδια PHD-2, PHD-3 και ANXA5, μερική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων HIF-1a και HIF-2a, καθώς και του PHD-1, ενώ τα γονίδια ARNT, HIF-3a και VHL δεν έδειξαν ιδιαίτερα σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα.

Η ANXA5 έχει σαφώς μειωμένη έκφραση στην υπολειπόμενη ανάπτυξη και στην προεκλαμψία, γεγονός που δικαιολογεί την παρουσία περισσότερων θρόμβων στους πλακούντες των γυναικών με αυτές τις παθολογίες. Οι παράγοντες HIF φαίνεται να συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της εκδήλωσης IUGR κυρίως μέσω της μείωσης στην έκφραση του PHD-2 και του PHD-3, αλλά και με τη μικρή αύξηση των HIF-1a και HIF-2a. Η ρύθμιση των HIF είναι κυρίως μετα-μεταγραφική και η ελάττωση των παραγόντων αποδόμησής τους (PHD) αποτελεί σημαντικό κλειδί της ενεργοποίησης των HIF προς το δικό τους μεταγραφικό ρόλο. Επιπρόσθετα, από τις συσχετίσεις που προέκυψαν με διάφορες κλινικοεργαστηριακές και σωματομετρικές παραμέτρους μπορεί να υποστηριχθεί η ύπαρξη ενός μοντέλου κεντρικής απάντησης του εμβρύου μέσω παραγωγής παραγόντων από τον πλακούντα. Με βάση την παραπάνω θεωρία, στις κύσεις με ΕΥΑ τα έμβρυα με καλύτερο προφίλ ανάπτυξης παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο μεταβολών στην έκφραση των

μελετώμενων γονιδίων, σε σχέση με τα έμβρυα χειρότερης πρόγνωσης, εύρημα που υποδηλώνει τη δημιουργία απάντησης ή την αδυναμία απάντησης αντίστοιχα, στην υποξική αιτία που προκάλεσε ή συμμετείχε στην ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης.

ABSTRACT

This project aims at revealing the possible connection between expression of Hypoxia Inducible Factors (HIF) and their pathway in pregnancies affected with Fetal Growth Restriction (FGR) together or not with preeclampsia.

FGR is a complex condition in the field of current Obstetrics. The failure of a foetus to achieve its genetically determined growth potential is associated with significantly increased perinatal morbidity and mortality as well as being a major determinant of cardiovascular disease and glucose intolerance in adult life. FGR is not a disease entity with a unique pathophysiology. The term FGR is generally used for a foetus that presents reduced velocity pattern of growth (<10th centile). A variety of factors have been involved in this situation including infectious, congenital abnormalities, drug abuse or chemical substances, abnormalities of the placenta, immunological and anatomical factors. In most cases, however, incomplete placentation (placental formation) is the cause for the insufficient supply of nutritious substances and oxygen to the fetus that subsequently causes the deceleration of his growth. Hypoxia appears to constitute a common pathophysiological mechanism in almost the majority of the cases, and regardless the underlying pathology leads to the delay of fetal growth. Preeclampsia comprises a pathologic condition that, as many others, may cause foetus hypoxia.

Preeclampsia affects 4-6% of pregnancies and it may have serious consequences for the maternal health as well as for the development and well-being of the foetus. This pathological entity is characterized by an increase of the arterial pressure beyond the 20th week of gestation as well as by proteinuria and/or oedema. Although a variety of conditions

(including chronic hypertension, coagulopathies, immunological and genetic disorders, nutrition insufficiencies or abuses) appear to constitute risk factors and have been connected with higher risk of the disease; however, the molecular mechanisms and the precise causes that are hidden in the underlying pathophysiology remain unclear and raise a field of further investigation. Based on the studies of last decade, it has been revealed that the disturbance in the balance of circulating angiogenic factors (sFlt-1, VEGF1, PlGF) has an important role in the pathophysiology of preeclampsia that leads to endothelium abnormalities of vessels as well as to the symptoms of the disease. These factors are regulated by several other factors and conditions, but hypoxia seems to be one of the most important.

One of the more important processes at the development of gestation is the physiologic formation of the fetal-placental unit that begins with the infiltration of cytotrophoblasts into the endometrium and is completed when conjunction with the spiral arteries has occurred. During this process, structural changes are required both for the endothelium of endometrium that receives cytotrophoblasts invasion and for the elastic walls of spiral arteries. This process includes the passage from a hypoxia condition into a condition of physiologic oxygenation in a cellular level; in this process the role of Hypoxia Inducible Factors (HIF) is critical.

HIF-1 constitutes probably the most essential response of the cell to the hypoxia. It acts in the cell nucleus, by inducing the expression of many genes that play role in angiogenesis, cell cycle and metabolism. HIF-2 appears to have a similar function, while the data regarding HIF-3 are still insufficient. As the regulation of these factors is depending on the

oxygen concentration, a clear relationship is obvious between them and the hypoxia conditions of as FGR and preeclampsia. The regulation of HIF appears to relate not only with the induction/suspension of their expression, but also post-translationally with their degradation. Factors PHD-1, 2 and 3, as well as VHL play a role of their degradation. In some pathological situations, this model is probably disturbed and hypoxia maintains the regulating action of HIF in active levels.

It is obvious that all the above factors appear to possess a critical role in the process of pathogenesis of both FGR and preeclampsia. The adequate comprehension of the pathway of regulation of HIF may give an impulse to development of intervention models in those particular pathologic conditions that are related with hypoxia, common in many pregnancies. ANXA5 is also crucial for the uteroplacental unit due to its antithrombotic action.

During this study the action and regulation of the above mentioned factors (HIF-1a,-2a,-3a, ARNT, PHD-1,-2,-3, VHL and ANXA5) was investigated in term placentas from 49 FGR gestations related or not to preeclampsia compared to 30 term placentas from normal pregnancies. FGR and preeclampsia were diagnosed with clinical and laboratory data and cases with particular pathological cause such as thrombophilia, chromosomal defects, infections and others were excluded. All placentas were examined by a pathologist. RT-PCR was the molecular technique of choice to determine expression profiles for each gene. Western blotting and immunohistochemistry was also performed in selected cases. Statistical analysis was processed with the use of SPSS software.

The final results revealed marked downregulation of PHD-2, PHD-3 and ANXA5, slight upregulation of HIF-1a and HIF-2a, along with PHD-1,

while ARNT, HIF-3a and VHL expressions didn't produce significant differences between FGR and normal placentas.

ANXA5 was expected to be downregulated, since placentas from FGR and preeclamptic pregnancies showed infarcts presence. Downregulation of PHD-2 and PHD-3, along with upregulation of HIF-1a and HIF-2a points out the inducible effect that hypoxia seems to have in HIF transcriptional pathway. Stabilization of HIF-a subunits by reduction of PHD proteins is more crucial for activation of HIF than HIF expression by itself. Moreover, with the clinical and demographic data correlation analysis along with expression profiles, a new model is introduced. Based on these results, it can be hypothesized that FGR babies with less severe disease, are able to produce a signal stimulated by the reduced placental nutrient and oxygen availability in order to overcome it, in contrast to FGR babies with a more adverse outcome that fail to produce this signal. This adaptation model is evident through the different expression pattern of the genes examined.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Το έμβρυο κατά τη σύλληψή του εμπεριέχει μία γενετικά καθορισμένη οδηγία σχετικά με την ανάπτυξή του [1]. Το κατά πόσο η ανάπτυξη του εμβρύου θα εξελιχθεί σύμφωνα με τη γενετική καταβολή του, εξαρτάται από την υγιή πορεία της εγκυμοσύνης. Έτσι πιθανές διαταραχές που αφορούν είτε σε μητρικό παράγοντα είτε σε εμβρυικό παράγοντα είτε στον πλακούντα, μπορούν να μεταβάλλουν τη φυσιολογική αυτή ανάπτυξη, προκαλώντας καθυστέρηση στην ενδομήτρια αύξηση [2,3].

Η γέννηση ενός νεογνού με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (ΥΕΑ) υποδηλώνει ένα μικρό για την ηλικία κύησης νεογνό, το βάρος και οι σωματομετρικοί δείκτες του οποίου να είναι κάτω από την 10^η ή ακόμα και την 3^η εκατοστιαία θέση για την ηλικία κύησης [4-6]. Είναι εύκολα αντιληπτό ότι υπάρχει θεμελιώδης διαφορά ανάμεσα σε ένα μικρό νεογνό, το οποίο όμως απλά είχε τη γενετική οδηγία να αναπτυχθεί μικρό σε σχέση με εκείνο, στο οποίο κάποιος παράγοντας έδρασε προκαλώντας καθυστέρηση στην ανάπτυξή του. Τα νεογνά της δεύτερης κατηγορίας, στα οποία αναφέρεται και ο ορισμός υπολειπόμενη ενδομήτρια εμβρυική ανάπτυξη (ΥΕΑ), παρουσιάζουν σημαντική νοσηρότητα βραχυπρόθεσμα και ίσως μακροπρόθεσμα [7-9].

Οι καμπύλες ανάπτυξης αποτελούν ένα εργαλείο που βοηθάει στην καλύτερη και ευκολότερη κατηγοριοποίηση της ΕΥΑ. Πράγματι, νεογνά με βάρος γέννησης μικρότερο από δύο σταθερές απόκλισης του μέσου όρου βάρους για την ίδια ηλικία κύησης, θεωρήθηκαν ΕΥΑ, σύμφωνα με τη χρήση των πρώτων καμπυλών ανάπτυξης [10]. Σήμερα δεν υπάρχει ακριβής ορισμός για την ΕΥΑ, αφού διαφορετικά συστήματα ταξινόμησης χρησιμοποιούν διαφορετικό όριο στις καμπύλες ανάπτυξης κάτω από το οποίο μπαίνει η διάγνωση [11,12].

Μέχρι την 20^η εβδομάδα κύησης, το έμβρυο αναπτύσσεται κυρίως με αύξηση στον αριθμό των κυττάρων και ταχύ ρυθμό μίτωσης (στάδιο υπερπλασίας). Μεταξύ 20 και 28 εβδομάδων κύησης, ο ρυθμός μίτωσης μειώνεται και αυξάνεται το μέγεθος των κυττάρων. Μετά τις 28 εβδομάδες υπάρχει ταχεία κυτταρική αύξηση και συσσώρευση λίπους, μυϊκού και συνδετικού ιστού (υπερτροφικό στάδιο). Το 95% της πρόσληψης βάρους στο έμβρυο λαμβάνει χώρα στο δεύτερο μισό της κύησης. Η εμβρυϊκή αύξηση επιταχύνεται από περίπου 5 γρ. την ημέρα κατά την 14^η - 15^η εβδομάδα της κύησης, σε 10 γρ. την ημέρα κατά την 20^η εβδομάδα της κύησης, με αποκορύφωμα τα 30-35 γρ. την ημέρα κατά την 32^η - 34^η εβδομάδα της κύησης, ύστερα από την οποία ο ρυθμός αύξησης μειώνεται.

Η ΕΥΑ μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη ο βλαπτικός παράγοντας επιδρά από τα αρχικά στάδια της κύησης και έτσι η υπολειπόμενη ανάπτυξη είναι συμμετρική, αφού αφορά σε όλα τα όργανα, ενώ εμφανίζεται στο 20-30% των εμβρύων με ΕΥΑ [13,14]. Όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό, η βαρύτητα της συμμετρικής ΕΥΑ είναι μεγαλύτερη, η πρόγνωση χειρότερη, ενώ συχνά αίτια αποτελούν οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και οι ενδομήτριες λοιμώξεις (κυρίως από CMV) [15].

Στη δεύτερη κατηγορία, ο βλαπτικός παράγοντας ξεκινά να επιδρά αργότερα στην διάρκεια της κύησης, όταν ο οργανισμός του εμβρύου μπορεί να «διασώσει» τον εγκέφαλο σε σχέση με τα υπόλοιπα σπλαχνικά όργανα όταν υπάρχουν διαταραχές παροχής οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Έτσι το έμβρυο οδηγείται σε ασύμμετρη ΕΥΑ [16,17].

Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο κατηγοριών αποτελεί η παρατήρηση ότι σχεδόν πάντοτε συνοδεύονται από προβλήματα στην πλακουντοποίηση [18].

Επιδημιολογικά η εμφάνιση νεογνών με ΕΥΑ παρουσιάζει αύξηση και πιθανότερος παράγοντας που ευθύνεται για αυτό αποτελεί η αύξηση της συχνότητας πολύδυμων κυήσεων, αλλά και η ελάχιστη πρόοδος στη πρόβλεψη και θεραπεία της ΕΥΑ [19]. Η συχνότητα εμφάνισης είναι περί του 4-7% των γεννήσεων και σχετίζεται με 8 φορές αυξημένη περιγεννητική νοσηρότητα και θνητότητα [20,21].

Παρόλο που η συνεχιζόμενη έρευνα έχει εντοπίσει αρκετούς αιτιολογικούς παράγοντες στην παθοφυσιολογία της ΕΥΑ, δεν υπάρχει προβλεπτικός παράγοντας ικανός να διαγνώσει την ΕΥΑ στην αρχή της κύησης, ούτε θεραπευτικά υπάρχουν πολλές επιλογές [22]. Η αιτιολογία που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση της ΕΥΑ είναι δύσκολο να εκτιμηθεί πάντα, αλλά γίνονται προσπάθειες βελτίωσης στον τομέα αυτό αφού έχει γίνει μία καταγραφή των σημαντικότερων αιτιών. Έτσι νοσήματα του εμβρύου, της μητέρας, πρωτοπαθείς διαταραχές του πλακούντα, ή εξωγενείς παράγοντες, μπορεί να παρέμβουν στην ομαλή ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου με αποτέλεσμα την καθυστέρηση της ενδομήτριας αύξησης. Σε κάποιες περιπτώσεις νοσημάτων του εμβρύου η ΕΥΑ μπορεί να αποτελεί το μοναδικό σημείο της υποκείμενης νόσου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να συνυπάρχουν και ανωμαλίες και σε άλλα οργανικά συστήματα του εμβρύου.

Νόσοι της μητέρας όπως η χρόνια νεφρική νόσος, η υπέρταση, οι κολλαγνώσεις, η θρομβοφιλία και άλλοι παράγοντες όπως το κάπνισμα, η κακή θρέψη και η χρήση τοξικών ουσιών, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΕΥΑ. Πολλές από τις παραπάνω αιτίες της ΕΥΑ μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν και επιδρούν κυρίως στην ανάπτυξη και λειτουργία του πλακούντα.

Τα αίτια από το έμβρυο μπορεί να είναι χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή συγγενείς δυσπλασίες. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως η τρισωμία 13, 18 και

21 συχνά συνοδεύονται από ΕΥΑ. Συνολικά, οι χρωμοσωμικές διαταραχές και οι πολυπαραγοντικές συγγενείς διαμαρτίες ευθύνονται για περίπου το 20% των εμβρύων με ΕΥΑ, ενώ το ποσοστό αυξάνεται αν η ΕΥΑ εμφανιστεί πριν την 26^η εβδομάδα κύησης. Οι εμβρυικές λοιμώξεις μπορούν επίσης να αποτελέσουν αίτιο ΕΥΑ, ιδίως η λοίμωξη από κυτταρομεγαλοϊό πριν την 20^η εβδομάδα κύησης. Άλλες λοιμώξεις που ενοχοποιούνται για ΕΥΑ είναι η μητρική περιτονίτιδα, η λοίμωξη από *H.Pylori*, πρωτοζωικές λοιμώξεις, καθώς και η σύφιλη.

Τα αίτια από τον πλακούντα σχετίζονται βασικά με τη σχετική ή απόλυτη μείωση της μάζας του, η οποία επηρεάζει την ποσότητα των θρεπτικών συστατικών που θα λάβει το έμβρυο και φαίνεται να προηγείται χρονικά της διάγνωσης της ΕΥΑ. Σε μία μελέτη 1569 χρωμοσωμικά φυσιολογικών νεογνών με ΕΥΑ, φάνηκε πως είχαν κατά 24% μικρότερους πλακούντες σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών νεογνών. Η ανώμαλη πλακουντοποίηση που μπορεί να υπάρχει στα πλαίσια περιχαρακωμένου πλακούντα, μερικής αποκόλλησης του πλακούντα, στιφρού πλακούντα, εμφράκτων, αιμαγγειωμάτων και χοριοαγγειωμάτων έχει σχετιστεί με αυξημένα επίπεδα α-φετοπρωτεΐνης και ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης και αυξημένο κίνδυνο ΕΥΑ. Επίσης, παράγοντες που επηρεάζουν την ομαλή εμβρυοπλακουντιακή ανταλλαγή συστατικών, όπως η ύπαρξη μονήρους ομφαλικής αρτηρίας ή η παρουσία πλακουντιακού μωσαϊκισμού, έχουν βρεθεί σε περιπτώσεις ΕΥΑ. Άλλος σημαντικός παράγοντας που φαίνεται να σχετίζεται με εμφάνιση ΕΥΑ είναι η θέση του πλακούντα. Έτσι ο προδρομικός πλακούντας έχει ενοχοποιηθεί, αφού η χαμηλή θέση πρόσφυσης έχει πιθανή επιρροή στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών.

Γενικά οι ανωμαλίες του εμβρύου (χρωμοσωμικές και/ή ανατομικές) και οι διαταραχές στην πλακουντιακή κυκλοφορία αποτελούν τη μεγάλη πλειοψηφία της ΕΥΑ στις μονήρεις κυήσεις. Η πιο συχνή αιτία ΕΥΑ (80-90% των περιστατικών) είναι η ανεπαρκής παροχή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου από τον πλακούντα προς το έμβρυο [16]. Υπάρχουν αρκετές επίσης αιτίες που οδηγούν σε κυτταρική υποπλασία και επιδρούν στα αρχικά στάδια της κύησης όπως τα χρωμοσωμικά, γενετικά και λοιμώδη αίτια [23].

Αναλυτικότερα από τους μητρικούς παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε ΕΥΑ σημαντικότεροι είναι οι παρακάτω:

- **Δημογραφικοί παράγοντες:** Η παλαιότερη αντίληψη ότι η μεγάλη ηλικία της μητέρας μπορεί να προξενήσει διαταραχές στην ανάπτυξη του εμβρύου δεν φάνηκε να επιβεβαιώνεται από νεότερες μελέτες [24]. Οι Αφροαμερικάνες γυναίκες, καθώς και οι γυναίκες Ινδικής και Ασιατικής γενικότερα καταγωγής, εμφανίζουν συχνότερα μωρά με ΕΥΑ σε σχέση με τις λευκές γυναίκες [25,26]. Επίσης η γέννηση του πρώτου παιδιού αποτελεί αυξημένο παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης ΕΥΑ σε σχέση με επόμενες κυήσεις για την ίδια γυναίκα [27]. Το χαμηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, το οποίο μπορεί να εμπλέκει το κάπνισμα, το αλκοόλ, την κακή θρέψη και άλλα προβλήματα έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση ΕΥΑ [28]. Το μικρό βάρος και ύψος της γυναίκας ή γενικότερα ο χαμηλός δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) φαίνεται να απαντιούνται πιο συχνά σε περιστατικά με ΕΥΑ [29], αν και δε λαμβάνονται πάντα σωστά υπόψη στην υπερηχογραφική εκτίμηση του εμβρύου, οδηγώντας σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Πάντως μελέτες αναφέρουν πως γυναίκες που είχαν χαμηλό βάρος γέννησης, έχουν 4,7 περισσότερες πιθανότητες να γεννήσουν παιδί με επίσης χαμηλό βάρος [30].

- **Θρέψη της μητέρας:** Από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε εγκυμοσύνες σε περιόδους κακουχιών, φάνηκε πως η επίδραση της υποθρεψίας στο μέγεθος του εμβρύου είναι εντονότερη στα τελευταία στάδια της κύησης [31]. Η διαίτα που περιλαμβάνει υδατάνθρακες, φρούτα, φυλλικό οξύ, βιταμινούχα σκευάσματα και συμπληρώματα σιδήρου έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης ΕΥΑ [32]. Επίσης γενικότερα γυναίκες με φυσιολογικό ΔΜΣ και πρόσληψη βάρους στην εγκυμοσύνη φυσιολογικών κιλών αποτελούν προστατευτικούς παράγοντες για τη σωστή ανάπτυξη του εμβρύου [33]
- **Κάπνισμα:** Το κάπνισμα παθητικό ή ενεργητικό αποτελεί σημαντικό παράγοντα εμφάνισης ΕΥΑ [34,35]. Γενικά γυναίκες που καπνίζουν ή κάπνιζαν μέχρι την εγκυμοσύνη έχουν αυξημένη συχνότητα γέννησης μικρότερων από το μέσο όρο νεογνών.
- **Θρομβοφιλία:** Η κύηση οδηγεί σε φυσιολογικές αλλαγές στους μηχανισμούς που σχετίζονται με την πήξη του αίματος και έτσι όταν συνυπάρχει κάποιο υπόβαθρο θρομβωτικής προδιάθεσης είναι ευκολότερο να εμφανιστούν επιπλοκές στην κύηση. Συχνό εύρημα στην ιστολογική εξέταση του πλακούντα από επιπλεγμένη κύηση αποτελεί η έντονη παρουσία θρόμβων και σίγουρα αποτελεί εμπόδιο στη σωστή ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών μεταξύ μητέρας και εμβρύου, επομένως μπορεί να οδηγήσει πέρα από άλλα νοσήματα και σε ΕΥΑ [36].
- **Προεκλαμψία και Εκλαμψία:** Οι δύο αυτές οντότητες αποτελούν ουσιαστικά νοσήματα που οφείλονται σε υψηλό στρες του ενδοθηλίου των αγγείων της μητέρας με ασαφείς ακόμα συγκεκριμένες αιτίες. Οι συνέπειες από τη διαταραχή που προκαλείται στα μητρικά αγγεία επηρεάζουν και τον πλακούντα, οπότε και διαταράσσεται η ομαλή ανταλλαγή ουσιών και αερίων. Έτσι συχνό αποτέλεσμα αποτελεί η εμφάνιση ΕΥΑ σε προεκλαμπτικές εγκύους.

Οι σημαντικότεροι εμβρυϊκοί παράγοντες που έχουν συσχετιστεί με ΕΥΑ είναι:

- Πολύδυμη κύηση: Όταν η μήτρα φιλοξενεί περισσότερα του ενός εμβρύων, υπολείπονται συνήθως στην ανάπτυξη σε σχέση με έμβρυα από μονήρεις κυήσεις. Ειδικά μετά την 30^η περίπου εβδομάδα κύησης εμφανίζονται σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ πολύδυμων και μονήρων κυήσεων. Συνήθως μειώνεται η ανάπτυξη του βάρους ενός μόνο από τα κυήματα, ενώ το άλλο μπορεί να έχει φυσιολογική ανάπτυξη [37]. Η εμφάνιση ΕΥΑ κατά τη διάρκεια μίας πολύδυμης κύησης συσχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα ανεξάρτητα με την ηλικία κύησης. Η συχνότητα εμφάνισης ΕΥΑ είναι διπλάσια σε μία μονοχοριονική δίδυμο κύηση σε σχέση με μία διχοριονική [38].
- Γενετικοί και χρωμοσωμικοί παράγοντες: Υπάρχει μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ΕΥΑ και της ύπαρξης χρωμοσωμικών και συγγενών ανωμαλιών. Χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανευρίσκονται στο 7% των νεογνών με ΕΥΑ που είναι δεκαπλάσιο ποσοστό από ότι στα νεογνά φυσιολογικού βάρους. Έμβρυα με τρισωμία 13,18 και 21 υπολείπονται συνήθως στην ανάπτυξη, όπως επίσης και τα νεογνά με αυτοσωμικές ανωμαλίες όπως ελλείψεις και διπλασιασμούς χρωμοσωμάτων. Αν και οι ανωμαλίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων οδηγούν συνήθως σε εμβρυϊκό θάνατο, τα έμβρυα που επιβιώνουν έχουν κατά κανόνα μικρότερο βάρος γέννησης. Από μελέτες που έγιναν στον καρύοτυπο νεογνών με ΕΥΑ, ποσοστό 19% είχαν κάποια καρυστυπική ανωμαλία [39]. Συνολικά, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και οι πολυπαραγοντικές συγγενείς ανωμαλίες ευθύνονται για το 20% των νεογνών με ΕΥΑ, ενώ συνήθως πρόκειται για συμμετρικού τύπου ΕΥΑ και εμφανίζεται νωρίς στη διάρκεια της εγκυμοσύνης [39].

- Συγγενείς λοιμώξεις: Η ανάπτυξη ενός εμβρύου μπορεί να επηρεαστεί από λοιμώδεις παράγοντες, αν και δεν είναι όλοι τους το ίδιο επιβαρυντικοί. Έτσι ο κυτταρομεγαλοϊός, η ερυθρά και ο έρπητας αποτελούν συχνές αιτίες ΕΥΑ, ενώ η λοίμωξη από τοξόπλασμα δε φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου [40,41].

Πλακουντιακή ανεπάρκεια: Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πολύ συχνά στην παθοφυσιολογία της ΕΥΑ συμμετέχει η πλακουντιακή ανεπάρκεια. Αφορά συνήθως περιπτώσεις όπου η καθυστέρηση της ανάπτυξης είναι ασύμμετρη και επομένως εμφανίζεται κυρίως μετά το δεύτερο μισό της κύησης. Ο ακριβής τρόπος που διάφορες παθολογίες οδηγούν τελικά στην προβληματική εμβρυοπλακουντιακή επικοινωνία δεν είναι πάντα γνωστός παρά την πρόοδο των διαγνωστικών εργαλείων και έτσι δεν είναι εύκολο να προβλεφθεί μία ΕΥΑ, αν και ο αιτιολογικός παράγοντας ενδέχεται να δρα πολύ πριν την υπερηχογραφική εκδήλωσή της.

Η ανώριμη πλακουντοποίηση και η κακή θρέψη του εμβρύου οδηγούν στην προσπάθεια αγγειογενετικής δραστηριότητας λόγω του υποξικού στρες. Η αγγειογένεση υπό αυτές τις συνθήκες όμως μπορεί να είναι σχετικά άναρχη και να επανατροφοδοτεί την υποξία [42]. Υπάρχει δηλαδή μία προσπάθεια αυτορρύθμισης και αντιρρόπησης της ανεπάρκειας του πλακούντα με σκοπό να εξυπηρετήσει τις αυξανόμενες ανάγκες της κύησης. Αν οι μηχανισμοί αντιρρόπησης που ενεργοποιηθούν, επιτρέψουν τη συνέχιση της κύησης, αλλά σε συνθήκες μειωμένης ικανότητας απόδοσης θρεπτικών συστατικών, τότε η ανεπαρκής τροφοδοσία του πλακούντα θα έχει άμεση επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Σε αυτό το στάδιο διαγνωστικά μπορεί να γίνει μία εκτίμηση της κατάστασης με την υπερηχογραφική μέθοδο Doppler. Μετρώντας το Doppler των μητριάων αρτηριών γίνεται μία καταγραφή της παροχής αίματος από τη

μητέρα προς τον πλακούντα, ενώ οι μετρήσεις που αφορούν στο έμβρυο, δίνουν πληροφορίες για την πλακουντιακή λειτουργία και την ανταπόκριση του εμβρύου στη στέρηση των θρεπτικών συστατικών [43].

Στις κήσεις που επιπλέκονται με ΕΥΑ, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη μεταφορά συστατικών μεταξύ μητέρας και εμβρύου όπως επίσης και στο μεταβολισμό πλακούντα και εμβρύου που δείχνουν μία στροφή αυτών των διεργασιών προς μία πιο καταβολική φάση. Η στέρηση παροχής αίματος από τη μήτρα προς το έμβρυο, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού ανάπτυξης προς όφελος του εγκεφάλου του εμβρύου. Το έμβρυο αντιδρά στην ανεπαρκή παροχή συστατικών με μία σειρά μηχανισμών, με τελικό στόχο τη μεγιστοποίηση των πιθανοτήτων επιβίωσης στην εξωμήτριο ζωή. Ο πρώτος μηχανισμός που επιστρατεύεται είναι η αύξηση του καταβολισμού με σκοπό την παροχή ενέργειας. Με αυτόν τον τρόπο και λόγω της υποθρεψίας των περισσότερων ιστών, παρατηρείται μία συνολική αλλαγή του μεταβολισμού του εμβρύου και παράλληλα μία αλλαγή στην ορμονική ισορροπία και ρύθμιση των ιστών από αυτές [44]. Από διάφορες μελέτες σε πειραματόζωα, φάνηκε ότι η αρχική αντίδραση της μειωμένης πλακουντιακής παροχής έχει σαν αποτέλεσμα τον ασύμμετρο ρυθμό ανάπτυξης χωρίς αλλαγή στο βάρος του εμβρύου και την αύξηση του λόγου βάρους εγκεφάλου/ήπατος. Τα επινεφρίδια του εμβρύου υπερτρέφονται και κατά συνέπεια αυξάνεται η δράση των γλυκοκορτικοειδών, ενώ μειώνεται το βάρος του θύμου αδένος. Ο ρυθμός σύνθεσης του DNA μειώνεται στους σκελετικούς μύες, αλλά και στον καρδιακό μυ. Όταν η ανεπαρκής παροχή παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα ή έχει ξεκινήσει από νωρίς στην κύηση, πέρα από τις παραπάνω αλλαγές, παρατηρείται και μείωση του βάρους του εμβρύου κατά 25-30%. Το αμνιακό υγρό μειώνεται πλέον του 60%. Αργότερα εγκαθίσταται και υπερτροφία του μυοκαρδίου. Αν όλοι αυτοί οι μηχανισμοί αντιρρόπησης

φτάσουν σε οριακό στάδιο, τότε αρχίζει να τίθεται σε άμεσο κίνδυνο η επιβίωση του εμβρύου [2].

Σχετικά με τη διάγνωση ενός εμβρύου που παρουσιάζεται μικρό για την ηλικία κύησης χρησιμοποιούνται κυρίως υπερηχογραφικές μετρήσεις που κατατάσσουν το έμβρυο σε κάποιες πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης. Προϋπόθεση για να υπάρχει αξιόπιστη μέτρηση είναι ο ακριβής υπολογισμός της ηλικίας κύησης που βασίζεται στην υπερηχογραφική μέτρηση της ηλικίας κύησης κατά τα αρχικά της στάδια [45]. Προτεινόμενη μέθοδος για την εκτίμηση του εμβρυϊκού βάρους είναι εκείνη που συνυπολογίζει ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, όπως η περίμετρος της κοιλιάς του εμβρύου, η περίμετρος κεφαλής, η αμφιβρεγματική διάμετρος και το μήκος του μηριαίου οστού. Αυτές οι μετρήσεις μετατρέπονται σε εκτιμώμενο εμβρυϊκό βάρος με βάση συγκεκριμένους μαθηματικούς τύπους οι οποίοι βασίζονται σε καμπύλες αύξησης βάρους σε σχέση με την ηλικία κύησης. Όπως γίνεται αντιληπτό για την εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης του εμβρύου, δηλαδή της αλλαγής του μεγέθους του με την πάροδο του χρόνου, απαραίτητη είναι μια μακροπρόθεσμη εκτίμηση με τουλάχιστον δύο διαδοχικές υπερηχογραφικές μετρήσεις. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος μαθηματικός τύπος είναι εκείνος των Shepard και συνεργατών, που βασίζεται στην αμφιβρεγματική διάμετρο και την περιφέρεια της κοιλιάς του εμβρύου και ο τύπος των Hadlock και συνεργατών που χρησιμοποιεί την περίμετρο κεφαλής, την περίμετρο της κοιλιάς και το μήκος του μηριαίου [46,47]. Όσο πιο συχνά γίνονται οι διαδοχικές μετρήσεις τόσο ευκολότερο είναι να αναδειχθεί η ενδεχόμενη καθυστέρηση στο ρυθμό ανάπτυξης. Για να βελτιωθεί η αξιοπιστία της ανίχνευσης έχουν προταθεί ειδικοί πίνακες οι οποίοι λαμβάνουν υπόψη και τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας. Δηλαδή άλλο εκτιμώμενο βάρος εμβρύου έχει μία χαμηλού αναστήματος και

γενικά μικρόσωμη μητέρα από μία μεγαλόσωμη. Οι πίνακες εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι κυρίως χρήσιμοι για την αρχική ανίχνευση των εμβρύων με ΕΥΑ. Είναι λοιπόν σαφές ότι σε όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης της υγείας αυτών των εμβρύων και στη λήψη όποιας θεραπευτικής απόφασης για επίσπευση του τοκετού, η Doppler υπερηχογραφία έχει κυρίαρχη θέση.

Όσο αφορά τα όρια, τα οποία χρησιμοποιούνται με βάση τις καμπύλες ανάπτυξης για την κατάταξη ενός εμβρύου στην κατηγορία των μικρών για την ηλικία κύησης, παραδοσιακά θεωρείται η 10^η εκατοστιαία θέση του εκτιμούμενου βάρους. Σε κάποια πρωτόκολλα χρησιμοποιείται η 5^η ή ακόμα και η 3^η εκατοστιαία θέση αυξάνοντας έτσι την ειδικότητα της μεθόδου, αλλά μειώνοντας την ευαισθησία της στη διάγνωση των ΕΥΑ. Ο πιο πρόσφατος ορισμός κατατάσσει ένα έμβρυο στα μικρά για την ηλικία κύησης όταν το βάρος που εκτιμάται από τις μετρήσεις είναι μικρότερο από το μέσο όρο της συγκεκριμένης ηλικίας κύησης μείον 2 Σταθερές Αποκλίσεις (Standard Deviation, SD) [42].

Το επόμενο βήμα μετά τη διάγνωση ενός εμβρύου με ΕΥΑ αποτελεί την προσπάθεια διερεύνησης πιθανών αιτιών της κατάστασης. Έτσι μπορούν να γίνουν εξετάσεις στη μητέρα για αποκλεισμό κάποιας λοίμωξης ή τη διερεύνηση για προεκλαμψία, αλλά ακόμα και για πιο σπάνια νοσήματα όπως Θρομβοφιλίες και άλλες διαταραχές που μπορούν να σχετίζονται με ΕΥΑ, όπως αναφέρθηκαν και παραπάνω. Μπορεί να χρειαστεί να γίνει καρυότυπος του εμβρύου ή πιο εξειδικευμένα γενετικά τεστ και πιθανά παροχή γενετικής συμβουλής από γενετιστή. Κακή θρέψη ή λήψη φαρμάκων και τοξινών από τη μητέρα, θα πρέπει επίσης να διερευνηθούν. Μετά τη γέννηση η ιστολογική εξέταση του πλακούντα από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο, μπορεί να αναδείξει ισχαιμικές και αγγειακές αλλοιώσεις ή κάποιο ιστολογικό εύρημα ειδικότερο για συγκεκριμένη παθολογία [42].

Παράλληλα με τη διερεύνηση της αιτιολογίας εμφάνισης της ΕΥΑ, η οποία πολλές φορές δεν έχει σαφή και ξεκάθαρα αποτελέσματα, το ιατρικό προσωπικό καλείται να παρακολουθήσει την πορεία της εγκυμοσύνης, ώστε να εκτιμάται περιοδικά οποιαδήποτε εμβρυική δυσπραγία. Το καλύτερο εργαλείο στα ιατρικά χέρια για αυτήν την παρακολούθηση αποτελεί το υπερηχογράφημα Doppler [48]. Πέρα από τις μετρήσεις που αναφέρθηκαν σχετικά με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά του εμβρύου, το Doppler της ομφαλικής αρτηρίας, καθώς και αυτό της μητριάας αρτηρίας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την προσπάθεια που γίνεται στην πλακουντιακή κυκλοφορία να προσαρμοστεί στην μειωμένη παροχή. Έτσι, όλες οι κυήσεις που εμφανίζουν Doppler ομφαλικής αρτηρίας χωρίς τελοδιαστολικό κύμα ή ανάστροφο κύμα, είναι σίγουρο ότι πρόκειται για ΕΥΑ [49]. Το Doppler της μητριάας αρτηρίας παρόλο που χρησιμοποιείται κυρίως στη διαγνωστική προσέγγιση της προεκλαμψίας, δίνει σημαντικές πληροφορίες σε περιπτώσεις ΕΥΑ. Αλλαγές που παρατηρούνται στην εμβρυική κυκλοφορία επίσης είναι ενδεικτικές ΕΥΑ, καταδεικνύοντας την ανακατανομή της αιματικής ροής προς όφελος του εγκεφάλου και των επινεφριδίων των εμβρύων αυτών. Έτσι γίνονται μετρήσεις Doppler υπερηχοτομογραφίας της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας, του φλεβώδη πόρου και της ομφαλικής φλέβας [50,51].

Άλλες διαγνωστικές μετρήσεις επικουρικές στην παρακολούθηση των κυήσεων με ΕΥΑ είναι η καρδιοτοκογραφία, ο δείκτης όγκου του αμνιακού υγρού, το εμβρυικό βιοφυσικό προφίλ που μετράει την κινητικότητα του εμβρύου και φυσικά η παράλληλη παρακολούθηση των βασικών λειτουργιών και δεικτών της μητέρας.

Όλες οι παραπάνω περιγραφόμενες διαγνωστικές μέθοδοι, έχουν ως αποτέλεσμα την προσπάθεια κατάταξης της βαρύτητας της ΕΥΑ, ώστε να είναι ευκολότερο για την κάθε περίπτωση να ληφθεί η σωστή απόφαση για τη

διαχείριση της υπόλοιπης κύησης. Ανάλογα λοιπόν με τη βαρύτητα, το χρόνο κύησης και τις διενεργούμενες εξετάσεις αποφασίζεται η επίσπευση του τοκετού ή η αναμονή με στενότερη ή αραιότερη παρακολούθηση. Ο τρόπος τοκετού συνήθως είναι η καισαρική τομή, ώστε να μην υποβληθεί το έμβρυο στο στρες του τοκετού. Σε γενικές γραμμές, αν αποφασιστεί τοκετός σε ένα έμβρυο με ΕΥΑ, τότε η καισαρική τομή είναι η μέθοδος εκλογής σε πολύ πρόωρα έμβρυα ή σε έμβρυα με σοβαρές διαταραχές στη ροή του αίματος της ομφαλικής αρτηρίας. Θα πρέπει όμως οπωσδήποτε να συνεκτιμούνται και άλλοι παράγοντες, όπως η κατάσταση του τραχήλου, ο τόκος και το ιστορικό της εγκύου.

Φτάνοντας στον τοκετό, υπάρχει δυστυχώς η διαπίστωση ότι τα νεογνά με ΕΥΑ εμφανίζουν αυξημένη νοσηρότητα. Η νοσηρότητα συχνά σχετίζεται με την αιτιολογία που οδήγησε στην ΕΥΑ, αλλά πολλές φορές δεν είναι τόσο ξεκάθαρα τα δεδομένα. Νεογνολογική υποστήριξη προτείνεται πάντα σε έναν τοκετό νεογνού διαγνωσμένου με ΕΥΑ, αφού η υπογλυκαιμία και η υποθερμία είναι συχνά συμπτώματα, πέρα από το γεγονός της πιθανής προωρότητας. Επίσης μπορεί να εμφανιστεί ίκτερος. Δυστυχώς, τα προβλήματα της ΕΥΑ μπορεί να εμφανιστούν και σε μακροπρόθεσμη διάρκεια [52]. Πέρα από την παρακολούθηση των πρώτων μηνών για οποιαδήποτε νευρολογική ή αναπτυξιακή δυσπραγία, η ΕΥΑ έχει ενοχοποιηθεί και για χρόνια νοσήματα της ενήλικου ζωής, όπως διαβήτης, υπέρταση και άλλα [53].

Συμπερασματικά, είναι κατανοητό ότι κάποιοι παράγοντες που μπορεί να έχουν εμβρυική αρχή, να είναι εξωγενείς ή μητρικοί, αλλά που πάντα διαταράσσουν την πλακουντιακή λειτουργία, ευθύνονται για την αδυναμία του εμβρύου να αναπτυχθεί σύμφωνα με την γενετική του προδιάθεση. Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη που προκαλείται έχει σχετιστεί με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Η ιατρική παρέμβαση αν και έχει

περιορισμένες δυνατότητες ειδικά στην πρόβλεψη, είναι απαιτούμενη για να μειώσει το δυνατόν τις δυσάρεστες αυτές συνέπειες. Στο μέλλον, η καλύτερη κατανόηση της συνολικής παθοφυσιολογίας των περιπτώσεων ΕΥΑ καλείται να βελτιώσει τις εκβάσεις αυτών των κυήσεων.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα σχετικά με τις κυήσεις εκείνες που εμφανίζουν Εμβρυική Υπολειπόμενη Ανάπτυξη, γίνεται φανερό ότι υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες ο αιτιολογικός παράγοντας γίνεται εύκολα αντιληπτός από τις διαγνωστικές προσεγγίσεις, αλλά είναι πιθανό σε άλλες, να υπάρχει μία ασάφεια γύρω από την ακριβή αιτιολογία της συγκεκριμένης παθολογίας. Στις περιπτώσεις αυτές που διαγνωστικά έχουμε μόνο τα ευρήματα της ΕΥΑ, χωρίς κάποια άλλη συγκεκριμένη παθολογία, φαίνεται ότι σημαντικότερο ρόλο έχει η οποιαδήποτε διαταραχή στην ομαλή πλακουντοποίηση, είτε στα πρώτα στάδια της εμφύτευσης είτε αργότερα κατά τη δημιουργία του χοριακού δέντρου. Η κακή εμβρυοπλακουντιακή επικοινωνία έχει σίγουρα μία παθοφυσιολογία άμεσα σχετιζόμενη με την επαρκή οξυγόνωση και συνθήκες υποξίας μπορεί να λαμβάνουν χώρα στους πλακούντες αυτούς. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι κοινό σημείο πολλών κυήσεων με ΕΥΑ αποτελεί η διαταραχή στην καλή οξυγόνωση και επομένως η υποξία ίσως είναι κοινός παράγοντας στην παθοφυσιολογία της ΕΥΑ.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι κυριότερες αιτιολογίες ανάπτυξης ΕΥΑ.

Παράγοντες που ενοχοποιούνται για εκδήλωση ΕΥΑ

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

ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑ

Η υπέρταση στην εγκυμοσύνη αποτελεί συχνότατη διαταραχή, είτε στα πλαίσια χρόνιας υπέρτασης είτε ως πρώτη εκδήλωση συνήθως μετά την 20^η εβδομάδα κύησης με συχνότητα εμφάνισης σε πρωτότοκες γυναίκες σε ποσοστό 2-7%. Το φάσμα της εμφάνισης υπέρτασης εμπεριέχει από μία ήπια αύξηση της αρτηριακής πίεσης μέχρι σοβαρή υπέρταση με συνοδά συμπτώματα από άλλα συστήματα, οπότε πρόκειται για προεκλαμψία, εκλαμψία ή ακόμα και σύνδρομο HELLP (αιμόλυση - αύξηση ηπατικών ενζύμων - πτώση αιμοπεταλίων). Ενώ υπέρτασική νόσο στην κύηση μπορεί να αναπτύξουν πολλές γυναίκες, ένα ποσοστό αυτών, ίσως και 50%, θα προχωρήσει σε προεκλαμψία [54].

Η αρτηριακή πίεση στη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι φυσιολογικό να ελαττωθεί, με κατώτερη τιμή περίπου 15 mmHg λιγότερο σε σχέση με τα προεγκυμοσύνης επίπεδα κατά το 2^ο τρίμηνο [55]. Για τη διάγνωση της προεκλαμψίας σύμφωνα με τον ACOG (American College of Obstetrics and Gynecology) χρειάζεται αύξηση της συστολικής πίεσης άνω των 140 mmHg ή της διαστολικής άνω των 90 mmHg εμμένουσα σε δύο μετρήσεις και ανεύρεση λευκωμάτων στα ούρα 24ώρου μεγαλύτερη των 300mg. Το οίδημα, ειδικά των κάτω άκρων που παραδοσιακά έκλεινε την τριάδα της διάγνωσης της προεκλαμψίας δε θεωρείται πλέον αξιόπιστο κριτήριο, καθώς αφ' ενός είναι σύνηθες φαινόμενο κατά την φυσιολογική εγκυμοσύνη και αφ' ετέρου σχεδόν το 1/3 των ασθενών με προεκλαμψία δεν αναπτύσσουν οίδημα [55,56]. Ανάλογα με το μέγεθος της υπέρτασης και της λευκωματοουρίας η προεκλαμψία μπορεί να είναι ήπια έως και σοβαρή, προτού μεταπέσει σε εκλαμψία. Συμπτώματα συνοδά της νόσου μπορεί να αποτελούν η ολιγουρία (<500 ml ούρων το 24ώρο), η έντονη κεφαλαλγία, οι διαταραχές της όρασης, το πνευμονικό οίδημα με ή χωρίς κυάνωση, το άλγος στο επιγάστριο, η

Θρομβοπενία, η επηρεασμένη ηπατική λειτουργία και σύνδρομο HELLP [57]. Συχνά, αποτέλεσμα της προεκλαμψίας μπορεί να είναι και η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (ΕΥΑ). Η εκλαμψία είναι σοβαρή και σπάνια (1%) επιπλοκή - εξέλιξη της προεκλαμψίας με κύριο χαρακτηριστικό την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων (grand-male) λόγω υπερτασικής εγκεφαλοπάθειας.

Η συνηθέστερη εκδήλωση της νόσου πάντως, εμφανίζεται μετά την 20^η εβδομάδα με υπέρταση και λευκωματουρία. Περιπτώσεις με εμφάνιση συμπτωμάτων νωρίτερα της 20^{ης} εβδομάδας κύησης παραπέμπουν σε μύλη κύηση ή υδρωπικό πλακούντα [58,59]. Επίσης μπορεί να εκδηλωθεί προεκλαμψία και όψιμα, μετά τον τοκετό και πριν περάσουν τέσσερις εβδομάδες από αυτόν [59]. Ανάλογα με τη βαρύτητα της εμφάνισης της προεκλαμψίας, ο ιατρός καλείται να διαχειριστεί και τη σημαντική μητρική και περιγεννητική νοσηρότητά της. Παράγοντες επιβαρυντικοί για την εξέλιξη της εγκυμοσύνης είναι η εμφάνιση της προεκλαμψίας νωρίτερα της 33^{ης} εβδομάδας, η βαρύτητα της νόσου με υψηλή πίεση (>160 mmHg) και έντονη λευκωματουρία (>500 mg/24ώρο), η ποιότητα αντιμετώπισης και η ύπαρξη ή όχι παθολογικού ιστορικού [60]. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι σημαντικότερες επιπλοκές της προεκλαμψίας που αφορούν στη μητέρα και στο έμβρυο.

Επιπλοκές μητέρας	Επιπλοκές εμβρύου
Σύνδρομο HELLP / διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (10-20%)	Πρόωρος τοκετός (15-67%)
Πνευμονικό οίδημα (2-5%)	ΕΥΑ (10-25%)
Οξεία νεφρική ανεπάρκεια (1-5%)	Θάνατος (1-2%)
Αποκόλληση πλακούντα (1-4%)	Μακροπρόθεσμα καρδιαγγειακά προβλήματα
Εκλαμψία (<1%)	Νευρολογική συνδρομή λόγω υποξίας (<1%)
Ηπατική ανεπάρκεια ή αιμορραγία (<1%)	
Μακροπρόθεσμη καρδιαγγειακή νοσηρότητα	

Επίσης υπάρχουν παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της προεκλαμψίας και συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα [61]:

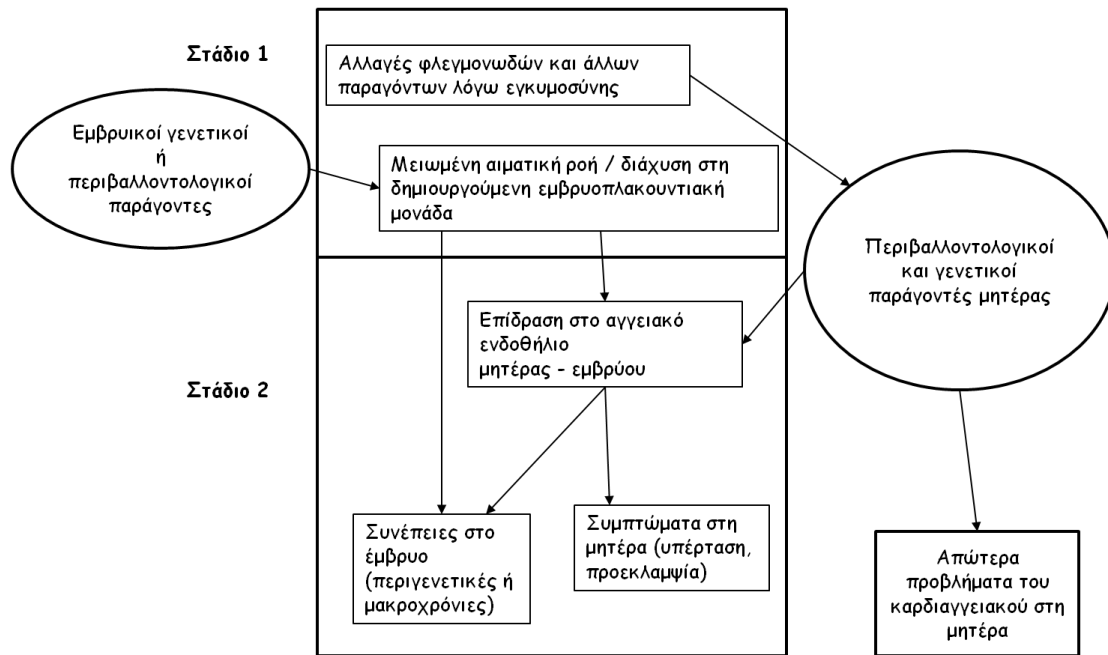
Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης προεκλαμψίας	
Περιορισμένη έκθεση στο σπέρμα του πατέρα - αλλαγή συντρόφου (νέος πατέρας)	Κύηση μετά από δωρεά σπέρματος, ωοκυττάρου ή εμβρύου
Συστηματικά νοσήματα κολλαγόνου	Ιστορικό θρομβοφιλίας
Πολύ μικρή ή πολύ μεγάλη ηλικία μητέρας	Λοιμώξεις της μητέρας
Πολύδυμη κύηση	Παχυσαρκία - ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη
Ιστορικό προεκλαμψίας	Χαμηλό βάρος γέννησης μητέρας
Χρόνια υπέρταση ή νεφρική νόσος	Ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη
Οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας	Υδρωπικός πλακούντας
Μαύρη φυλή	Υπερομοκυστεϊναιμία

Τα 2/3 των περιπτώσεων προεκλαμψίας εκδηλώνονται στην πρώτη κύηση, αφού σε επόμενη εγκυμοσύνη, η μητέρα έχει απευαισθητοποιηθεί απέναντι στο έμβρυο και συνεπώς στο γενετικό υλικό του πατέρα, και έτσι προφυλάσσεται ανοσολογικά για τις επόμενες κυήσεις όταν είναι από τον ίδιο σύντροφο [62].

Παρατηρώντας τους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης προεκλαμψίας, αντιλαμβάνεται κανείς ότι υπάρχει μία αλληλοεπικάλυψη με τους αντίστοιχους παράγοντες για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, γεγονός που επιβεβαιώνει την πεποίθηση ότι πρόκειται για νόσο που επιδρά στην παθοφυσιολογία του ενδοθηλίου των αγγείων. Μάλιστα γυναίκες που εμφανίζουν προεκλαμψία, ειδικά και σε δεύτερη κύηση, εμφανίζουν επίσης υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων στην μετέπειτα ζωή τους [60].

Αν και η ακριβής αιτιολογία της προεκλαμψίας δεν είναι ξεκάθαρη, το επικρατέστερο μοντέλο είναι αυτό των δύο σταδίων. Σύμφωνα με αυτό

υπάρχει μία αρχική αλλαγή που ενεργοποιείται από την αρχή της σύλληψης και που επηρεάζεται από γενετικά ή και περιβαλλοντολογικά αίτια (ηλικία και υγεία μητέρας, γενετικές ανωμαλίες ζυγωτού, λοιμώξεις κ.α.), η οποία οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την ομαλή εμφύτευση, διείσδυση και πλακουντοποίηση. Η παραπάνω αλλαγή, λόγω της πολυπαραγοντικής της εξάρτησης, μπορεί να μην καταφέρει να δημιουργήσει τις απαραίτητες συνθήκες για σωστή πλακουντοποίηση και να οδηγήσει στην ελλιπή δυνατότητα διάχυσης των απαραίτητων ουσιών ανταλλαγής μεταξύ μητρικής και εμβρυϊκής κυκλοφορίας. Έτσι περνάμε στο δεύτερο στάδιο, κατά το οποίο ο σχηματισμένος πλακούντας, αλλά ανεπαρκής πλακούντας, σε μία προσπάθεια αντιρρόπησης της μειωμένης αιματικής παροχής, εκκρίνει μία σειρά παραγόντων που επιδρούν στο ενδοθήλιο των αγγείων της μητέρας με σκοπό τη διάταση και την αύξηση της διαπερατότητάς τους. Ανάλογα τώρα με τα ιδιοσυγκρασιακά χαρακτηριστικά της κάθε γυναίκας, το επιπλέον στρες που δέχονται τα αγγεία της, σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να είναι ανεκτό χωρίς καθόλου ή με ήπια συμπτώματα, ενώ σε άλλες να δίνει σοβαρά συμπτώματα με εκδήλωση προεκλαμψίας. Επίσης, η αλλαγή που προσπαθεί να επιφέρει ο πλακούντας στα μητρικά αγγεία μπορεί να έχει επιτυχή κατάληξη όσον αφορά τη θρέψη του εμβρύου και το έμβρυο να αναπτύσσεται κανονικά. Μπορεί όμως από την άλλη πλευρά, να αποτύχει να αυξήσει στο επιθυμητό την αιματική ροή στην εμβρυοπλακουντιακή μονάδα και να οδηγήσει το έμβρυο σε υπολειπόμενη ανάπτυξη, εξέλιξη που συμβαίνει στο 1/3 των κυήσεων με προεκλαμψία [63].



Μοντέλο 2 σταδίων παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας σύμφωνα με τις νεότερες αντιλήψεις [Roberts JM. IFPA, Placenta Meeting, Graz 2008]

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΕΜΒΡΥΟΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ

Η εμβρυική ανάπτυξη μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τρία στάδια: την κυτταρική υπερπλασία (έως 16^η εβδομάδα κύησης), το συνδυασμό υπερπλασίας και υπερτροφίας (έως 3^ο τρίμηνο) και την κυτταρική υπερτροφία (έως τον τοκετό) [13].

Η γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο είναι η απαρχή μιας πολύπλοκης διαδικασίας κυτταρικών διαιρέσεων και αυξήσεων. Τα πρώτα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις ονομάζονται βλαστομερίδια. Περίπου την τρίτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση τα βλαστομερίδια έχουν σχηματίσει μια συμπαγή κυτταρική μάζα, το μορίδιο, η οποία εισέρχεται στη μητριά κοιλότητα. Τα κύτταρα του μοριδίου διατάσσονται σε δύο επιφάνειες, μία προς τα έξω σχηματίζοντας το τροφοεκτόδερμα και μία εσωτερικά την εμβρυοβλάστη. Μετά από τρεις ακόμα ημέρες γίνεται η εμφύτευση του μοριδίου στο ενδομήτριο, ενώ η εμβρυοβλάστη καταλαμβάνει τον πόλο του μοριδίου, που είναι προς το ενδομήτριο.

Σε αυτό το στάδιο η βλαστοκύστη υπολογίζεται ότι αποτελείται από 107-256 κύτταρα. Η εξωτερική στιβάδα των κυττάρων που περιβάλλει την βλαστοκύστη και είναι η πολυπληθέστερη ονομάζεται τροφοβλάστη και αποτελεί ουσιαστικά τον πρόδρομο των εμβρυικών μεμβρανών και του πλακούντα. Τα λιγότερα σε αριθμό κύτταρα του εσωτερικού της βλαστοκύστης, που αποτελούν την εμβρυοβλάστη, θα δώσουν γέννηση στο έμβryo, τον ομφάλιο λώρο και το άμνιο. Το μεσέγχυμα και τα αγγεία που προέρχονται από τα κύτταρα της εμβρυοβλάστης θα συμβάλλουν και αυτά στο σχηματισμό του πλακούντα.

Ο προσανατολισμός της βλαστοκύστης, όπως προαναφέρθηκε, γίνεται τις περισσότερες φορές με τρόπο τέτοιο, ώστε ο εμβρυικός πόλος, δηλαδή το

σημείο που εντοπίζεται η εμβρυοβλάστη, να είναι στη μεριά προσκόλλησης στο ενδομήτριο. Η συνήθης θέση εμφύτευσης της βλαστοκύστης είναι το ανώτερο τμήμα του οπισθίου τοιχώματος της μήτρας, κοντά στο μέσο-οβελιαίο επίπεδο.

Στο πρώτο στάδιο, η εξωτερική στιβάδα της τροφοβλάστης που βρίσκεται αντίστοιχα προς το σημείο εμφύτευσης, αρχίζει να διαφοροποιείται δίνοντας δύο ομάδες κυττάρων. Έτσι σχηματίζεται: i) η εξωτερική στιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης, η οποία χαρακτηρίζεται από κύτταρα με ασαφή κυτταροπλασματικά όρια (συγκυτιακά), πολλαπλούς πυκνοχρωματικούς πυρήνες και αμφίφιλο κυτταρόπλασμα [58] και ii) η εσωτερική στιβάδα της κυτταροτροφοβλάστης, η οποία δεν έρχεται σε επαφή με τα μητρικά στοιχεία και χαρακτηρίζεται από μεμονωμένα κύτταρα με σαφή κυτταροπλασματική μεμβράνη, διαυγές κυτταρόπλασμα και φυσαλιδώδεις πυρήνες και τα οποία ουσιαστικά αποτελούν το αρχέγονο, πρωταρχικό, ενεργό μιτωτικά κύτταρο, το οποίο πολλαπλασιάζεται συνεχώς και διαφοροποιείται προς συγκυτιοτροφοβλάστη [58]. Η εξωτερική στιβάδα, αυτή της συγκυτιοτροφοβλάστης, πολλαπλασιαζόμενη, διαβρώνει και διεισδύει με δακτυλιοειδείς συμπαγείς προσεκβολές το ενδομήτριο έως την 7^η-8^η ημέρα μετά την σύλληψη [64].

Η εμβρυοβλάστη δίνει και αυτή με τη σειρά της κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης της συγκυτιοτροφοβλάστης, δύο στιβάδες κυττάρων και έτσι την 8^η ημέρα μετά την σύλληψη η εμβρυοβλάστη αποτελείται από: μία εξωτερική στιβάδα κυττάρων, την επιβλάστη ή πρωτογενές εξώδερμα με προσανατολισμό προς το ενδομήτριο και που με τη σταδιακή άθροιση υγρού μεταξύ των κυττάρων της επιβλάστης και της κυτταροτροφοβλάστης σχηματίζεται η αμνιακή κοιλότητα και μία εσωτερική στιβάδα κυττάρων, την υποβλάστη ή πρωτογενές ενδόδερμα προς την ενδομητρική κοιλότητα που

καλύπτει την κοιλότητα της βλαστοκύστης [65]. Οι δύο στιβάδες, όπως διατάσσονται παράλληλα σχηματίζουν τον δίστιβο βλαστικό ή εμβρυικό δίσκο.

Από τις δύο στιβάδες του εμβρυικού δίσκου και υπό την πίεση του αθροιζόμενου υγρού που σχηματίζει την αμνιακή κοιλότητα και την κοιλότητα της βλαστοκύστης αντίστοιχα, αποκολλάται μία λεπτή στρώση κυττάρων. Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζει τον αμνιακό υμένα που περιβάλλει την αμνιακή κοιλότητα και στη δεύτερη σχηματίζει την εξωκοιλωματική μεμβράνη που περιβάλλει τον πρωτογενή και αργότερα δευτερογενή και οριστικό λεκιθικό ασκό. Σημαντικός ρόλος του λεκιθικού ασκού είναι η εξωμυελική αιμοποίηση μέχρι την 6^η εβδομάδα, ενώ προς το τέλος της κύησης έχει υποστρέψει σχεδόν εξολοκλήρου. Φτάνοντας λοιπόν στην 13^η μέρα ο εμβρυικός δίσκος βρίσκεται συνδεδεμένος μέσω παχύ συνδετικού μίσχου από κύτταρα του εξωεμβρυικού μεσεγχύματος με την κυτταροτροφοβλάστη προς τη μεριά του ενδομητρίου, ενώ ραχιαία έχει το άμνιο και κοιλιακά το λεκιθικό ασκό.

Περνώντας στο δεύτερο στάδιο, το "κρυπτικό ή δοκιδώδες", οι συμπαγείς ομάδες της συγκυτιοτροφοβλάστης, δημιουργούν κυστικούς χώρους καθόλη τη 2^η εβδομάδα της κύησης. Σε αυτή τη φάση ολόκληρη η βλαστοκύστη βρίσκεται πλήρως εμφυτευμένη στο ενδομήτριο και η συγκυτιοτροφοβλάστη σταδιακά την αγκαλιάζει γύρω από όλη την επιφάνειά της, σχηματίζοντας το πρωτογενές χοριονικό πέταλο. Το πρωτογενές χοριονικό πέταλο μαζί με κύτταρα τροφοβλάστης και μεσεγχυματικά κύτταρα αποτελεί το εξωεμβρυικό μεσέγχυμα ή μεσόδερμα. Αντίστοιχα προς τον βαθύτερο πόλο εμφύτευσης, όπου η συγκυτιοτροφοβλάστη είναι αφθονότερη και επενδύει με δοκίδες τους κρυπτικούς χώρους που δημιουργούνται, θα σχηματιστεί ο πλακουντιακός δίσκος, ενώ η λεπτότερη στιβάδα των κυττάρων της στον αντιδιαμετρικό πόλο, θα μετατραπεί αργότερα στο λείο χόριο. Το

τμήμα της συγκυτιοτροφοβλάστης που έρχεται σε άμεση επαφή με το ενδομήτριο αποτελεί το τροφοβλαστικό κέλυφος, το οποίο ουσιαστικά βρίσκεται στην περιφέρεια των δοκίδων της συγκυτιοτροφοβλάστης.

Τις πρώτες μέρες εμφύτευσης της βλαστοκύστης, η συγκυτιοτροφοβλάστη διαβρώνει τους μητρικούς ιστούς. Οι πρωτογενείς λάχνες που σχηματίζονται είναι εκβλαστήσεις της συγκυτιοτροφοβλάστης που προβάλλουν εντός των κρυπτών. Από τη 12^η ημέρα όμως εμφανίζονται και κυτταροτροφοβλαστικά στοιχεία από το πρωτογενές χοριονικό πέταλο στις δοκίδες, σχηματίζοντας τις δευτερογενείς λάχνες. Η παρουσία του πολυδύναμου κυττάρου της κυτταροτροφοβλάστης κατά μήκος του τροφοβλαστικού κελύφους, πυροδοτεί πλέον μέσω έκφρασης διαφόρων παραγόντων τη διήθηση των μητρικών ιστών από τους υποπληθυσμούς της τροφοβλάστης και την πλήρη φθαρτοποίηση του στρώματος του ενδομητρίου, με αποτέλεσμα την καταστροφή των τριχοειδών του ενδομητρίου και την πρώτη εμφάνιση και κυκλοφορία ερυθρών αιμοσφαιρίων της μητέρας στο δίκτυο των κρυπτών. Μεταξύ 18^{ης} και 20^{ης} ημέρας παρατηρούνται τα πρώτα τριχοειδή στο μεσεγγυματογενές στρώμα των λαχνών και μέσα στους αυλούς τους τα πρώτα κύτταρα εμβρυικής αιμοποίησης, τα εμπύρνηνα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η παρουσία των τριχοειδών σηματοδοτεί τον σχηματισμό των τριτογενών λαχνών. Την ίδια χρονική περίοδο, νεοσχηματισμένα εμβρυικά αγγεία από την αλλαντοΐδα εκτείνονται στο χοριονικό πέταλο του πλακούντα και στο στρώμα των μεγαλύτερων σε διάμετρο λαχνών και έρχονται σε επαφή με τα τριχοειδή των λαχνών, θέτοντας έτσι τα θεμέλια της εμβρυοπλακούντιας κυκλοφορίας. Η τελευταία εδραιώνεται ολοκληρωμένα την 5^η εβδομάδα, με χαρακτηριστικό εύρημα την παρουσία άφθονων εμπύρνηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων στους αυλούς των τριχοειδών αγγείων των λαχνών.

Η παραπάνω διεργασία σχηματίζει μία διαχωριστική μεμβράνη μεταξύ μητέρας και εμβρύου, τον πλακουντιακό φραγμό. Έτσι το αίμα της μητέρας έρχεται πρώτα σε επαφή με τη στιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης, η οποία περιβάλλει τις λάχνες και έπειτα με την αμέσως υποκείμενη στιβάδα των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης, η οποία είναι συνεχής κατά την διάρκεια του 1^{ου} τριμήνου, ενώ στο 2^ο και 3^ο τρίμηνο είναι ασυνεχής και δυσδιάκριτη. Αμέσως μετά συναντά τη βασική μεμβράνη της τροφοβλάστης και το συνδετικό ιστό του στρώματος των λαχνών, ενώ τέλος έχει να διαπεράσει και το ενδοθήλιο των εμβρυικών τριχοειδών, το οποίο στο τρίτο τρίμηνο αποτελείται μόνο από την βασική μεμβράνη. Το συνολικό πάχος του φραγμού μεταξύ μητρικής και εμβρυικής κυκλοφορίας ελαττώνεται κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, επιτρέποντας ευκολότερη επικοινωνία μεταξύ των δύο κυκλοφοριών καθώς αυξάνονται οι διατροφικές ανάγκες του εμβρύου, καταλήγοντας στην συγχώνευση των βασικών στιβάδων της τροφοβλάστης και των εμβρυικών τριχοειδών και τον σχηματισμό της αγγειοσυγκυτιακής μεμβράνης [66].

Έτσι γίνονται τα πρώτα βήματα στην ανάπτυξη της μητροπλακούντιας κυκλοφορίας, η οποία εδραιώνεται πλήρως μετά την 12^η εβδομάδα κύησης, όταν η ροή και η ποσότητα του αίματος της μητέρας που παρέχεται στον πλακούντα από τους μεγαλύτερους κλάδους των σπειροειδών αρτηριών έχει φτάσει τα απαραίτητα επίπεδα.

ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ

Ο ώριμος τελειόμηνος πλακούντας του ανθρώπου είναι ένα δισκοειδούς σχήματος όργανο, στρογγυλός ή υποστρογγυλός και σπάνια σε ανώμαλα σχήματα, όπως δίλοβος πλακούντας, περικεχαρακωμένος, ζωνοειδής κ.α [67]. Η μέση μέγιστη διάμετρος του δίσκου του τελειόμηνου πλακούντα είναι 22 εκατοστά, το μέγιστο πάχος στο κέντρο του δίσκου 2,5 εκατοστά και το μέσο βάρος 470 γραμμάρια, μεγέθη με σημαντικού βαθμού διακυμάνσεις καθώς εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Η διαδικασία και το είδος του τοκετού, η απολίνωση του ομφάλιου λώρου και το διάστημα που μεσολαβεί από την στιγμή της υστεροτοκίας έως την μέτρηση προκαλούν σημαντικές αλλοιώσεις των ανωτέρω μεγεθών [68,69]. Παρόλα αυτά και με βάση μελέτες, το βάρος του πλακούντα στις 20 εβδομάδες κύησης δεν πρέπει να ξεπερνά τα 150 γραμμάρια, στις 30 εβδομάδες τα 375 γραμμάρια και στις 40 εβδομάδες τα 600 γραμμάρια [70].

Εξωτερικά ο πλακούντας εμφανίζει δύο επιφάνειες, την έσω ή εμβρυϊκή επιφάνεια, την έξω ή μητριαία επιφάνεια και μία περιφέρεια [71].

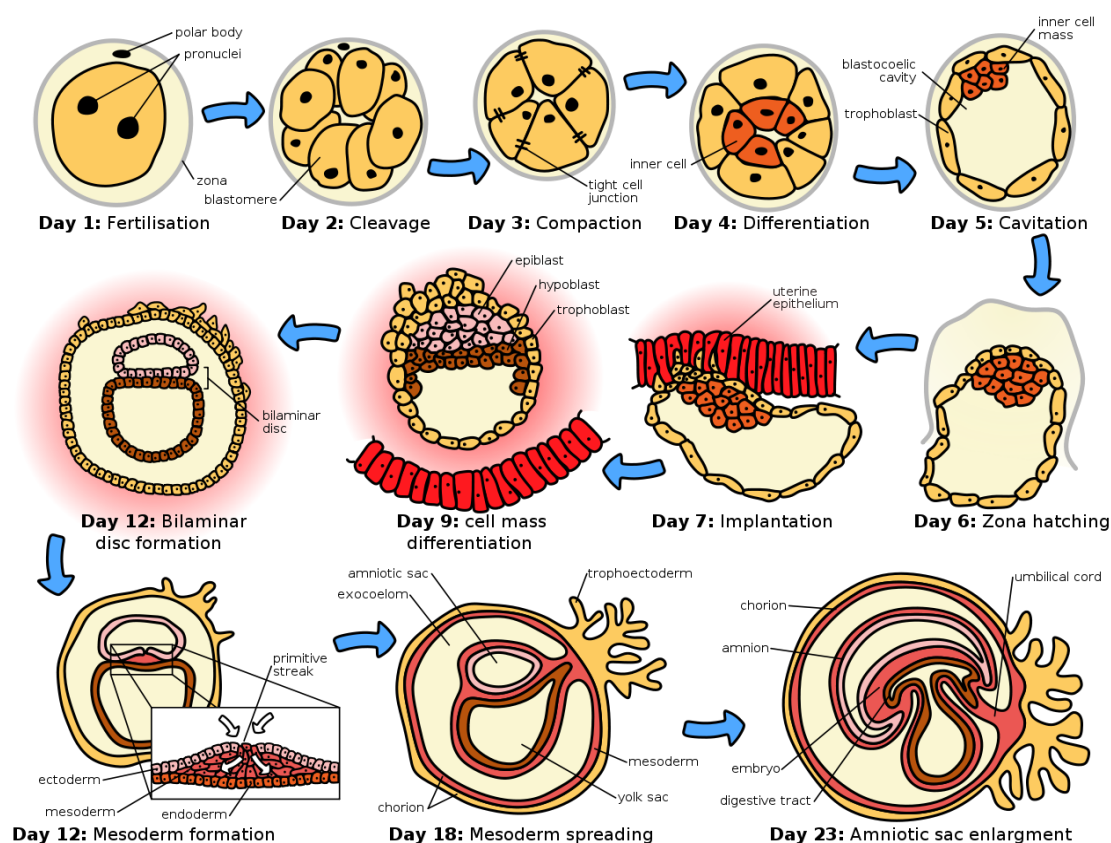
Η εμβρυϊκή (αμνιονική ή χοριονική) επιφάνεια του πλακούντα, αντικρίζει την αμνιακή κοιλότητα επαλειφόμενη από το άμνιο, είναι επίπεδη, λεία και στιλπνή, ενώ εμφανίζει σε έκκεντρη συνήθως θέση την πρόσφυση του ομφάλιου λώρου [68]. Τα εμβρυϊκά αγγεία διακλαδίζονται ακτινοειδώς από το σημείο πρόσφυσης του λώρου, και εξαπλώνονται σε όλη την εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα. Κατά μήκος της περιμέτρου του δακτυλίου η περιφέρεια του πλακούντα λεπτύνεται και συνάπτεται με τους υπόλοιπους υμένες του εμβρύου, που αποτελούνται από το άμνιο και το χόριο, στους οποίους προσκολλάται προοδευτικά και ο θυλακοειδής ή ανεστραμμένος φθαρτός και ο γνήσιος ή τοιχωματικός. Από την χοριονική επιφάνεια όπως αναφέρθηκε εκφύεται ο ομφάλιος λώρος.

Ο ομφάλιος λώρος του τελειόμηνου πλακούντα, έχει κατά μέσο όρο διάμετρο 1-2 εκατοστά και μήκος 55 έως 60 εκατοστά και χαρακτηρίζεται από 2,1 περιελίξεις ανά 10 εκατοστά, με φορά αντίθετη αυτής των δεικτών του ρολογιού [72]. Στον ομφάλιο λώρο παρατηρούνται τόσο στον τελειόμηνου πλακούντα αλλά και κατά την μεγαλύτερη διάρκεια της κύησης, δύο αρτηρίες και μία φλέβα. Αρχικά υπάρχει και δεύτερη φλέβα, η οποία όμως υποστρέφει κατά την διάρκεια του δεύτερου μήνα της κύησης. Έως 1% παρατηρείται μονή ομφαλική αρτηρία [73], χαρακτηριστικό που συχνά συνδυάζεται σε ποσοστό έως 30%, με μείζονες συγγενείς ανωμαλίες, όπως δυσπλασία ή αγενεσία των νεφρών, τραχειο-οισοφαγικά συρίγγια, παθήσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, αλλά και μητρικό διαβήτη, καθυστέρηση της ανάπτυξης, και αυξημένη περιγεννητική θνησιμότητα.

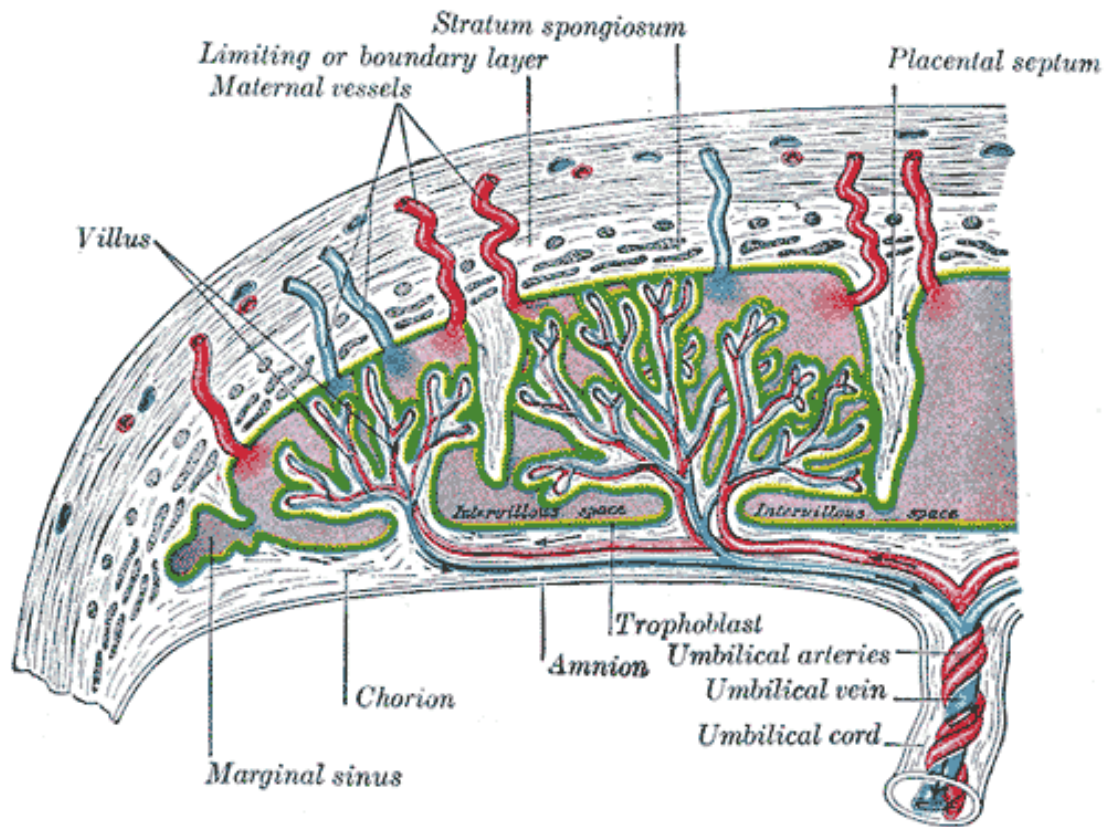
Η έξω επιφάνεια του πλακούντα (βασικό πέταλο ή μητριάια επιφάνεια) συνάπτεται με το τοίχωμα της μήτρας. Ουσιαστικά φανερώνεται μόνο κατά το διαχωρισμό του πλακούντα από το σώμα της μήτρας [68]. Η όψη του είναι σπογγώδης, αιμόφυρτη και η χροιά βαθυέρυθρη με κιτρινόφαιες εστιακά εναποθέσεις που αντιστοιχούν σε ινική, λόγω της διαδικασίας αποκόλλησης. Χωρίζεται με διασταυρούμενες αύλακες σε 10-40 πολύγωνες και υπόκυρτες περιοχές, που λέγονται κοτυληδόνες (λοβοί ή λοβίδια) και αντιστοιχούν σε καταδύσεις του βασικού πετάλου προς τον μεσολάχνιο χώρο, όπου και σχηματίζουν τα διαφράγματα του πλακούντα. Από το κέντρο κάθε κοτυληδόνας αναδύονται οι μητροπλακούντιες φλέβες, ενώ στις αύλακες εισδύουν οι μητροπλακούντιες αρτηρίες.

Όλος ο χώρος ανάμεσα στις δύο επιφάνειες (χοριονικό και βασικό πέταλο) καταλαμβάνεται από το λαχνωτό χόριο, το εμβρυικό στοιχείο του πλακούντα [74], το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα, που κυκλοφορεί στον μεσολάχνιο χώρο. Οι λάχνες διαφοροποιούνται ανάλογα με

την ηλικία κύησης και διακρίνονται στις μεσεγγυματογενείς, τις στελεχιαίες, τις ενδιάμεσες ανώριμες και ώριμες και στις τελικές. Ο ώριμος πλακούντας διαθέτει 40-60 περίπου λαχνωτά δέντρα ή εμβρυικές κοτυληδόνες, τα οποία μαζί με τις αντίστοιχες μοίρες του μεσολάχνιου χώρου είναι γνωστά ως πλακούντια. Ένα έως τρία λαχνωτά δέντρα αντιστοιχούν σε κάθε μία κοτυληδόνα της μητριάας επιφάνειας [68]. Τα πλακούντια αποτελούν τις εμβρυομητρικές μονάδες κυκλοφορίας, αφού σε αυτά εκβάλλουν τα στόμια των συνολικά 100-150 σπειροειδών μητριάων αρτηριών που αιματώνουν τη θέση εμφύτευσης.



Σχηματική απεικόνιση της εμφύτευσης (πηγή Wikipedia)



Εικόνα σε διατομή των βασικών δομών του πλακούντα (πηγή Wikipedia)

Hypoxia Inducible Factors (HIF) – Prolyl Hydroxylation Domains (PHD) - Von Hippel Lindau (VHL) - Αννεξίνη A5 (ANXA5)

Οι Hypoxia Inducible Factors (HIF) είναι μεταγραφικοί παράγοντες, που ανακαλύφθηκαν σε κύτταρα θηλαστικών κάτω από υποξικές συνθήκες και φαίνεται να έχουν βασικό ρόλο στην κυτταρική και συστηματική απάντηση στην υποξία, μέσω ρυθμίσεως του μεταβολισμού, του κυτταρικού κύκλου, της αγγειογένεσης και της απόπτωσης. Οι HIF είναι διμερή αποτελούμενα από τον HIF-α (1,2 ή 3) και τον HIF-β ή ARNT (aryl-hydrocarbon-receptor-nuclear-translocator). Η υπομονάδα HIF-α ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, από όπου αφού σταθεροποιηθεί, μεταφέρεται στον πυρήνα για να ενωθεί με την άλλη υπομονάδα ARNT, η οποία εκφράζεται και εντοπίζεται σταθερά στον πυρήνα, ώστε το σχηματιζόμενο διμερές να μπορέσει να επιτύχει το μεταγραφικό του ρόλο. Έχει βρεθεί ότι η μεταγραφική δράση του HIF-1 γίνεται μέσω μιας bHLH (basic helix-loop-helix)-PAS περιοχής στο αμινοτελικό του άκρο [75]. Για τη δράση αυτή χρειάζεται η στρατολόγηση των συν-ενεργοποιητών p300/CBP (CREB binding protein). Ενώ οι HIF-1 και HIF-2 έχουν παρόμοια δομή και δράση, φαίνεται ότι ο HIF-3 παρουσιάζει ανασταλτική δράση στην υποξία, κάτι που δεν είναι όμως ακόμα επιβεβαιωμένο [75].

Η υπομονάδα HIF-α όταν οι συνθήκες πίεσης οξυγόνου είναι φυσιολογικές, υδροξυλιώνεται σε δύο θέσεις προλίνης (Pro402 και Pro564) από τους Prolyl Hydroxylation Domains (PHD-1, 2 και 3) [76], γεγονός που επιτρέπει την σύνδεση με τον von Hippel-Lindau (VHL) [77], σχηματίζοντας έτσι ένα διμερές, το οποίο έπειτα αποδομείται από πρωτεασώματα [78]. Φαίνεται ότι ο VHL υποεκφράζεται σε υποξία, επομένως επιτρέπει τη σταθεροποίηση του HIF-α, ο οποίος παράλληλα υπερεκφράζεται. Επίσης, οι παράγοντες PHD χρειάζονται ως συν-ενεργοποιητή το O_2 με μια K_m (σταθερά

χημικής ενζυμικής ισορροπίας) λίγο πάνω από τη συγκέντρωση O_2 της ατμόσφαιρας, έτσι ώστε η ενζυμική δραστηριότητα να ελέγχεται από μεταβολές στη συγκέντρωση O_2 κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Η ρύθμιση αυτή φαίνεται να είναι κοινή και για τους τρεις παράγοντες HIF-a.

Ο τρόπος ρύθμισης του HIF-1, αντιπροσωπεύει τον καλύτερα καθορισμένο μοριακό μηχανισμό απάντησης σε αλλαγές της συγκέντρωσης O_2 , στα μετόζωα [75]. Ενώ ο HIF-1b εκφράζεται συνεχώς, η συγκέντρωσή του HIF-1a αυξάνεται εκθετικά καθώς η συγκέντρωση O_2 μειώνεται [79]. Προκειμένου να ανταποκριθούν άμεσα στην υποξία, τα κύτταρα συνθέτουν συνεχώς, δεσμεύουν και αποδομούν τον HIF-1a σε νορμοξικές συνθήκες [80-82]. Κάτω από υποξικές συνθήκες όμως, αναστέλλεται η αποδόμηση του HIF-1a, με συνέπεια σταθεροποίησή του, σχηματισμό του διμερούς με τον HIF-1b στον πυρήνα και δέσμευση σε HREs (hypoxia response elements) περιοχές μέσα σε γονίδια στόχους (όπως το γονίδιο EPO) [83,84]. Παράλληλα ευοδώνεται η ενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας με παράλληλη στρατολόγηση και των συνενεργοποιητών p300/CBP.

Ο HIF-2a ονομάστηκε endothelial PAS protein-1 (EPAS1) λόγω της έκφρασής του στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά [85]. Αν και μία μελέτη παρουσίασε πρόκληση ατελούς αγγειακής αναδιαμόρφωσης, με ανώμαλα τριχοειδή αγγεία και συνέπεια την τοπική αιμορραγία [86], διαφορετικοί φαινότυποι έχουν παρατηρηθεί σε δύο άλλες μελέτες. Στην πρώτη παρουσιάστηκε ανεπάρκεια στην εμβρυϊκή παραγωγή κατεχολαμίνης [87], ενώ στη δεύτερη παρουσιάστηκε ανεπαρκής ωρίμανση του πνεύμονα σχετιζόμενη με ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε HIF-2a^{-/-} (knock out) πειραματόζωα [88]. Αυτές οι διαφορές στο φαινότυπο μπορεί να προκύπτουν από διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο. Συνολικά, τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι παρά την παρόμοια δραστηριότητα

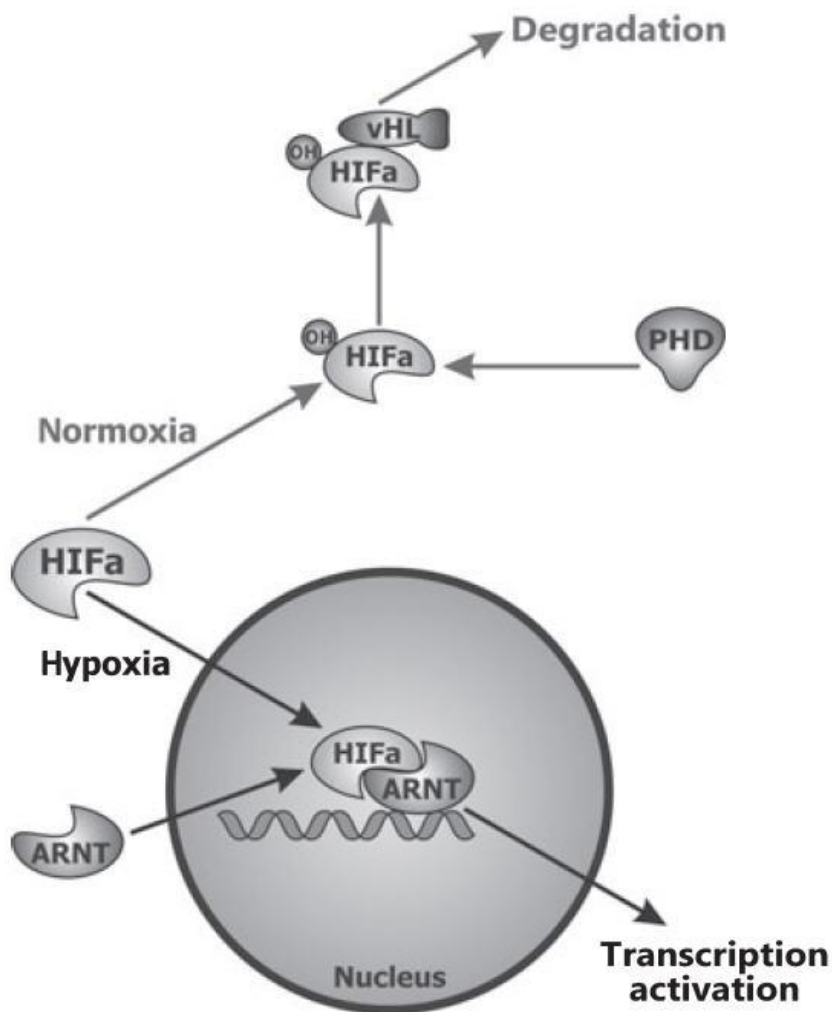
στα HRE-σχετιζόμενα γονίδια αναφοράς, οι HIF-1a και HIF-2a έχουν σημαντικές μη-αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης.

Σε αντίθεση με το ρόλο των HIF-1a και HIF-2a, ο HIF-3a φαίνεται να σχετίζεται με αντι-αγγειογενετική λειτουργία [89]. Αντίθετα οι παράγοντες PHD-1, 2 και 3 φαίνεται να κατέχουν ένα παρόμοιο ρόλο στην αποδόμηση των α υπομονάδων των HIF. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει συνοπτικά τους παράγοντες που ρυθμίζονται από τον HIF-1 σε διάφορα στάδια της αγγειογένεσης.

Παράγοντες που ρυθμίζονται μεταγραφικά από τον HIF-1 και διαδραματίζουν ρόλο σε διάφορα στάδια της αγγειογένεσης

Στάδιο αγγειογένεσης	Παράγοντες
Αρτηριακή αποσταθεροποίηση	VEGF, PLGF, Flt-1
Αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα	VEGF, Flt-1, angiopoietin-2, Tie-2
Αναδιαμόρφωση εξωκυττάριου χώρου	MMPs, prolyl-4-hydroxylase, uPAR
Μετανάστευση και πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων	VEGF, PLGF, angiopoietin-1, MCP-1, PDGF, SDF-1, CXCR4
Δημιουργία ενδοθηλιακών κυττάρων	Angiopoietin-2, Tie-2
Δημιουργία αγγείων και κυτταρικών επαφών	VEGF, PLGF, angiopoietin-1, integrins
Στρατολόγηση/αλληλεπίδραση μεσεγχύματος	PDGF, PAI-1, angiopoietin-1, Tie-2
Διατήρηση ακεραιότητας των αγγείων	VEGF, angiopoietin-1

VEGF: vascular endothelial growth factor *PLGF: placental growth factor*
Flt-1: fms-like tyrosine kinase *MMP: matrix metalloproteinase*
uPA: urokinase plasminogen activator *MCP-1: monocyte chemoattractant protein1*
SDF-1: stromal cell-derived factor-1 *PAI: plasminogen activator inhibitor*



Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού του HIF υπό υποξικές και νορμοξικές συνθήκες. Σε φυσιολογική P_{O_2} (γκρι βέλη) ο PHD υδροξυλιώνει τον HIF-α, που με τη σειρά του δεσμεύεται από τον VHL, οδηγούμενος σε πρωτεασωματική αποδόμηση. Σε χαμηλή P_{O_2} (μαύρα βέλη) ο HIF-α σταθεροποιείται και εισέρχεται στον πυρήνα, όπου σχηματίζει διμερές με τον ARNT και ο ενεργός πια HIF δεσμεύεται στο DNA, εκτελώντας την μεταγραφική ενεργοποίηση των παραγόντων στόχων του.

Η αννεξίνη A5 (ANXA5) είναι μία κυτταρική πρωτεΐνη της οικογένειας των αννεξινών, με αντιθρομβωτικές ιδιότητες που αν και η ακριβή της δράση παραμένει αδιευκρίνιστη. Με βάση πειράματα σε επίμυες είναι απαραίτητη για την ακεραιότητα του πλακούντα [90], αν και επίμυες με ANXA5-/- κατάφεραν να κυοφορήσουν φυσιολογικού βάρους έμβρυα [91]. Η ANXA5 είναι μία πρωτεΐνη συνδεδεμένη σε φωσφολιπίδια που συντίθεται από τα αιμοπετάλια και τα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα. Τα τροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζουν την αννεξίνη στο κορυφαίο τμήμα των χοριακών λαχνών, ώστε να έρχεται σε επαφή με το μητρικό αίμα των μεσολάχιων διαστημάτων [92], βοηθώντας έτσι τη διατήρηση της ρευστότητας και της κυκλοφορίας, που είναι κρίσιμη για την εμβρυική βιωσιμότητα [93].

Η ANXA5 έχει υψηλή συγγένεια, ειδικά παρουσία ιόντων ασβεστίου με τα φωσφολιπίδια, όπως είναι η φωσφατιδυλοσερίνη [94], που εκφράζεται στην τροφοβλαστική μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια αντιθρομβωτική ασπίδα στην τροφοβλαστική επιφάνεια, εμποδίζοντας θρομβωτικές αντιδράσεις της προθρομβίνης με τα φωσφολιπίδια [95]. Επίσης φαίνεται ότι αναστέλλει και τη δράση της φωσφολιπάσης A1.

Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με την ANXA5 αφορούν στη σχέση της με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (aPLS) και έχουν καταδείξει την ελάττωση που τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα προκαλούν στη συγκέντρωση της ANXA5 στην τροφοβλαστική επιφάνεια [96,97]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη έκθεση σε κινδύνους θρόμβωσης που μπορεί να οδηγήσουν σε πλακουντιακή παθολογία [98]. Αν και ο ρόλος της ANXA5 έχει μελετηθεί σε αποβολές και αποτυχίες σε εμφυτεύσεις εμβρύων [95,99], δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες σε τελειόμηνους πλακούντες από εγκυμοσύνες με επιπλοκές, όπως η προεκλαμψία και η υπολειπόμενη ανάπτυξη [100,101].

ΟΔΗΓΕΣ ΣΚΕΨΕΙΣ - ΥΠΟΘΕΣΗ - ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

Είναι γνωστό ότι μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες κατά την εξέλιξη μιας κύησης είναι η φυσιολογική δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας, που ξεκινάει με τη διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στο ενδομήτριο και ολοκληρώνεται με τη δημιουργία των χοριακών λαχνών [102,103]. Στο αρχικό περιβάλλον της κυτταροτροφοβλάστης η κατάσταση μπορεί να χαρακτηριστεί υποξική, ενώ στη συνέχεια όταν ολοκληρωθεί η συνένωση με τα μητριαία σπειροειδή αγγεία, γίνεται μια μετάβαση σε κατάσταση φυσιολογικής οξυγόνωσης. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, απαιτείται η δομική αλλαγή τόσο του ενδομητρίου που υποδέχεται την κυτταροτροφοβλάστη, όσο και αλλαγές του ενδοθηλίου των μητριαίων σπειροειδών αρτηριών, ώστε να δημιουργηθούν οι χοριακές λάχνες. Έτσι το τοίχωμα των αγγείων που βρίσκεται προς την πλευρά του εμβρύου αντικαθίσταται από τροφοβλάστη. Η κυτταροτροφοβλάστη σε αυτή τη διαδικασία μεταπίπτει από ένα εκφραστικό μοντέλο μορίων επιθηλιακής εξειδίκευσης σε ένα μοντέλο μορίων προσκόλλησης που είναι πιο κοντά σε αυτό των ενδοθηλιακών κυττάρων [104]. Πολλά από αυτά τα μόρια ρυθμίζονται εκφραστικά από τους Hypoxia Inducible Factors (HIF). Είναι αξιοσημείωτο ότι η κυτταροτροφοβλάστη ενώ σε υποξικό περιβάλλον κυρίως πολλαπλασιάζεται, σε νορμοξικό αρχίζει να διαφοροποιείται. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι η συμπεριφορά της κυτταροτροφοβλάστης εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου.

Σε αρχική φάση, όπου η P_{O_2} είναι μειωμένη, παρατηρείται (όπως προκύπτει από μελέτες σε πειραματόζωα) μία αύξηση της δράσης ρυθμιστικών μορίων, τα σημαντικότερα εκ των οποίων είναι οι HIF-1, HIF-2 και HIF-3. Ο παράγοντας HIF-1 αποτελεί μία από τις βασικές απαντήσεις του κυττάρου σε καταστάσεις υποξίας. Αποτελείται, όπως έχει αναφερθεί

προηγουμένως, από δύο υπομονάδες, τον HIF-1a και τον HIF-1b (ARNT). Ο HIF-1a σε υποξικές συνθήκες σταθεροποιείται στο κυτταρόπλασμα και έπειτα σχηματίζει ένα διμερές με τον HIF-1b στον πυρήνα και ο HIF-1 που προκύπτει επάγει την έκφραση πολλών πρωτεϊνών που διαδραματίζουν ρόλο στην αγγειογένεση, τον κυτταρικό κύκλο και το μεταβολισμό [105]. Παρόμοια λειτουργία φαίνεται να διαδραματίζει και ο HIF-2, ενώ για τον HIF-3 τα δεδομένα είναι ελλιπή. Οι παράγοντες αυτοί, ρυθμίζονται ανάλογα με τη μερική τάση του οξυγόνου, γεγονός που τους συνδέει άμεσα με καταστάσεις που συσχετίζονται με συνθήκες υποξυγοναιμίας στην εμβρυοπλακουντιακή κυκλοφορία όπως η προεκλαμψία ή η καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης [106,107].

Ο τρόπος ρύθμισης των HIF φαίνεται να μη σχετίζεται μόνο με την επαγωγή/αναστολή της έκφρασής τους, αλλά και με την αποδόμησή τους. Έτσι, σε φυσιολογικές συνθήκες και σε συνεχή ρυθμό, οι α υπομονάδες των HIF αποδομούνται με τη συμμετοχή ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τους παράγοντες PHD-1, 2 και 3 (prolyl hydroxylation domain) και VHL, οι οποίοι υδροξυλιώνουν και αποδομούν τις υδροξυλιομένες μορφές HIFα, ώστε να μη σταθεροποιηθεί η πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα. Σε δεύτερη φάση μία ακόμα υδροξυλίωση μπορεί να συμβάλλει στην αναστολή των HIF, η οποία γίνεται στη θέση asn803 της πρωτεΐνης [108] και αναστέλλει την αλληλεπίδραση με τον συνενεργοποιητή p300/CBP, που είναι απαραίτητη για την επαγωγή της μετάφρασης. Είναι εμφανές ότι η ρύθμιση της έκφρασης, αλλά και της λειτουργίας των HIF γίνεται μέσα από ένα σύνολο παραγόντων, όπως η PO₂, ο VHL και οι PHD-1, 2 και 3. Επομένως, μία μέτρηση μόνο της έκφρασης των HIF σε καταστάσεις μειωμένης παροχής οξυγόνου, μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα, αφού η ρύθμισή τους είναι και μετά-μεταφραστική, οπότε εισέρχεται η δράση των PHD και VHL.

Αργότερα στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, όταν έχει πλέον αποπερατωθεί η διείσδυση της τροφοβλάστης και η εμβρυοπλακουντιακή μονάδα παρέχει ικανοποιητικές ποσότητες O_2 , οι παράγοντες HIF υποεκφράζονται ή αποδομούνται σε τέτοιο βαθμό, ώστε να υπολειπθούν. Σε παθολογικές καταστάσεις, όμως, υπάρχει πιθανότητα να διαταράσσεται αυτό το μοντέλο και η μειωμένη οξυγόνωση να διατηρεί τη ρυθμιστική δράση αυτών των παραγόντων σε υψηλά επίπεδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα έναν καταρράκτη γεγονότων, αν συνυπολογίσει κανείς τον αριθμό και το ρόλο των γονιδίων στόχων των HIF. Έτσι υπάρχει μία αλλαγή στην έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με διαδικασίες, όπως η αγγειογένεση (VEGF, PLGF, PDGF, EPO, NOS2, FLT1 κ.α.), ο μεταβολισμός (αλδολάση, εξωκινάση, πυρουβική κινάση, γαλακτική δεϋδρογονάση κ.α.) και ο κυτταρικός κύκλος (IGF, p21, p35srj κ.α.). Μια τέτοια αλλαγή μπορεί να αποφέρει την εκδήλωση της εμβρυικής ΕΥΑ ή τα κλινικά σημεία της προεκλαμψίας ή αμφοτέρων αυτών των συχνά σχετιζόμενων παθολογικών καταστάσεων.

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της καθυστέρησης της ενδομήτριας εμβρυικής ανάπτυξης και της προεκλαμψίας παραμένει λιγότερο ή περισσότερο άγνωστος και συνεπώς οι διαγνωστικές και θεραπευτικές δυνατότητες είναι περιορισμένες. Η κατανόηση του ρόλου και της επίδρασης της υποξίας στο δεύτερο ήμισυ της κύησης μέσα από τα μονοπάτια του HIF - παράγοντα που έχει μείζονα ρόλο σε συνθήκες υποξίας - πιθανά να βοηθήσει στην βελτίωση της γνώσης μας για τον τρόπο λειτουργίας της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας σε συνθήκες stress. Η συσχέτιση δε των μεταβολών της έκφρασης του HIF με ορισμένους από τους παράγοντες των οποίων ελέγχει και ρυθμίζει τη δράση θα συμβάλλει ειδικότερα στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μονοπατιού του HIF στον πλακούντα των κύσεων εκείνων που επιπλέκονται με ΕΥΑ ή/και προεκλαμψία. Μάλιστα

τα τελευταία χρόνια φαρμακευτικές παρεμβάσεις, κυρίως στο χώρο της πειραματικής ογκολογίας [109-112], έχουν προταθεί μέσα από *in vitro* μοντέλα, που αλλάζουν την έκφραση των αγγειογενετικών και ρυθμιστικών αυτών παραγόντων, γεγονός που οδηγεί στην ανάγκη κατανόησης του ακριβή ρόλου τους, ώστε τέτοιες θεραπευτικές παρεμβάσεις να μπορούν να αποκτήσουν κλινική εφαρμογή στο εγγύς μέλλον και σε άλλους τομείς, όπως αυτός της μαιευτικής.

Πέρα όμως από τις θεραπευτικές εφαρμογές, η συνδυασμένη μελέτη του πλακούντα με συμβατική ιστοπαθολογική εξέταση, ανοσοϊστοχημεία και μοριακές τεχνικές σχετικά με την παθολογική έκφραση των διαφόρων παραγόντων που φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο στην υποξία και κακή οξυγόνωση του εμβρύου, μπορεί να αποτελέσει ένα αδιαμφισβήτητο κριτήριο ακριβούς διάγνωσης. Είναι γνωστό ότι η ΕΥΑ αποτελεί μια νοσολογική οντότητα πολυπαραγοντικής αιτιολογίας και συχνά δεν αναγνωρίζεται η υποκείμενη αιτιοπαθογένεια ή είναι δυσχερής η διαφοροδιαγνωστική προσπέλαση. Πέρα όμως από τη διαγνωστική και διαφοροδιαγνωστική αξία, υπάρχει και ο χώρος της γενετικής συμβουλευτικής σε γυναίκες που εκδήλωσαν προεκλαμψία και ΕΥΑ.

Με γνώμονα τις παραπάνω διαπιστώσεις προκύπτουν μία σειρά ερωτημάτων που οδήγησαν στην εκπόνηση όλης αυτής της προσπάθειας και που κάποια απαντήθηκαν και για άλλα τέθηκαν οι βάσεις για να απαντηθούν.

Κάποια από αυτά τα ερωτήματα στην αρχική σχεδίαση του ερευνητικού πρωτοκόλλου διατυπώνονταν επιγραμματικά ως εξής:

1. Υπάρχει συσχέτιση της πλακουντιακής έκφρασης των HIF-α με την ΕΥΑ του εμβρύου ή την προεκλαμψία?

2. Υπάρχει διαφορετικό προφίλ έκφρασης στην ΕΥΑ που σχετίζεται με προεκλαμψία συγκριτικά με την ΕΥΑ ιδιοπαθούς ή άγνωστης αιτιολογίας?

3. Μπορούμε να συνδέσουμε την υποκλινική προεκλαμψία με την ΕΥΑ και να αναγνωρίσουμε κοινούς υποκείμενους μηχανισμούς?

4. Ποια η έκφραση και δράση των PHD σε φυσιολογικές και σε παθολογικές κυήσεις?

5. Ακολουθούν παρόμοιο μοτίβο έκφρασης στις παθολογικές καταστάσεις?

6. Ποιες είναι οι βασικές διαφορές στην πλακουντιακή έκφραση και λειτουργία των HIF και των αποδομητών τους στις φυσιολογικές και παθολογικές κυήσεις?

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1 ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Συλλογή Δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από την Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου. Πλακούντες συλλέχθηκαν από 85 κήσεις που εμφάνισαν ασύμμετρη εμβρυϊκή ΕΥΑ (σε έδαφος προεκλαμψίας ή ανεξάρτητα από αυτήν) και από 58 κήσεις με ομαλή πορεία (απουσία στοιχείων προεκλαμψίας & γέννηση υγιών ικανοποιητικού βάρους για την ηλικία κύησης νεογνών). Σε όλες τις περιπτώσεις, παθολογικές και φυσιολογικές, πραγματοποιήθηκε συμβατική και ανοσοϊστοχημική ιστολογική εξέταση του πλακούντα, από εξειδικευμένο στην Περιγεννητική Παθολογοανατομία Ιατρό (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αν. Κωνσταντινίδου, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Αθηνών).

Τα δείγματα που συλλέγονταν ήταν 6 βιοψίες του βασικού πετάλου του πλακούντα, έτσι ώστε να περιέχεται βασικός φθαρτός και λαχνωτό χόριο, χωρίς όμως το χοριονικό ή αμνιακό πέταλο. Τα δείγματα αμέσως μετά τη συλλογή τους φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την επεξεργασία τους. Δύο από τα έξι παραπάνω δείγματα επελέγησαν τυχαία για την πειραματική διαδικασία. Επίσης από το υλικό που στάλθηκε για παθολογοανατομική εκτίμηση, αντιπροσωπευτικές τομές επελέγησαν για κάθε πλακούντα, ώστε να ακολουθήσει ανοσοϊστοχημική χρώση τους.

Τελικά και μετά από τον αποκλεισμό όσων δειγμάτων δεν πληρούσαν τα κριτήρια ένταξης στο ερευνητικό πρωτόκολλο, σύμφωνα με τους ορισμούς που περιγράφονται παρακάτω, αλλά και μετά την αναγκαστική απόρριψη κάποιων δειγμάτων στα οποία προέκυψαν τεχνικά προβλήματα επεξεργασίας

έγινε καταγραφή όλων των επιμέρους δημογραφικών και κλινικών στοιχείων, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, όπου αποτυπώνεται ο μέσος όρος ή ο αριθμός κάθε παραμέτρου για κάθε ομάδα δειγμάτων.

	Φυσιολογικές	ΕΥΑ
Αριθμός εγκύων	30	49
Ηλικία μητέρας (έτη)	28,7	29
ΔΜΣ (Δείκτης Μάζας Σώματος)	24,36	23,5
Πρόσληψη βάρους μητέρας (kg)	14,8	10,9
Διάρκεια κύησης (εβδομάδες)	38,5	36,2
Αριθμός τόκων (1^{ος} / >1)	14 / 16	29 / 20
Βάρος γέννησης νεογνού (gr)	3170	1963
Εκατοστιαία θέση βάρους γέννησης νεογνού	40,5	1,44
Παθολογικός δείκτης αμνιακού υγρού (AFI)	1	12
Παθολογικό Doppler ομφαλικής αρτηρίας 2^{ου} ή 3^{ου} τριμήνου	1	24
Προεκλαμψία	0	14
Φύλλο νεογνού (Α / Θ)	14 / 16	20 / 29
Κάπνισμα προ / κατά την κύηση	2 / 5	11 / 10
Κολπικός τοκετός / Καισαρική τομή	19 / 11	15 / 34

1.2 Διάγνωση ΕΥΑ και προεκλαμψίας – κριτήρια επιλογής δειγμάτων

Ως ΕΥΑ διαγνώστηκαν οι εγκυμοσύνες εκείνες που εμφάνισαν εμβρυικό μέγεθος και βάρος κάτω από την 10^η εκατοστιαία θέση, ενώ παράλληλα εμφάνισαν ασύμμετρη πρόοδο της ανάπτυξης και παρεκκλίνουσες μετρήσεις στα υπερηχογραφήματα 2^{ου} τριμήνου. Έτσι, οι πλακούντες που εξετάσαμε θεωρούμε ότι προήλθαν από έμβρυα με ΕΥΑ, παρά μικρά για την ηλικία κύησης έμβρυα και μάλιστα όλα ανήκαν στην κατηγορία της ασύμμετρης ΕΥΑ. Ως προεκλαμψία θεωρήσαμε όλες τις περιπτώσεις που η έγκυος εμφάνισε υπέρταση, οίδημα των άκρων και λευκωματουρία, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες. Για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας θέσης ανάπτυξης του εμβρύου, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό «Customised centile calculator v6.2.2 (Mar 2007)» που συνυπολογίζει το βάρος και το ύψος της μητέρας, τον αριθμό προηγούμενων τόκων, το φύλλο του νεογνού, τη διάρκεια κύησης σε ημέρες και το βάρος νεογνού.

Εγκυμοσύνες με προϋπάρχουσες παθολογίες, λοιμώξεις προγεννητικής σημαντικότητας όπως TORCH (τοξόπλασμα, συγγενή σύφιλη, ερυθρά, κυτταρομεγαλοϊό και ερπητοϊό) και με διαπιστωμένη χρήση ουσιών αποκλείσθηκαν από τη μελέτη. Επιπρόσθετα, όλες οι περιπτώσεις όπου στα νεογνά ανιχνεύτηκε χρωμοσωμική ή συγγενής βλάβη αποκλείσθηκαν από τη μελέτη. Τέλος, ως φυσιολογικοί πλακούντες για μάρτυρες στις μετρήσεις μας, θεωρήθηκαν οι προερχόμενοι από εγκυμοσύνες με βάρος νεογνού πάνω από την 10^η εκατοστιαία θέση, κανένα σημείο ή σημάδι παθολογίας στη διάρκεια της κύησης και διάρκεια εγκυμοσύνης πάνω από 37 εβδομάδες. Καισαρική τομή ή φυσιολογικός τοκετός δεν αποτέλεσε κριτήριο αποκλεισμού κανενός δείγματος.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις Doppler της ομφαλικής αρτηρίας, όπου θεωρήθηκαν ως παθολογικές όταν ο συστολικός προς

διαστολικό δείκτη ήταν πάνω από 95% ή σε περιπτώσεις που η διαστολική ροή ήταν απύσση ή αντεστραμμένη. Βέβαια, η μέτρηση Doppler της ομφαλικής αρτηρίας δεν είναι αρκετή για να κατηγοριοποιήσει ένα έμβρυο ως ΕΥΑ. Μόνο σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα τεκμηριώνεται κάτι τέτοιο, αφού έμβρυα με ΕΥΑ μπορούν να έχουν φυσιολογικό Doppler ομφαλικής αρτηρίας [113].

1.3 Εκχύλιση RNA από ιστούς

Σε όλους τους ιστούς έγινε εκχύλιση ολικού RNA με τη χρήση του πρωτοκόλλου του TRIzol (Invitrogen). 100mg από τα δείγματα των ιστών ομογενοποιούνται σε διάλυμα 1ml του TRIzol και το RNA εκχυλίζεται με την προσθήκη χλωροφορμίου και φυγοκέντριση, κατακρημνίζεται με τη χρήση ισοπροπανόλης, ξεπλένεται με απόλυτη αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 30-50μl DEPC (diethyl pyrocarbonate) treated H₂O.

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

1.4 Αντίστροφη Μεταγραφή - Παρασκευή cDNA

2,5μg RNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του cDNA, με τη χρήση 50ng τυχαίων εκκινητών (random hexamers) και του kit της αντίστροφης μεταγραφάσης AffinityScript (Stratagene). Αρχικά το RNA μαζί με τους τυχαίους εκκινητές θερμαίνονται στους 65°C για 5 λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές. Στη συνέχεια τα δείγματα

επωάζονται στους 25°C για 10 λεπτά, ώστε να προσδεθούν οι τυχαίοι εκκινητές στην αλληλουχία στόχο. Κατόπιν προστίθενται τα διαλύματα του kit (2μl RT buffer, 0,8μl dNTPs, 0,5μl RNAase I και 1μl RT), ώστε να προκύψει συνολικός όγκος 20μl, ξαναεπωάζονται τα δείγματα για 10 λεπτά στους 25°C και η αντίστροφη μεταγραφή τελείται στους 50°C για 60 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την απενεργοποίηση του ενζύμου θερμαίνοντας τα δείγματα στους 70°C για 15 λεπτά. Το cDNA αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

1.5 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Σε όλους τους ιστούς πραγματοποιήθηκε εκχύλιση πρωτεϊνών με τη χρήση του T-PER (tissue protein extraction reagent - Pierce) και χρήση Halt Protease Inhibitor (Thermo Scientific).

Εναλλακτικά σε κάποια δείγματα, πραγματοποιήθηκε συνέχεια του πρωτοκόλλου εκχύλισης του RNA από το TRIzol ώστε να υπάρχει εξοικονόμηση ιστών. Για τη διαδικασία αυτή, προσθέτουμε απόλυτη αιθανόλη στο υπόλοιπο του δείγματος, φυγοκεντρούμε, συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ισοπροπανόλη. Φυγοκεντρούμε ξανά και ξεπλένουμε τρεις φορές την πρωτεϊνική πελέτα με διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης σε 95% αιθανόλη και μία φορά με απόλυτη αιθανόλη. Η επαναδιάλυση της πελέτας γίνεται σε διάλυμα 1% SDS.

1.6 Προσδιορισμός της ποσότητας πρωτεΐνης

Η μέθοδος προσδιορισμού της ποσότητας των πρωτεϊνών κατά Bradford στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x PBS στα 595nm με τη χρήση κατάλληλης χρωστικής,

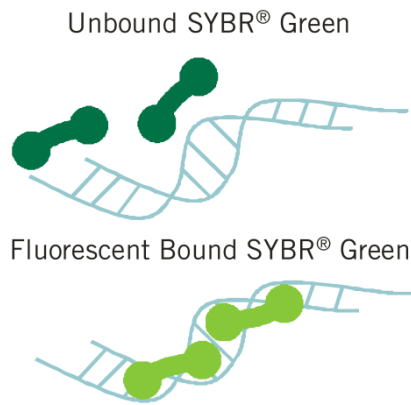
γνωστής ως διάλυμα Bradford. Αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm πρότυπων διαλυμάτων βόειου αλβουμίνης (BSA) γνωστής συγκέντρωσης: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, και από τα αποτελέσματα κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Υπολογίζεται η εξίσωση που διέπει την πρότυπη καμπύλη που είναι της μορφής: $y=ax+b$. Ακολουθεί φωτομέτρηση στο ίδιο μήκος κύματος των δειγμάτων πρωτεΐνης εις διπλούν και υπολογισμός της μέσης τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

1.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

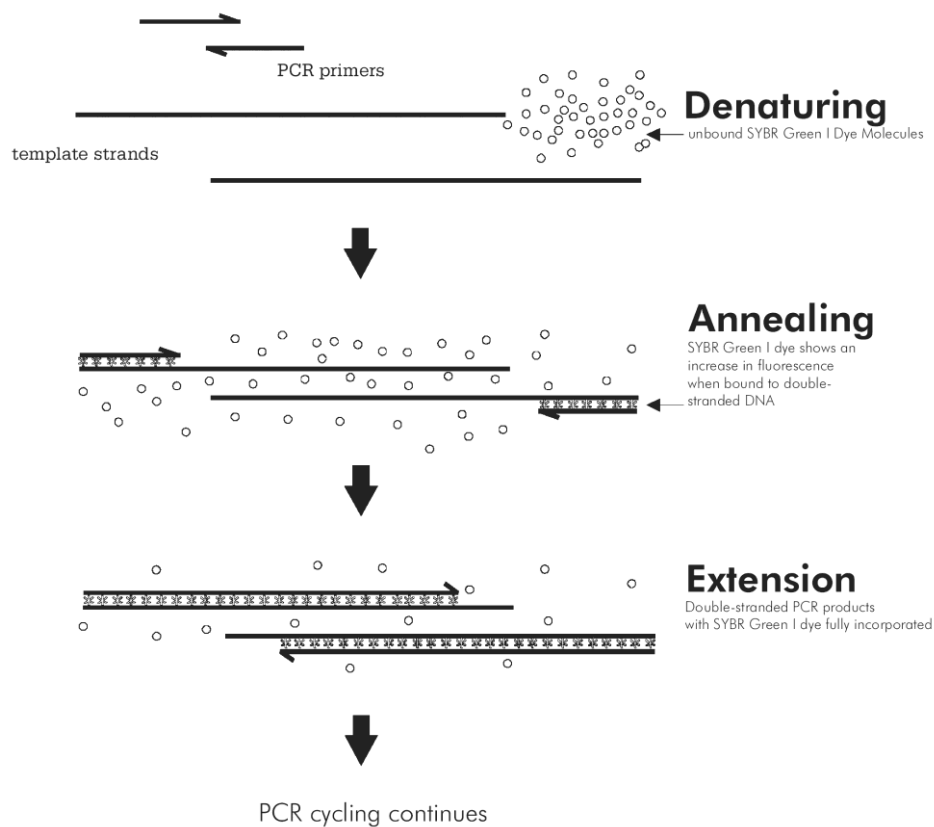
Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA των γονιδίων, αντικαθιστώντας τη λιγότερο αξιόπιστη και χαμηλότερης ευαισθησίας και ακρίβειας μέθοδο της RT-PCR. Χρησιμοποιούνται κυρίως δύο χημείες, αυτή της SYBR Green I και των ιχνηθετών Taqman (Taqman probes), που απεικονίζονται και στο τέλος της παραγράφου, κάθε μία με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της.

Η χρήση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real-Time PCR) έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της παλαιότερης ημι-ποσοτικής RT-PCR μεθόδου. Κατά πρώτο και κύριο λόγο τα αποτελέσματά της είναι πιο αξιόπιστα, καθώς η ποσοτικοποίηση δεν πραγματοποιείται κατά τους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης της PCR, όπου διάφοροι ανασταλτικοί παράγοντες (διμερή εκκινητών, εξάντληση του Mg^{2+} και των dNTPs, απώλεια ενζυμικής ενεργότητας της πολυμεράσης) μπορούν να τροποποιήσουν τη δημιουργία του

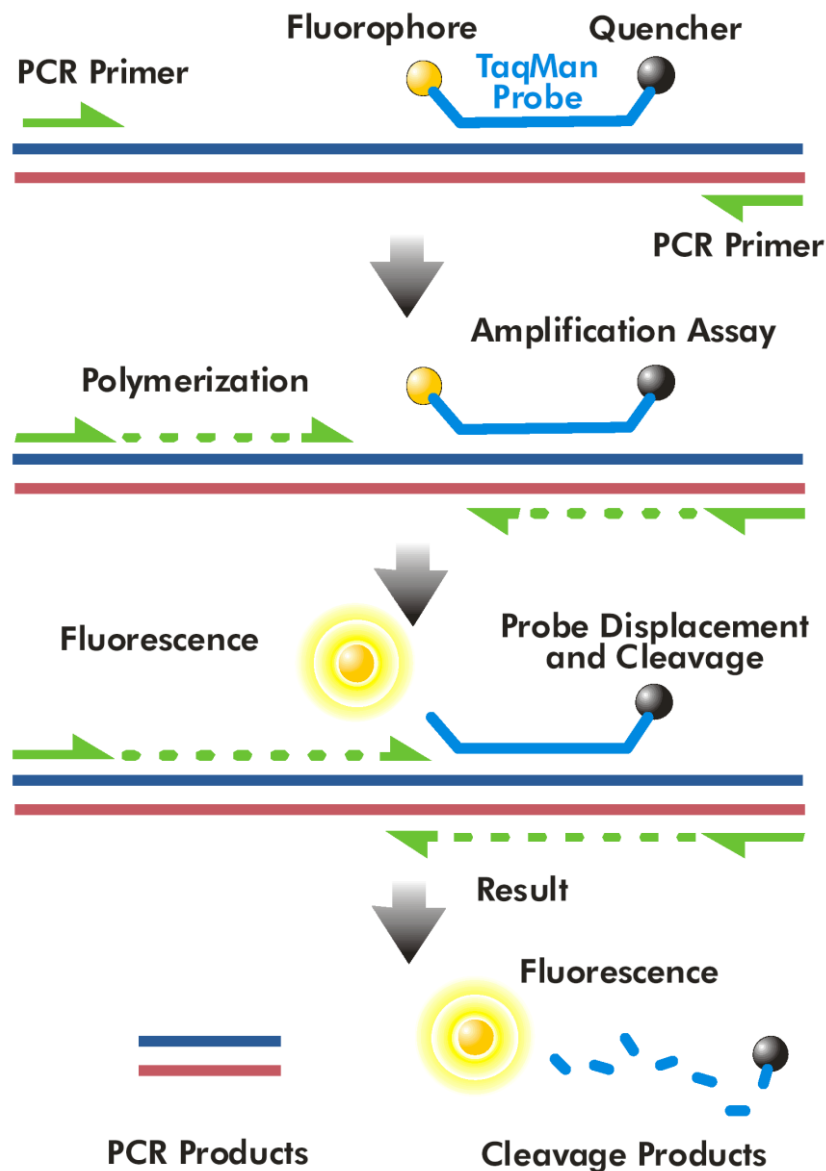
PCR προϊόντος, αλλά κατά τους αρχικούς κύκλους της ποσοτικοποίησης, όπου τέτοιοι περιορισμοί δεν ισχύουν. Επιπλέον, στην RT-QPCR η συλλογή των δεδομένων γίνεται με λέιζερ, το οποίο είναι σαφώς πιο ευαίσθητο από το βρωμιούχο αιθίδιο ή τον Ag+, απεικονιστικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την εμφάνιση των προϊόντων στις κλασσικές PCR. Εξοικονομεί επίσης χρόνο, καθώς η όλη διαδικασία κρατάει λίγο περισσότερο από μια απλή PCR, ενώ η ημι-ποσοτική PCR απαιτεί την ανάλυση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, διαδικασίες χρονοβόρες. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων γίνεται συνήθως αυτόματα στην Real-Time PCR από το λογισμικό του μηχανήματος, και δεν απαιτεί τη χρήση λογισμικού επεξεργασίας εικόνων, που και είναι ακριβά, αλλά και το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς γίνεται χειροκίνητα, κάτι που χρειάζονται οι παλαιές τεχνικές ποσοτικοποίησης. Υπάρχουν και μερικά μειονεκτήματα. Είναι πιο δαπανηρή τεχνική (μία παρενέργεια της αυξημένης ευαισθησίας του συστήματος), καθώς απαιτεί βελτιστοποιημένα υλικά. Οι αναλύσεις γίνονται σε τριπλέτες, κάτι που αυξάνει το κόστος δραματικά (περισσότερα PCR master mixes και επιπλέον kit αντίστροφης μεταγραφής, το οποίο σημαίνει ότι τα δείγματα ιστών, τα οποία συνήθως είναι η περιουσία ενός εργαστηρίου, εξαντλούνται πιο γρήγορα). Άλλα μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόστος συντήρησης, εξαιτίας των εξαρτημάτων υψηλής τεχνολογίας που διαθέτει, όπως το λέιζερ, και το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της ποσοτικοποίησης δε βλέπει κανείς τα προϊόντα της PCR, ώστε να ξέρει κατά πόσο οι καμπύλες ποσοτικοποίησης είναι οι σωστές και δεν έχουν προέλθει από διμερή εκκινητών ή παρά-προϊόντων. Αυτό απαιτεί, τουλάχιστον στα αρχικά πειράματα, την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR με την ανάλυσή τους σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου.



Η δεσμευμένη στο δίκλωνο μόριο DNA χρωστική SYBR Green I φθορίζει 1000 φορές περισσότερο από την κυκλοφορούσα ελεύθερη στο διάλυμα.



Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.



Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση ιχνηθετών της χημείας Taqman. Οι ιχνηθέτες αυτοί βασίζονται στην ιδιότητα της Taq DNA πολυμεράσης να δρα και ως 5'-3' εξωνουκλεάση, αποκόπτοντας τους κατά τη διάρκεια της υβριδοποίησης με τη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο, ελευθερώνοντας τη φθορίζουσα ουσία.

Ο προσδιορισμός της έκφρασης του mRNA των γονιδίων που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή έγινε με ποσοτικό τρόπο με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction ή RT-QPCR). Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης. Η ανίχνευση των σχηματιζόμενων προϊόντων έγινε με τη χρήση του kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix.

Αρχικά έγινε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της PCR (συγκέντρωση εκκινητών και θερμοκρασία πρόσδεσής τους στο cDNA). Το τελικό PCR για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ήταν: 10μl Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix, 0,6μl primers γονιδίου στόχου, 0,6μl primers γονιδίου αναφοράς (ακτίνη) και 100ng (1μl) cDNA του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 20μl. Οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου στόχου και της ακτίνης έγιναν σε διαφορετικά 96-well plates. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Mx3000 Real-Time Thermal Cycler (Stratagene) με το κατάλληλο πρόγραμμα: αρχική θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη τους και την ενεργοποίηση της hot-start πολυμεράσης, 40 κύκλοι με θέρμανση στους 95°C για 30sec, αναδιάταξη των εκκινητών (annealing) στους 60°C για 30sec και πολυμερισμός (extension) στους 72°C για 30sec. Μετά το πέρας των κύκλων του πολυμερισμού, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας τους (0.2°C/sec) από τους 55°C στους 95°C ώστε να προσδιοριστεί η καμπύλη αποδιάταξης τους (Melting curve). Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, έγινε ανάλυση ενδεικτικά κάποιων δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφιση των PCR προϊόντων κάτω από υπεριώδες φως (UV).

Για κάθε δείγμα έγινε ο προσδιορισμός της σχετικής ποσότητας τόσο του γονιδίου στόχου όσο και της ακτίνης και υπολογίστηκε ο λόγος τους. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο μέσος όρος των λόγων για τα φυσιολογικά δείγματα και με βάση αυτή την τιμή πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ΕΥΑ. Αναλογίες δειγμάτων παθολογικών προς τα φυσιολογικά δείγματα μεγαλύτερες από 2 θεωρήθηκαν ως υπερέκφραση του γονιδίου στόχου, ενώ μικρότερες του 0.5 θεωρήθηκαν ως υποέκφραση.

1.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Τα δείγματα πρωτεϊνών ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 10% SDS-PAGE (29:1 ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο). Χρησιμοποιήθηκαν 25 μ g πρωτεΐνης κάθε δείγματος τα οποία αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης και αποδιατάχθηκαν με βρασμό στους 95°C για 5-10 λεπτά και ταχεία ψύξη σε πάγο. Το διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης περιλαμβάνει μερκαπτοαιθανόλη και SDS ως αποδιατακτικούς παράγοντες των πρωτεϊνών, και κυανό της βρωμοφαινόλης ως χρωστική που κάνει ορατές τις πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης στο πήκτωμα. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο διακριτά τμήματα: α) το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών (*separating* ή *resolving gel*) και β) το πήκτωμα επιστοίβαξης των πρωτεϊνών (*stacking gel*) που εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εισαγωγή όλης της ποσότητας των δειγμάτων στο πήκτωμα διαχωρισμού.

1.9 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη τύπου PVDF με τη βοήθεια ειδικής συσκευής, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Η αρχή λειτουργίας της

συσκευής είναι πολύ απλή: διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μεταφέρονται οι πρωτεΐνες (αρνητικά φορτισμένες) από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Ακολουθεί δέσμευση των ελεύθερων πρωτεΐνης περιοχών της μεμβράνης (blocking), μέσω επώασης της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλατος (σε σκόνη) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS 1x. Κατόπιν η μεμβράνη εκπλένεται από την περίσσεια του διαλύματος blocking με διάλυμα TBS-T (Tris buffer saline, 1% Tween 20) 3 φορές, για διάστημα 10 λεπτών κάθε φορά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα του πρώτου αντισώματος κατάλληλης αραίωσης σε διάλυμα TBS που περιέχει 1% γάλα, και επώαση της μεμβράνης στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθούν εκπλύσεις του αντισώματος όπως και προηγουμένως, και προσθήκη του δεύτερου αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση, που είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (υπεροξειδάση του ραπανιού) και επώαση της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια εκπλένεται όπως και προηγουμένως, και αφού έρθει σε επαφή για 1-3 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL, εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ όπου αποτυπώνεται η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες. Μετά την εμφάνιση των φιλμ στο μηχάνημα της Kodak τα φιλμ σαρώνονται σε έναν ψηφιακό σαρωτή εικόνας (Agfa Snap-Scan 1212u). Η ενοποιημένη πυκνότητα των ζωνών (πυκνότητα ζώνης προϊόντος-πυκνότητα ζώνης υποβάθρου) χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ανάλυση ψηφιακής εικόνας (AlphaImager, AlphaInnotech). Ο λόγος της ενοποιημένης πυκνότητας της κάθε πρωτεΐνης διαιρεμένος με αυτόν της β-ακτίνης, χρησιμοποιήθηκε για τον ημι-ποσοτικό καθορισμό των αποτελεσμάτων.

1.10 Ανοσοϊστοχημεία

Τομές (4μm) παραφινωμένου ιστού χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού ANXA5, διαλυμένο σε αναλογία 1:50 σε ορό αλβουμίνης βοείου / ρυθμιστικό άλας Tris (BSA/TBS). Εφαρμόστηκε ανάκτηση αντιγόνου με υψηλή θερμοκρασία και τέλος ανοσοϊστοχημική χρώση με τη μέθοδο τριών σταδίων της υπεροξειδάσης [streptABCcomplex/HRP, Duet (DAKO, Carpinteria) και diaminobenzidine (DAB) ως χρωμογόνο].

Για τον καθορισμό του δείκτη έντασης της χρώσης (Labeling Index - LI), χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο λογισμικό (Sigma Scan Pro 5.0; Science). Το ποσοστό της θετικής χρώσης εκτιμήθηκε σε σχέση με την έκταση των ανοσοϊστοχημικά σημασμένων κυττάρων στο πλακουντιακό παρέγχυμα της κάθε τομής. Το χοριονικό και βασικό πέταλο δεν συμπεριλαμβάνονταν στον υπολογισμό. Ο δείκτης LI, υπολογίστηκε ως το ποσοστό θετικής χρώσης πολλαπλασιαζόμενο με την ένταση της χρώσης. Η ένταση της χρώσης βαθμονομήθηκε σε τρία σκορ: 1. ήπια, 2. μέτρια, 3. έντονη.

1.11 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.5. Τα στατιστικά τεστ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Chi-square, Fisher's exact, Student's T, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis H, Spearman's rho και Kaplan-Meier. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε όταν $P < 0.05$.

2. ΥΛΙΚΑ

2.1 Διαλύματα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών: TRIzol (Invitrogen)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- EtOH 70% και 100% (Merck)
- dH₂O κατεργασμένο με DEPC (Invitrogen)
- 0.1M κιτρικό νάτριο σε 10% αιθανόλη
- 0.3M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη
- 1% SDS
- Reagent A: Tris-base (10mM), Sucrose (320mM), MgCl₂·6H₂O (5mM), Triton-X-100 (1% v/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%
- Reagent B: Tris-base (400mM), NaCl (150mM), EDTA (60mM), SDS (1% w/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%. Το SDS προστίθεται μετά την αποστείρωση του διαλύματος.
- T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce)
- Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail (ThermoScientific)

2.2 Ηλεκτροφορητικά διαλύματα

- Διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης πρωτεϊνών 3x: 0.2 M Tris.HCl, 6% SDS, 6% μερκαπτοαιθανόλη, 15% γλυκερόλη και 0.03 % κυανού της βρωμοφαινόλης
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating or resolving gel buffer): 1.5 M Tris.HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβαξης πρωτεϊνών (stacking gel buffer): 1M Tris.HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών 10×: 0.25mM Tris base, 1.92mM γλυκίνη, 1% SDS (w/v), pH 8.3
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών στη μεμβράνη (transfer buffer) 1×: 0.025mM Tris base, 0.192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη, pH 8.3
- Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών ανοσοαποτύπωσης: TBS, 0.1% Tween (v/v)
- Διάλυμα χημειοφωταγούς ανίχνευσης πρωτεϊνών (ELC): ChemiLucent Western blot detection system (Chemicon)

2.3 Αντιδραστήρια για cDNA και rt-PCR

- AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit (Stratagene)
- Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene)

2.4 Αντιδραστήρια για ανοσοϊστοχημεία

- StreptABComplex/HRP, Duet (DAKO, Carpinteria)
- Diaminobenzidine (DAB) (DAKO)

2.5 Υλικά και εταιρείες προέλευσης

Υλικό	Εταιρία	Υλικό	Εταιρία
Αγαρόζη	Invitrogen	Μεθανόλη	Fluka
Αιθανόλη	Merck	ΜOPS	Sigma
Ακρυλαμίδιο	BDH	Οξεικό οξύ	BDH
Ανθρακικό νάτριο	Sigma	SDS	BDH
Βορικό οξύ	BDH	TEMED	Sigma
Βρομοphenol blue	Sigma	Tris base	BDH
Βρωμιούχο αιθίδιο	BDH	Tween 20	Sigma
CAPS	Sigma	Υδροξείδιο του Νατρίου	Sigma
Γλυκερόλη	Invitrogen	Υδροχλωρικό οξύ	BDH
Διθειοθρεϊτόλη	Sigma	Υδροχλωρική γουανιδίνη	BDH
Bicalutamide	LKT Labs	Ψαινόλη	BDH
EDTA	BDH	Φορμαλδεύδη	BDH
Ισοπροπανόλη	BDH	Χλωριούχο νάτριο	Sigma
Κιτρικό νάτριο	BDH	Χλωροφόρμιο	Fluka
Flutamide	LKT Labs	R1881	PerkinElmer

2.6 Εκκινητές για τη RT-PCR

Γονίδιο	Ζεύγος εκκινητών
ARNT	GCCATTGCCTCTGGAAACTCT CTGTTCCCTTCTCCATCATCATC
HIF-1α	CGGCGCGAACGACAAGAA GGAAGTGGCAACTGATGAGCAAG
HIF-2α	ATGACAGCTGACAAGGAGAAGAA TGGGCCAGCTCATAGAACAC
HIF-3α	ACG GCA CCC CCA AAG TCC T GGG GCC AGC ATC TCC AAA TC
PHD-1	GTG CTG GCC GAG GTG GAG TCG CCG TGG GGA TTG TCA
PHD-2	GAC CGT CGC AAC CCT CAT TCA ACC CTC ACA CCT TTT TCA C
PHD-3	CCGGCTGGGCAAATACTAC GTCCACGTGGCGAACATAAC
VHL	GCG CCG AGG AGG AGA TGG A AGG CGG CAG CGT TGG GTA G
ANXA5	CTTGGGCACAGATGAGGAGAGCA AAGCCGAGAGGGTTTCATCAGAGC

2.7 Αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρία
Rabbit polyclonal PHD-1	Abcam (ab5156)
Rabbit polyclonal PHD-2	Abcam (ab4561)
Rabbit polyclonal PHD-3	Abcam (ab4562)
Rabbit polyclonal VHL	Abcam (ab28434)
Mouse monoclonal HIF-1a	Santa Cruz (sc-56691)
Mouse monoclonal EPAS-1 (HIF-2a)	Santa Cruz (sc-46691)
Rabbit polyclonal HIF-3a	Santa Cruz (sc-28707)
Mouse monoclonal ARNT (HIF-b)	Santa Cruz (sc-17812)
Mouse monoclonal Annexin V	Santa Cruz (sc-65391)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πρώτη φάση αποτελεσμάτων

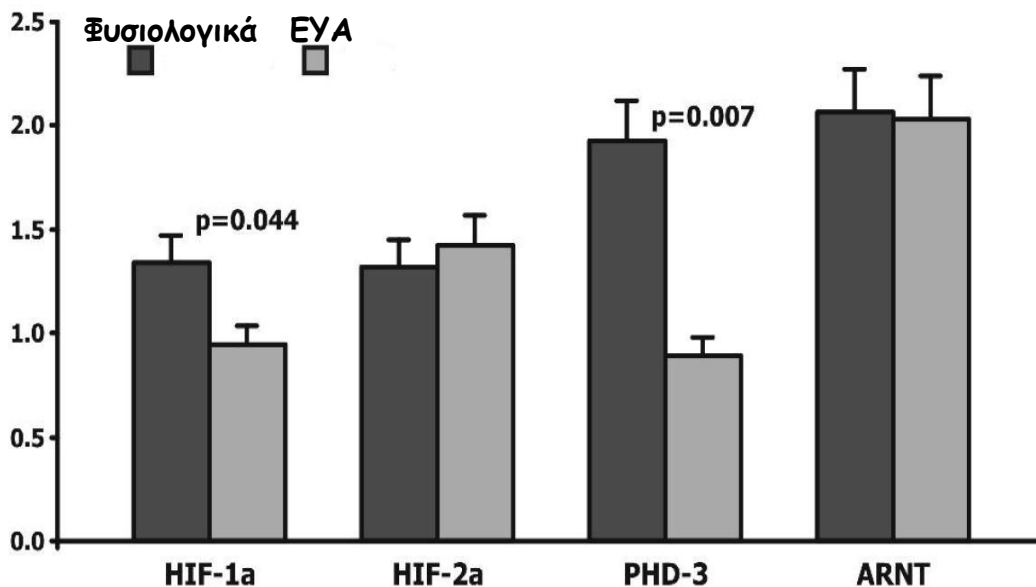
Κατά τη διάρκεια της συλλογής των δειγμάτων υπήρχαν δύο φάσεις αποτελεσμάτων. Κάποια πρώιμα, αλλά πολύ ενδιαφέροντα που οδήγησαν και σε δημοσίευση και τα τελικά συνολικά αποτελέσματα.

Στην πρώτη φάση των πειραμάτων είχε ολοκληρωθεί η συλλογή 20 παθολογικών (πλακούντες από εγκυμοσύνες με ΕΥΑ) και 20 φυσιολογικών δειγμάτων, ενώ είχαν στανταριστεί οι συνθήκες και οι αλληλουχίες των εκκινητών για 4 γονίδια (HIF-1α, HIF-2α, ARNT και PHD-3).

Τα πρώτα αποτελέσματα από τις αναλύσεις με qRT-PCR απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα και συνοψίζονται στο διάγραμμα:

Gene	relative mRNA expression			p-value*
	(%)	— (%)	(%)	
HIF-1α	5/20 (25.0)	6/20 (30.0)	9/20 (45.0)	0.091
HIF-2α	3/20 (15.0)	11/20 (55.0)	6/20 (30.0)	0.577
PHD-3	3/20 (15.0)	4/20 (20.0)	13/20 (65.0)	<0.001
ARNT	3/20 (15.0)	11/20 (55.0)	6/20 (30.0)	0.577

· overexpression; — normal expression; reduced expression;
*Pearson's Chi-square test (df=2)



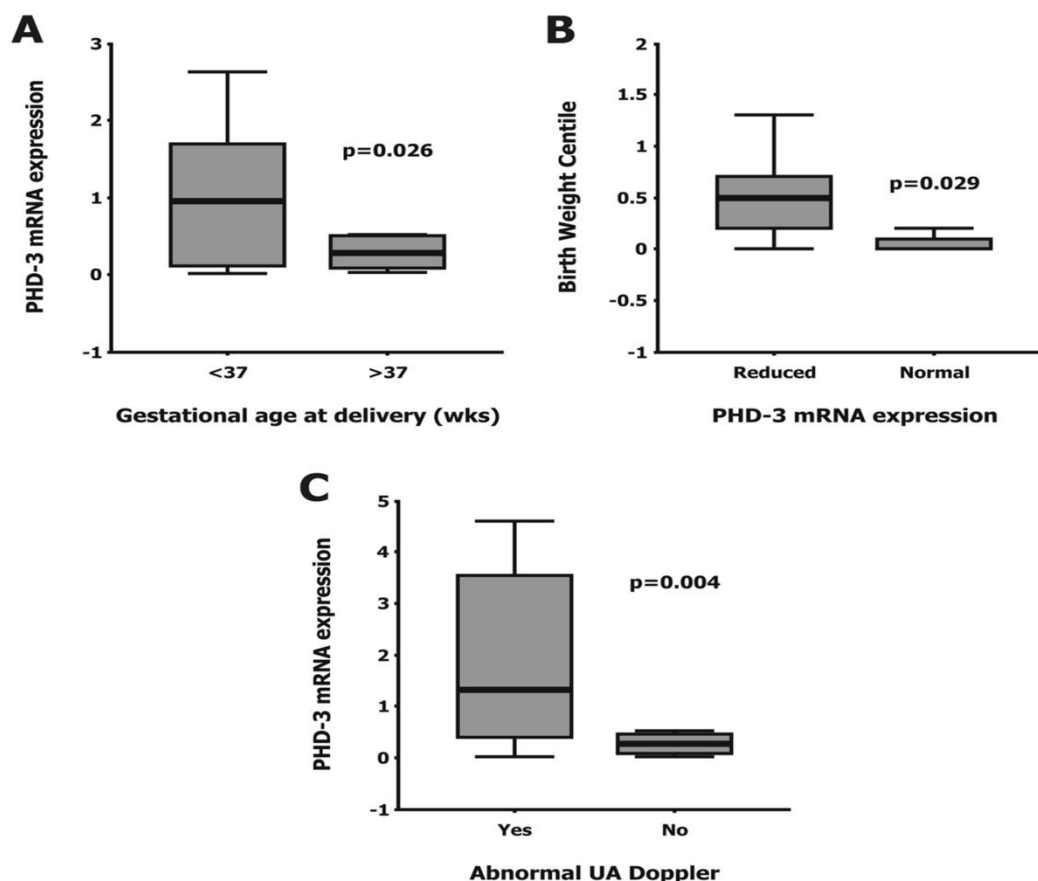
Συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά δείγματα, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA expression levels των HIF-1α και PHD-3 εμφάνισαν μείωση στο 45% (9/20) και στο 65% (13/20) των παθολογικών δειγμάτων (με ΕΥΑ), αντίστοιχα. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης των HIF-2α και ARNT δεν παρουσίασαν αλλαγή στην πλειονότητα των ΕΥΑ δειγμάτων στη σύγκριση με τα φυσιολογικά.

Περαιτέρω ανάλυση ανέδειξε σημαντικές στατιστικά συσχετίσεις μεταξύ των πλακουντιακών επιπέδων mRNA και συγκεκριμένων παθολογικών παραμέτρων στις περιπτώσεις ΕΥΑ. Η έκφραση του mRNA του PHD-3 ήταν αυξημένη στα δείγματα από ΕΥΑ εκείνα με χρόνο κύησης μικρότερο των 37 εβδομάδων (8/20 δείγματα) συγκρινόμενα με εκείνα με χρόνο κύησης μεγαλύτερο των 37 εβδομάδων (12/20 δείγματα) ($2,08 \pm 0,92$ έναντι $0,50 \pm 0,24$, Mann-Whitney U test, $p=0,008$).

Επιπρόσθετα, οι περιπτώσεις με ΕΥΑ και βάρος νεογνού μικρότερο από την 0,5^η εκατοστιαία θέση (11/20 δείγματα) είχαν υψηλότερα επίπεδα mRNA του PHD-3 συγκρινόμενα με εκείνες τις περιπτώσεις ΕΥΑ με βάρος νεογνού μεγαλύτερο από την 0,5^η εκατοστιαία θέση (9/20 δείγματα) ($1,97 \pm 0,77$ έναντι $0,30 \pm 0,08$, Mann-Whitney U test, $p=0,029$). Επίσης, εκείνες οι εγκυμοσύνες με ΕΥΑ που εμφάνισαν παθολογικό Doppler οφθαλμικής αρτηρίας (OA) (8/20 δείγματα) εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης mRNA του PHD-3 σε σχέση με τις υπόλοιπες εγκυμοσύνες με ΕΥΑ που είχαν φυσιολογικό Doppler OA (12/20 δείγματα) ($2,28 \pm 0,92$ έναντι $0,37 \pm 0,13$, Mann-Whitney U test, $p=0,034$). Τέλος, τα επίπεδα mRNA του HIF-1α παρουσιάστηκαν μειωμένα στα δείγματα με ΕΥΑ και βάρος νεογνού μικρότερο από την 0,5^η εκατοστιαία θέση (11/20 δείγματα) συγκρινόμενα με εκείνες τις περιπτώσεις ΕΥΑ με βάρος νεογνού μεγαλύτερο από την 0,5^η εκατοστιαία

θέση (9/20 δείγματα) ($0,99 \pm 0,29$ έναντι $1,87 \pm 0,73$, Mann-Whitney U test, $p=0,039$).

Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται συνοπτικά στα παρακάτω γραφήματα:



Δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης πλακουντιακού mRNA του HIF-1α και ηλικίας κατά την κύηση ή των μετρήσεων Doppler OA. Επιπρόσθετα, καμία στατιστική συσχέτιση δεν εντοπίστηκε ανάμεσα στα επίπεδα mRNA του HIF-1α ή του PHD-3 και τη μητρική ηλικία, το ΔΜΣ, το κάπνισμα, την πρόσληψη βάρους κατά την εγκυμοσύνη, το φύλο του παιδιού και τον τόκο. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης των δύο άλλων υπό μελέτη γονιδίων της πρώτης φάσης των πειραμάτων (HIF-2α και ARNT), δεν εμφάνισαν κάποια στατιστική σημαντική συσχέτιση με τις παραμέτρους που συγκρίναμε.

Με τη χρήση του Spearman's rank test, ελέγξαμε το μοτίβο συνέκφρασης των ανωτέρω τεσσάρων γονιδίων (HIF-1α, HIF-2α, PHD-3 και ARNT) σε συνδυασμό ζευγών (μετά από κανονικοποίηση). Με το συγκεκριμένο τεστ ελέγχουμε κατά πόσο δύο γονίδια υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται μαζί είτε με θετική είτε με αρνητική συσχέτιση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο HIF-1α έχει θετική συσχέτιση με τους PHD-3 και ARNT [correlation coefficient (CC) = 0,58, p=0,007; CC=0,83, p<0.001, αντίστοιχα], ο PHD3 έχει θετική συσχέτιση με τον ARNT (CC=0,47, p=0,038), ενώ ο HIF-2α δε συσχετίζεται με κανέναν από τους HIF-1α, PHD3 και ARNT όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης (CC=0,02, p=0,94; CC=0,06, p=0,82; και CC=0,10, p=0,66, αντίστοιχα).

Ένα άλλο εύρημα ήταν ότι η έκφραση του PHD-3 στους πλακούντες από τις εγκυμοσύνες με ΕΥΑ που ο τοκετός έγινε με καισαρική τομή (13/20 δείγματα) ήταν αυξημένη συγκρινόμενη με τις περιπτώσεις του κοιλιακού τοκετού (7/20 δείγματα) ($1,64 \pm 0,61$ έναντι $0,19 \pm 0,07$, Mann-Whitney U test, p=0,024).

Επίσης πραγματοποιήσαμε με κατάλληλα λογισμικά έλεγχο της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων μας σε σχέση με τον αριθμό των δειγμάτων και προέκυψε στατιστική δύναμη 83.8%. Συγκεκριμένα μόνο 18 δείγματα θα ήταν αρκετά για στατιστική δύναμη 80%.

Τα αποτελέσματα αυτά που προέκυψαν από την πρώτη φάση των πειραμάτων ήταν πολύ ικανοποιητικά και αποτέλεσαν βάση για την ολοκλήρωση των πειραμάτων.

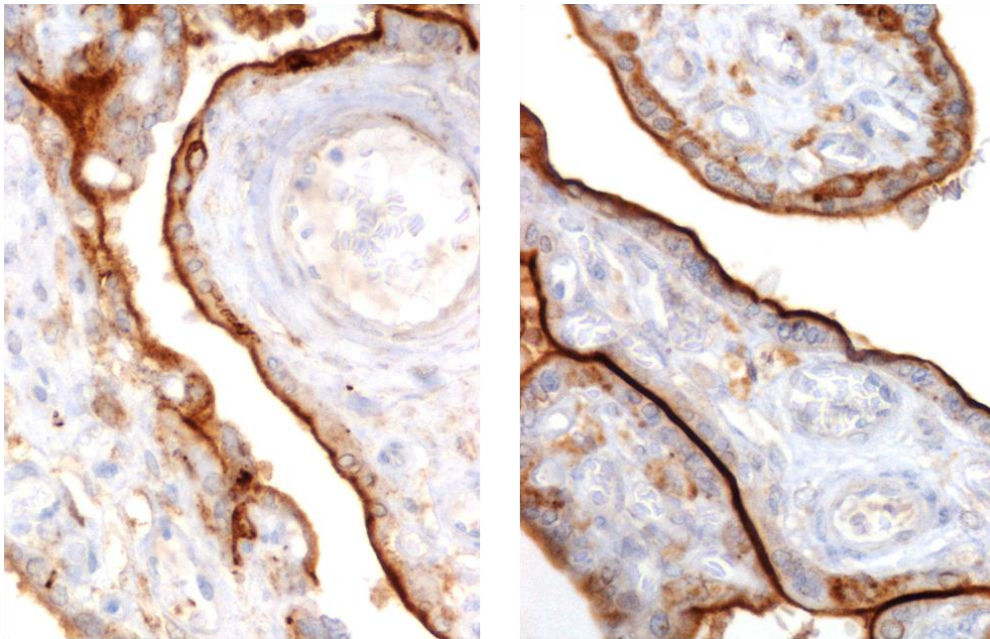
Δεύτερη φάση αποτελεσμάτων

Η επόμενη φάση αποτελεσμάτων αφορά στην επιλεγμένη μελέτη 23 δειγμάτων με συνδυασμό EYA και προεκλαμψίας για την έκφραση του γονιδίου της αννεξίνης A5 (ANXA5), την ανίχνευση της πρωτεΐνης με Western blotting, αλλά και την ανοσοϊστοχημική χρώση για το αντίσωμα της ANXA5. Οι συγκεκριμένοι πλακούντες εμφάνιζαν όλοι κατά την ιστολογική εξέταση αγγειακές διαταραχές, όπως μικρά βασικά έμφρακτα, θρομβωμένα αγγειακά στελέχη και σημεία μειωμένης αιματικής ροής. Οι πλακούντες από εγκυμοσύνες με φυσιολογική πορεία που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς για τις μετρήσεις ήταν 34.

Η έκφραση της ANXA5 όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο της qRT-PCR ήταν καθολικά μειωμένη στους πλακούντες που προέρχονταν από κυήσεις με προεκλαμψία (22/23, 96%) συγκριτικά με την έκφρασή της στους πλακούντες που προέρχονταν από φυσιολογικές κυήσεις ($p < 0,001$).

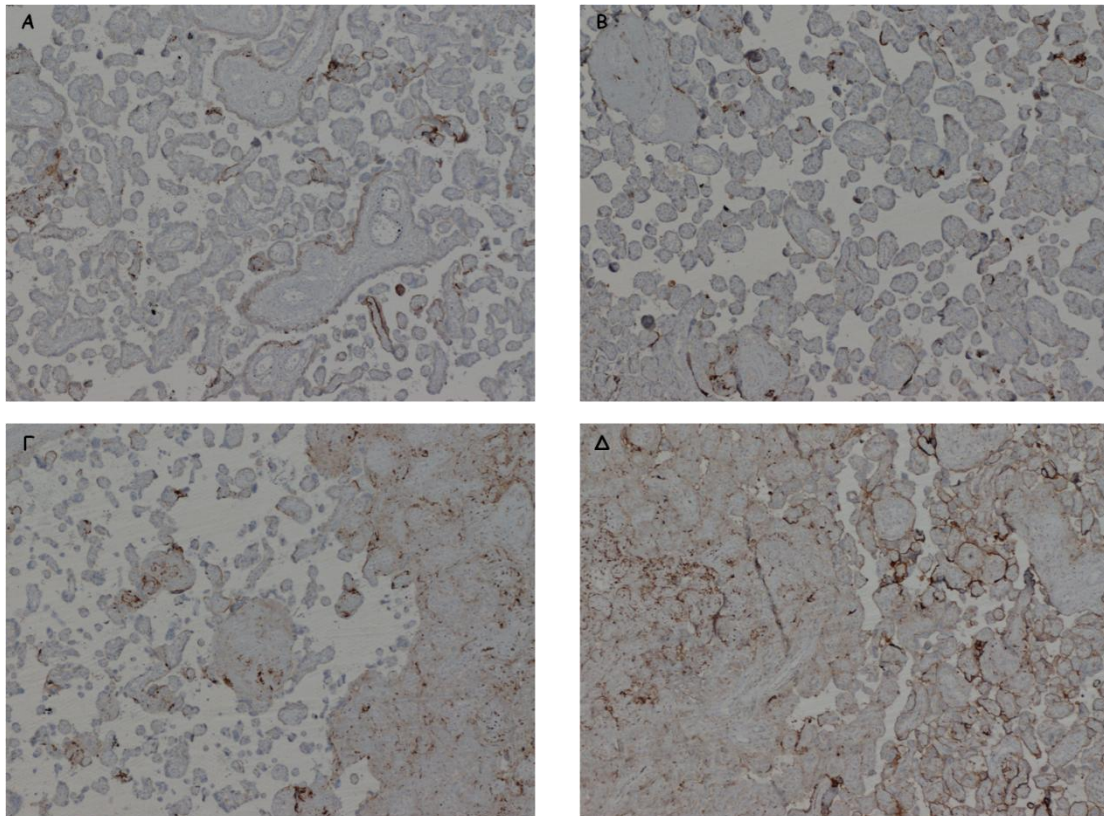
Η πρωτεΐνη της ANXA5 όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο του Western blotting ήταν ελαττωμένη σε 13/23 (57%) πλακούντες που προέρχονται από κυήσεις με προεκλαμψία, συγκριτικά με την έκφρασή της στους πλακούντες που προέρχονται από φυσιολογικές κυήσεις, με μέσο όρο επιπέδων έκφρασης το 68% της έκφρασης των φυσιολογικών δειγμάτων ($p = 0,018$). Περαιτέρω στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης της ANXA5 στα δείγματα της προεκλαμψίας είναι μειωμένη στις μη-καπνίστριες (12/23 δείγματα) σε σχέση με τις καπνίστριες (11/23 δείγματα) ($0,51 \pm 0,12$ έναντι $0,84 \pm 0,09$, $p = 0,019$). Επίσης εντοπίστηκε συσχέτιση της έκφρασης της ANXA5 με τη διάρκεια της κύησης καθώς και με το βάρος του νεογνού (όσο μικρότερη η διάρκεια κύησης και το βάρος νεογνού, τόσο λιγότερη και η πρωτεΐνη).

Τέλος η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ANXA5 ήταν θετική στη διάμεση εξωλάχνια τροφοβλάστη και στη μεσολάχνια τροφοβλάστη όλων των πλακούντων που εξετάστηκαν. Το μοτίβο της χρώσης ήταν ετερογενές με προτίμηση τους συγκυτιακούς κόμβους, όπου παρουσίαζε διάχυτη κυτταροπλασματική θετικότητα. Η χρώση ήταν περισσότερο εμφανής ως μία συνεχής γραμμή κατά μήκος του κορυφαίου τμήματος της περιλάχνιας συγκυτιακής κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή στο κυτταρόπλασμα μεμονωμένων τροφοβλαστικών κυττάρων (Εικόνα 1). Επίσης ανιχνεύθηκε περιπυρηνική εντόπιση του αντισώματος στην εξωλάχνια τροφοβλάστη. Η χρώση ήταν κοκκιώδης.



Εικόνα 1. Ανοσοϊστοχημική χρώση ANXA5 πιο έντονη στα συγκυτιακά κύτταρα του κορυφαίου τμήματος των λαχνών (x 400).

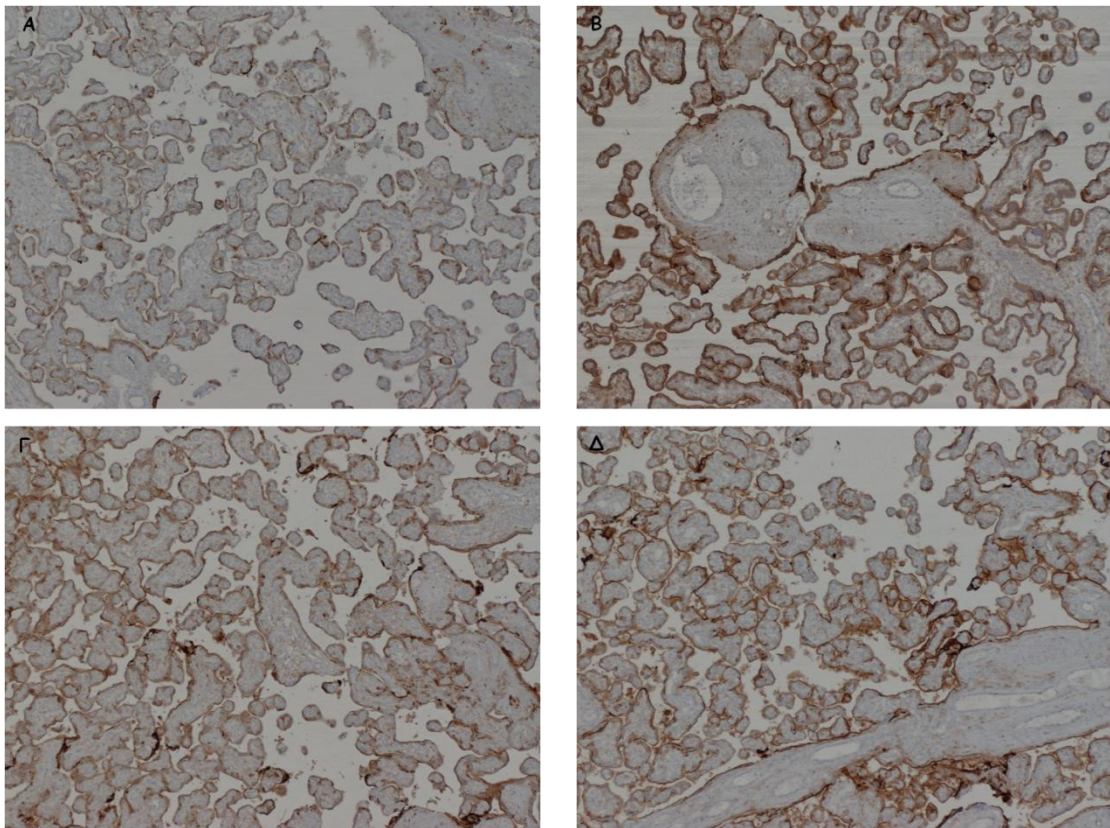
Κατά κανόνα, σε δείγματα φυσιολογικά και από προεκλαμψία, η χρώση ήταν εντονότερη σε ομάδες συγκυτιακών κόμβων ή συμφυόμενων λαχνών, όπως παρατηρούνται σε μειωμένη αιματική ροή ή περιοχές πρόσφατων εμφράκτων (Εικόνα 2). Επίσης, ομάδες εγκλωβισμένων τροφοβλαστικών κυττάρων σε παλαιότερα έμφρακτα εμφάνισαν θετικότητα.



Εικόνα 2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση ANXA5 σε προεκλαμπτικούς πλακούντες (x50). Α, Β: Μειωμένος δείκτης έντασης χρώσης (LI < 33%) και εστιακή θετικότητα Γ: Μειωμένη και εστιακή θετικότητα (αριστερά), έντονη θετικότητα των τροφοβλαστικών κυττάρων σε περιοχή εμφράκτου (δεξιά) Δ: Έμφρακτο (αριστερά) και περιοχές με στοιχεία μειωμένης αιματικής ροής (δεξιά)

Σύμφωνα με το δείκτη έντασης της χρώσης (LI = ποσοστό θετικότητας x ένταση χρώσης), τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε 3 κατηγορίες: αυτά με υψηλό LI (>66%), αυτά με μέτριο LI (33-66%) και αυτά με χαμηλό LI (<33%). Οι πλακούντες από εγκυμοσύνες με προεκλαμψία είχαν κυρίως χαμηλό δείκτη LI σε αντίθεση με τα φυσιολογικά δείγματα που είχαν υψηλό. Επιπρόσθετα, τα φυσιολογικά δείγματα είχαν την τάση να εμφανίζουν ένα μοτίβο διάχυτης χρώσης στην περιλάχνια συγκυτιοτροφοβλάστη (Εικόνα 3). Αντιθέτως, οι προεκλαμπτικοί πλακούντες έδειξαν μια πιο εστιακή χρώση σε

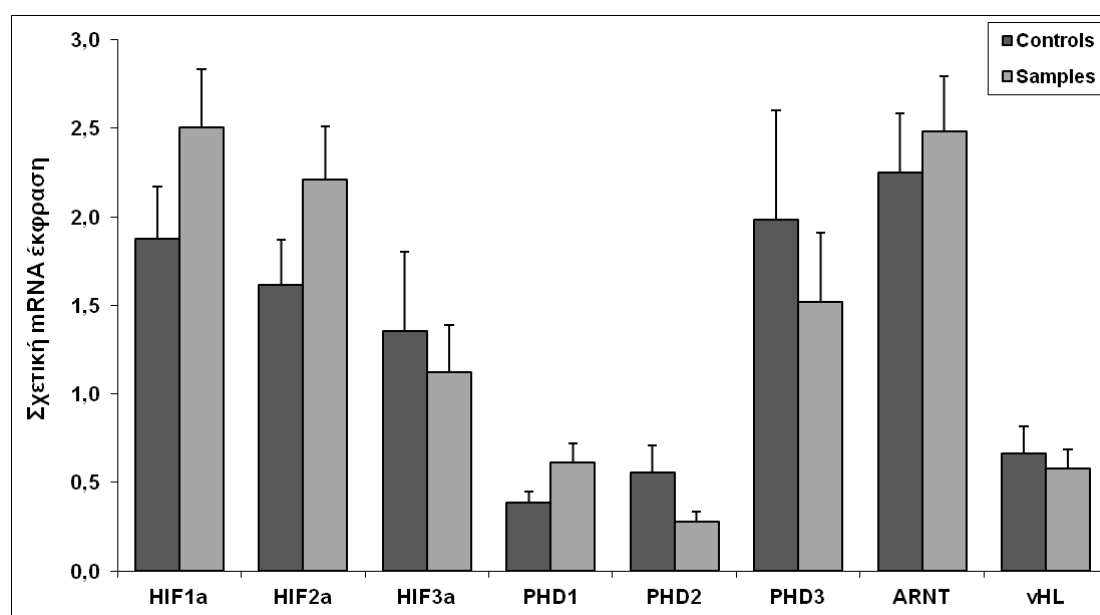
ομάδες συγκυτιακών κόμβων στα πλαίσια του φαινομένου Tenny-Parker (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση της ANXA5 με διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης (x50). Σε αντιδιαστολή με την εικόνα 2, όπου η έκφραση είναι σαφώς μειωμένη.

Τελικά αποτελέσματα

Στην ολοκλήρωση των πειραματικών διαδικασιών, αποδεκτά με βάση τις παραμέτρους για αποκλεισμό δειγμάτων όπως αναφέρθηκαν στη μεθοδολογία, αλλά και κάποιες τεχνικές δυσκολίες, ήταν τελικά 49 δείγματα από πλακούντες με υπολειπόμενη ανάπτυξη (ΕΥΑ) και 30 από πλακούντες φυσιολογικών κυήσεων. Στα δείγματα αυτά έγινε qRT-PCR για τα γονίδια HIF-1a, HIF-2a, HIF-3a, ARNT, PHD-1, PHD-2, PHD-3 και VHL. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Εικόνα 4), ενώ αναλυτικά απεικονίζονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 4. Στο γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση του mRNA του κάθε γονιδίου στα παθολογικά και στα φυσιολογικά δείγματα. Είναι φανερό ότι υπάρχει αύξηση της έκφρασης των HIF-1a και HIF-2a, καθώς και του PHD-1, ενώ σημαντική είναι η μείωση της έκφρασης των PHD-2 και PHD-3, καθώς και του HIF-3a σε μικρότερο βαθμό. Τα γονίδια ARNT και VHL δε φαίνεται να μεταβάλλουν σημαντικά την έκφρασή τους στο σύνολο των δειγμάτων.

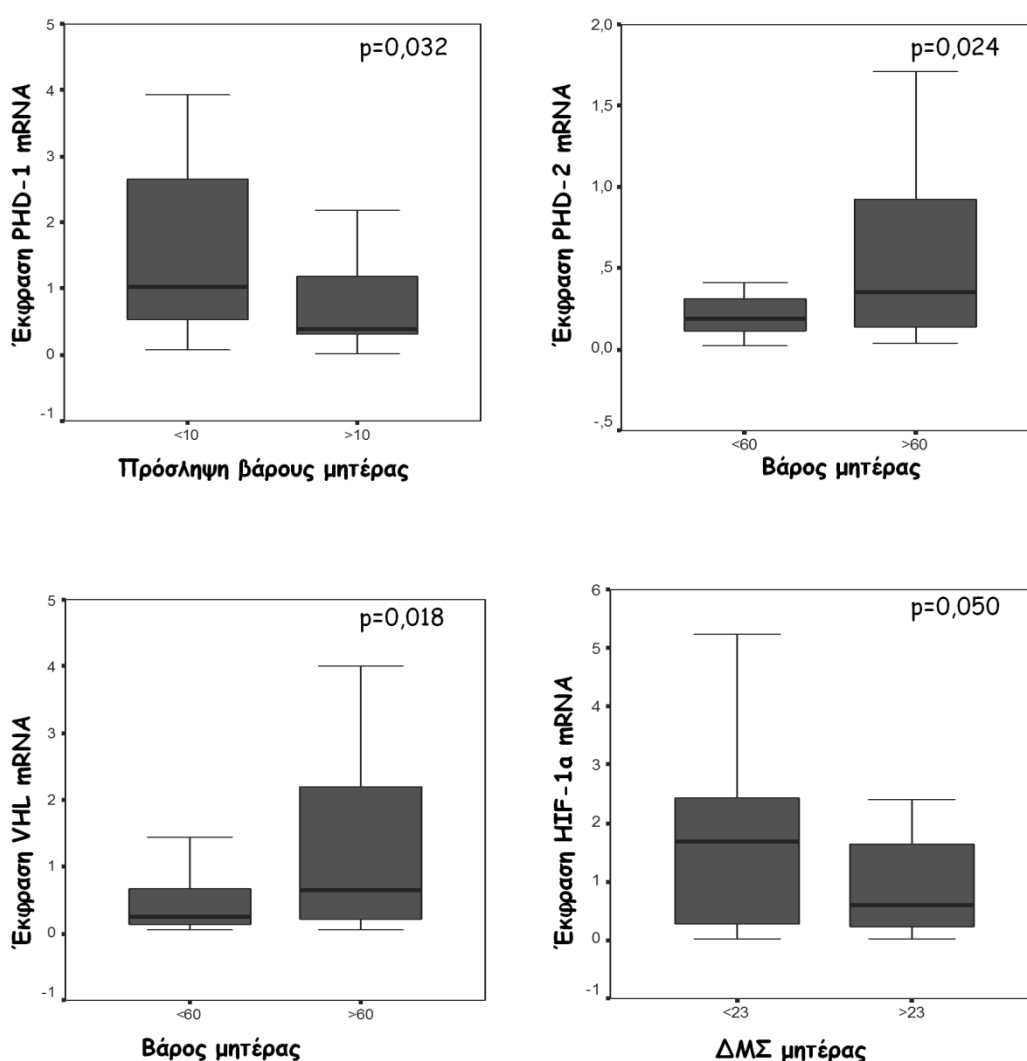
Samples/Controls (categories)								
No#	HIF1a	HIF2a	HIF3a	PHD1	PHD2	PHD3	ARNT	vHL
	S vs M	S vs M	S vs M	S vs M	S vs M	S vs M	S vs M	S vs M
S1	1	1	1	3	1	1	1	3
S2	2	3	1	1	2	1	2	1
S3	1	2	1	2	2	1	1	1
S4	1	1	1	1	1	2	1	1
S5	2	1	1	3	1	3	2	3
S6	2	3	1	3	1	3	3	3
S7	1	2	1	1	2	1	1	2
S8	1	1	1	1	1	1	1	1
S10	1	2	1	1	1	2	2	1
S11	1	2	1	1	1	2	1	1
S12	1	1	1	3	1	1	2	2
S19	1	2	1	1	2	1	2	2
S27	2	2	1	2	3	1	2	2
S28	2	2	1	3	1	1	2	2
S31	2	2	1	1	1	2	2	3
S33	2	1	1	2	1	1	2	1
S43	2	2	2	1	1	3	3	2
S44	2	1	1	1	1	2	2	2
S48	3	2	1	1	1	2	3	2
S52	3	2	1	1	1	1	2	1
S16	3	3	2	2	1	3	3	1
S17	3	3	3	3	1	2	3	1
S21	2	3	3	2	1	1	3	1
S22	2	2	1	1	1	1	2	1
S23	2	2	1	1	1	1	2	1
S24	3	3	2	1	1	2	2	1
S30	2	2	2	1	2	1	2	1
S35	3	2	2	2	2	1	1	2
S38	1	1	1	3	2	1	1	2
S47	3	3	1	1	1	1	3	1
S49	3	3	1	2	1	1	3	1
S53	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	2	2	1	1	2
42	1	1	1	3	2	1	1	3
68	3	2	2	3	2	1	2	2
69	1	1	1	3	2	1	1	3
74	2	2	1	2	1	1	2	1
78	1	2	1	2	2	1	1	2
79	1	1	1	3	2	1	1	2
81	1	1	1	3	3	1	1	3
88	1	1	1	3	1	1	1	2
93	3	3	3	2	1	2	3	1
98	2	2	2	1	1	2	2	1
103	2	2	3	1	1	1	2	1
104	3	2	3	2	1	3	2	1
105	3	3	2	2	1	1	3	1
111	2	2	3	1	1	1	2	1
112	2	3	3	2	1	1	2	1
113	3	3	2	2	1	1	2	1
115	3	3	2	2	1	3	2	1
↓	18	15	33	21	35	34	16	28
—	18	22	10	16	13	10	24	15
↑	14	13	7	13	2	6	10	7

Εικόνα 5. Αναλυτική απεικόνιση κάθε δείγματος (EVA), όπου καταδεικνύεται με κόκκινο φόντο η υποέκφραση, με μπλε η υπερέκφραση και με λευκό η σταθερή έκφραση σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των δειγμάτων ΕΥΑ έδειξε μερικές ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις που συνοψίζονται στον πίνακα:

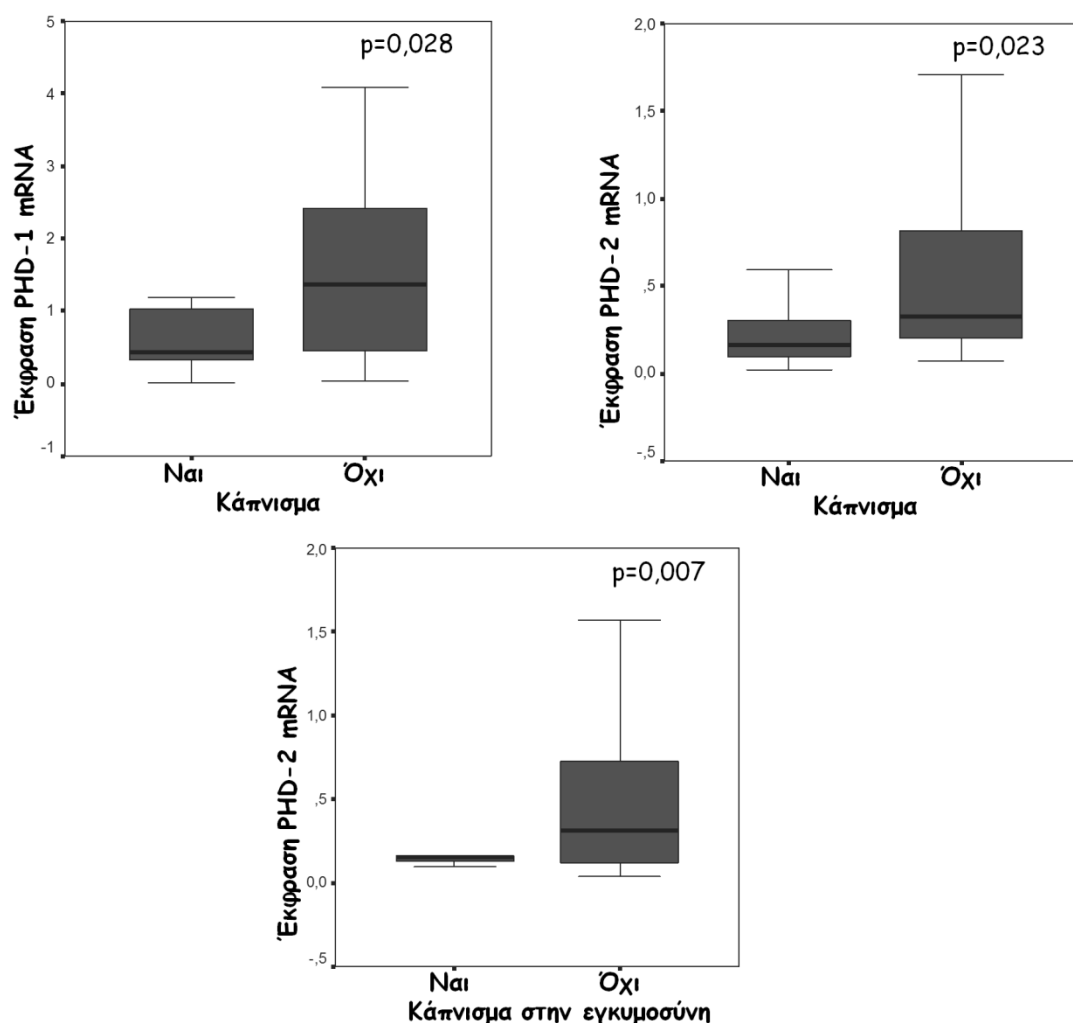
Κλινικό χαρακτηριστικό	Γονίδιο	1 ^η ομάδα (όριο τιμών)	2 ^η ομάδα (όριο τιμών)	p-value	Στατιστικό τεστ
Πρόσληψη βάρους μητέρας	PHD-1	1.95±0.47 (<i><10 Kg</i>)	1.18±0.42 (<i>>10 Kg</i>)	p=0.032	Mann-Whitney
Βάρος μητέρας	PHD-2	0.26±0.05 (<i><60 Kg</i>)	0.73±0.19 (<i>>60 Kg</i>)	p=0.024	T-test
	VHL	0.52±0.12 (<i><60 Kg</i>)	1.30±0.29 (<i>>60 Kg</i>)	p=0.018	T-test
Δείκτης Μάζας Σώματος	HIF-1a	1.68±0.29 (<i><23</i>)	0.95±0.22 (<i>>23</i>)	p=0.050	T-test
Κάπνισμα	PHD-1	1.11±0.40 (<i>Ναι</i>)	2.00±0.46 (<i>Όχι</i>)	p=0.028	Mann-Whitney
	PHD-2	0.34±0.11 (<i>Ναι</i>)	0.66±0.18 (<i>Όχι</i>)	p=0.023	Mann-Whitney
Ηλικία μητέρας	PHD-2	0.31±0.06 (<i><30 έτη</i>)	0.78±0.22 (<i>>30 έτη</i>)	p=0.045	T-test
Διάρκεια κύησης	HIF-1a	0.98±0.22 (<i><37 έβδ.</i>)	1.67±0.26 (<i>>37 έβδ.</i>)	p=0.044	Mann-Whitney
	HIF-2a	1.00±0.27 (<i><37 έβδ.</i>)	1.70±0.25 (<i>>37 έβδ.</i>)	p=0.009	Mann-Whitney
Παθολογικό Doppler OA	PHD-1	2.36±0.55 (<i>Ναι</i>)	1.07±0.34 (<i>Όχι</i>)	p=0.018	Mann-Whitney
	VHL	1.29±0.30 (<i>Ναι</i>)	0.69±0.19 (<i>Όχι</i>)	p=0.037	Mann-Whitney
Προεκλαμψία	HIF-1a	0.83±0.32 (<i>Ναι</i>)	1.56±0.22 (<i>Όχι</i>)	p=0.028	Mann-Whitney
	PHD3	0.25±0.12 (<i>Yes</i>)	1.19±0.34 (<i>No</i>)	p=0.015	T-test
	ARNT	0.65±0.25 (<i>Yes</i>)	1.39±0.17 (<i>No</i>)	p=0.005	Mann-Whitney

Αναλυτικά, ταξινομώντας τα ΕΥΑ δείγματα με κριτήριο την πρόσληψη βάρους της μητέρας άνω των 10 κιλών, φάνηκε ότι ο PHD-1 υποεκφράζεται ($1,18 \pm 0,42$ έναντι $1,95 \pm 0,47$, $p=0,032$, Mann-Whitney). Επίσης, ο PHD-2 και ο VHL εμφάνισαν μεγαλύτερη έκφραση στις γυναίκες εκείνες με βάρος πριν την εγκυμοσύνη άνω των 60 κιλών ($0,73 \pm 0,19$ έναντι $0,26 \pm 0,05$ με $p=0,024$ και $1,30 \pm 0,29$ έναντι $0,52 \pm 0,12$ με $p=0,018$, αντίστοιχα, T-test), ενώ ο HIF-1α είχε μεγαλύτερη έκφραση σε γυναίκες με ΔΜΣ μικρότερο από 23 ($1,68 \pm 0,29$ έναντι $0,95 \pm 0,22$, $p=0,050$, T-test) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων (PHD-1, PHD-2, VHL και HIF-1α) σε συσχέτιση με σωματομετρικές παραμέτρους της μητέρας (πρόσληψη βάρους, βάρος, ΔΜΣ).

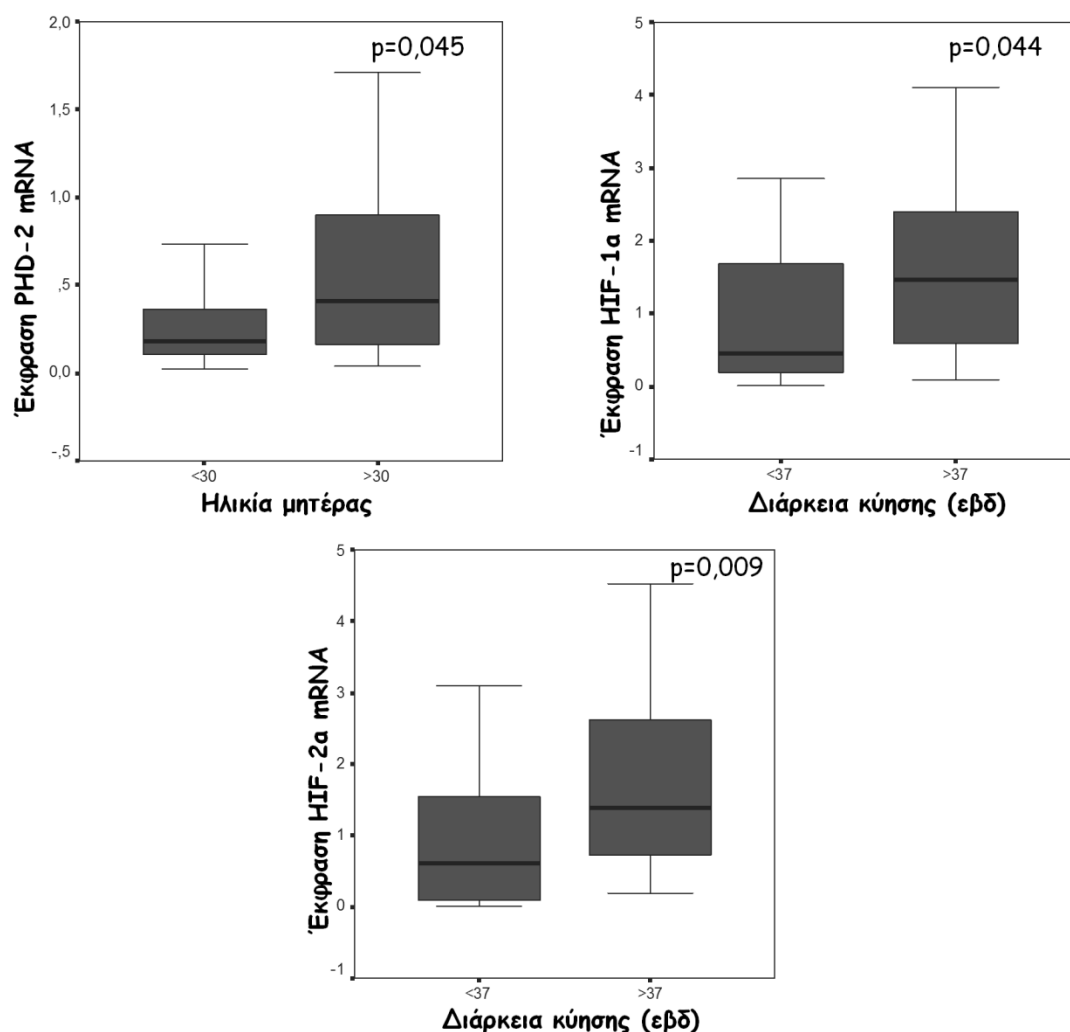
Το κάπνισμα ήταν ένας παράγοντας που οδήγησε σε υποέκφραση τα γονίδια PHD-1 και PHD-2 ($1,11 \pm 0,40$ έναντι $2,00 \pm 0,46$, $p=0,028$ και $0,34 \pm 0,11$ έναντι $0,66 \pm 0,18$, $p=0,023$, αντίστοιχα, Mann-Whitney). Ιδιαίτερο εύρημα ήταν η περισσότερο έντονη ελάττωση της έκφρασης του PHD-2 στις εγκύους εκείνες που κάπνιζαν και στη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε σχέση με εκείνες που το έκοψαν ($0,19 \pm 0,06$ έναντι $0,61 \pm 0,14$, $p=0,007$, T-test) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων PHD-1 και PHD-2 σε συσχέτιση με τις καπνιστικές συνήθειες των εγκύων.

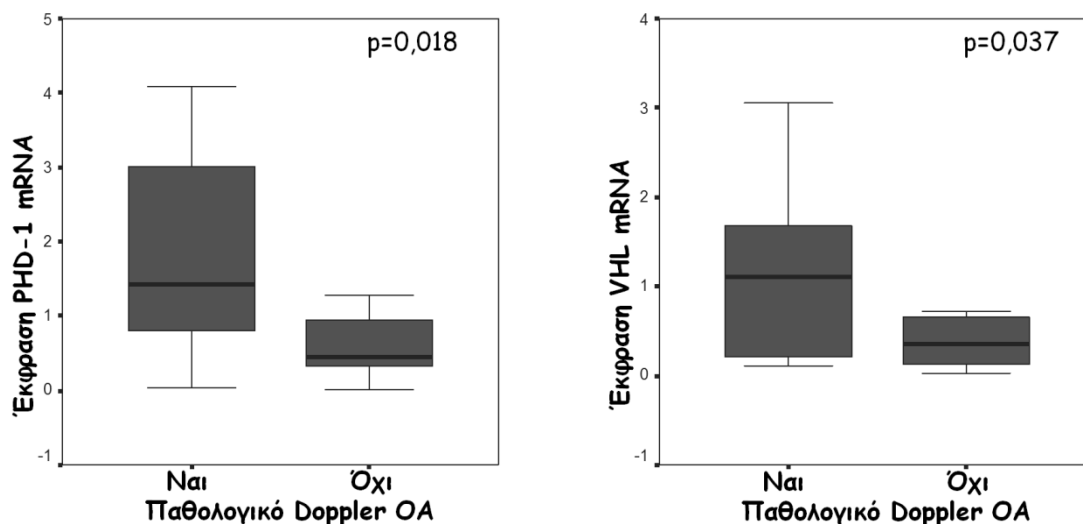
Το γονίδιο του PHD-2 παρουσίασε περισσότερο μειωμένη έκφραση στους πλακούντες από εγκύους μικρότερης ηλικίας, κάτω των 30 ετών, σε

σχέση με όσες είχαν συμπληρώσει τα 30 τους έτη ($0,31 \pm 0,06$ έναντι $0,78 \pm 0,22$, $p=0,045$, T-test). Ένα άλλο στατιστικό στοιχείο που προέκυψε από τις αναλύσεις ήταν ότι ο πρόωρος τοκετός (<37 εβδομάδων) προκαλεί ελάττωση στην έκφραση των γονιδίων HIF-1a και HIF-2a σε σχέση με τελειόμηνες (>37 εβδομάδων) εγκυμοσύνες ($0,98 \pm 0,22$ έναντι $1,67 \pm 0,26$, $p=0,044$ και $1,00 \pm 0,27$ έναντι $1,70 \pm 0,25$, $p=0,009$, αντίστοιχα, Mann-Whitney) (Εικόνα 8).



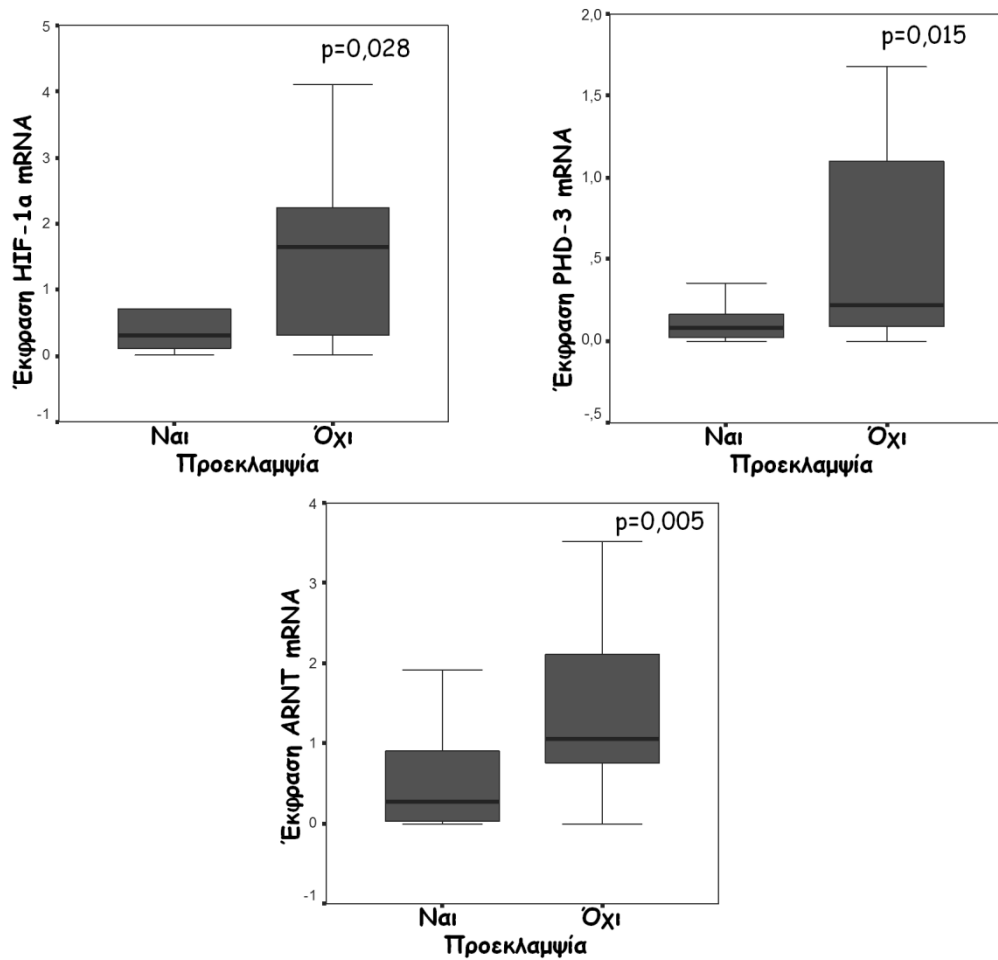
Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων PHD-2, HIF-1a και HIF-2a σε συσχέτιση με την ηλικία της εγκύου καθώς και με τη διάρκεια κύησης.

Αναφορικά με τις περιπτώσεις ΕΥΑ εκείνες που εμφάνισαν παθολογικό Doppler ομφαλικής αρτηρίας (ΟΑ), παρατηρήθηκε μία υπερέκφραση στα γονίδια PHD-1 και VHL ($2,36 \pm 0,55$ έναντι $1,07 \pm 0,34$, $p=0,018$ και $1,29 \pm 0,30$ έναντι $0,69 \pm 0,19$, $p=0,037$, αντίστοιχα, Mann-Whitney) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων PHD-1 και VHL σε συσχέτιση με το Doppler της ομφαλικής αρτηρίας.

Τέλος, στατιστικά σημαντικά επιμέρους αποτελέσματα προέκυψαν και σε εκείνες τις εγκυμοσύνες που εμφάνισαν προεκλαμψία σε συνδυασμό με την εμβρυική υπολειπόμενη ανάπτυξη, με υποέκφραση του γονιδίου HIF-1α ($0,83 \pm 0,32$ έναντι $1,56 \pm 0,22$, $p=0,028$, Mann-Whitney), του γονιδίου PHD-3 ($0,25 \pm 0,12$ έναντι $1,19 \pm 0,34$, $p=0,015$, T-test) και του γονιδίου ARNT ($0,65 \pm 0,25$ έναντι $1,39 \pm 0,17$, $p=0,005$, Mann-Whitney) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης των γονιδίων HIF-1α, PHD-3 και ARNT σε συσχέτιση με τη συνύπαρξη προεκλαμψίας στις εγκύους με εμβρυική υπολειπόμενη ανάπτυξη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αννεξίνη A5 (ANXA5) σε εγκυμοσύνες με ΕΥΑ και Προεκλαμψία

Είναι γνωστός από τη βιβλιογραφία ο ρόλος της ANXA5 στη Θρομβοφιλία και στην προστασία που ασκεί έναντι της δημιουργίας Θρόμβων. Στα πειράματα που έγιναν η μείωση της έκφρασης της ANXA5 ήταν καθολική, όπως καταδείχτηκε από τη γονιδιακή έκφραση μέσω RT-PCR, την ποσότητα της πρωτεΐνης μέσω Western blotting και την ανοσοϊστοχημική χρώση, στα δείγματα με ΕΥΑ και προεκλαμψία σε σχέση με τα φυσιολογικά. Αναλυτικότερα αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλη τη μείωση στην ανοσοθετικότητα του αντισώματος στα δείγματα από ΕΥΑ σε σχέση με τα φυσιολογικά στις τομές παραφίνης, στο σύνολο των δειγμάτων παρατηρήθηκε μία αύξηση της πρωτεΐνης σε θέσεις που ιστολογικά είχαν ευρήματα συμβατά με μειωμένη αιματική ροή. Αυτό φανερώνει ότι η ANXA5 στρατολογείται από τα κύτταρα ως αντίδραση σε καταστάσεις υποξίας και ισχαιμίας ώστε να επιτύχει τον προστατευτικό της ρόλο.

Συμπερασματικά η μειωμένη έκφραση της αννεξίνης A5 που μπορεί να είναι αίτιο, αλλά και αποτέλεσμα άλλων προϋπαρχόντων διαταραχών σε σηματοδοτικά μονοπάτια σίγουρα μειώνει με τη σειρά της τον προστατευτικό της ρόλο έναντι Θρομβωτικών φαινομένων. Η αυξημένη εμφάνιση Θρόμβων στους πλακούντες εγκύων γυναικών με προεκλαμψία που αποτελεί συχνό εύρημα της πάθησης, είναι μία εκδήλωση της έλλειψης αυτής της προστασίας. Η ύπαρξη ωστόσο δειγμάτων και με φυσιολογική έκφραση της ANXA5 ίσως εξηγείται από το γεγονός ότι οι γυναίκες αυτές ήταν στην πλειοψηφία τους καπνίστριες, γεγονός που δικαιολογεί ύπαρξη Θρόμβων και υπολειπόμενη ανάπτυξη από μόνο του. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται οι οποίες: α) θα επιβεβαιώσουν τα παραπάνω ευρήματα β) θα δείξουν εάν η διαταραχή αυτή αποτελεί πρωτοπαθή αιτία Θρομβώσεων στον πλακούντα ή επιμέρους

εκδήλωση άλλων υποκείμενων μηχανισμών γ) Θα διερευνήσουν εάν ο προσδιορισμός των επιπέδων της αννεξίνης A5 στη μητρική κυκλοφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προβλεπτικός δείκτης εμφάνισης της νόσου ή της βαρύτητάς της ή ακόμη ως δείκτης πρώιμης διάγνωσης.

Το μονοπάτι των παραγόντων που επάγονται από την υποξία (HIF) σε εγκυμοσύνες με ΕΥΑ και/ή Προεκλαμψία

Οι παράγοντες HIF-1a και HIF-2a απαντώνται στον πλακούντα από τα αρχικά στάδια της κύησης, με τον HIF-2a να παρουσιάζει αύξηση της έκφρασής του κατά την εξέλιξη της εγκυμοσύνης. Σε πρωτεϊνικό όμως επίπεδο, όσο προχωράει η εγκυμοσύνη ανιχνεύονται όλο και λιγότερο. Η εντόπισή τους είναι στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων κυρίως της συγκυτιοτροφοβλάστης, της χοριακής τροφοβλάστης, ενώ εντοπίζονται και στο εμβρυοπλακουντιακό αγγειακό δίκτυο [114].

Οι παράγοντες HIF-1a και HIF-2a έχουν μελετηθεί σε περιορισμένο επίπεδο όσον αφορά τη σχέση τους με παθολογίες της εγκυμοσύνης, όπως η ΕΥΑ και η προεκλαμψία. Η έκφραση τους έχει καταγραφεί ότι δε μεταβάλλεται σημαντικά στην ΕΥΑ, αν και ανιχνεύεται αυξημένη ποσότητα πρωτεΐνης, ειδικά για τον HIF-2a [115], προφανώς ως αποτέλεσμα μετά-μεταγραφικών ρυθμιστικών μηχανισμών [116], δηλαδή σταθεροποίησής τους με αποφυγή υδροξυλίωσης από τους PHD. Επίσης σε πειράματα που έγιναν σε επίμυες και υπερεκφράστηκε τεχνητά με μοριακές τεχνικές ο HIF-1a, τα πειραματόζωα εμφάνισαν ΕΥΑ και προεκλαμψία [117,118], γεγονός που δείχνει ότι το μονοπάτι των HIF μπορεί να αποβεί καταστροφικό για το εμβρυοπλακουντιακό περιβάλλον αν δρα διαρκώς, ανεξάρτητα από υποξικά ερεθίσματα.

Στην προεκλαμψία, σε αντίθεση με την ΕΥΑ, οι παράγοντες HIF-1α και HIF-2α υπερεκφράζονται [119-122]. Φαίνεται μάλιστα αύξηση όχι μόνο της έκφρασης των γονιδίων των παραγόντων αυτών, αλλά και αυξημένη ανίχνευση της ποσότητας πρωτεΐνης τους [122]. Πάντως τα πειραματικά δεδομένα αποδίδουν την αύξηση της μεταγραφικής δράσης των παραγόντων όχι στις αλλαγές έκφρασης των γονιδίων τους, αλλά σε διαταραχές της πρωτεασωμικής τους αποδόμησης [123], φαινόμενο περισσότερο εμφανές στην προεκλαμψία και όχι στην ΕΥΑ [122].

Αναφορικά με τους Prolyl Hydroxylation Domains (PHD) τα υπάρχοντα δεδομένα από πειραματόζωα δείχνουν ότι έμβρυα με knock out γονιδιακή ρύθμιση του PHD-2 (PHD-2^{-/-}) δεν επιβιώνουν, ενώ PHD-1^{-/-} και PHD-3^{-/-} φαίνονται να έχουν φυσιολογικό φαινότυπο [124]. Παράλληλα όλα τα knock out πειραματόζωα εμφάνισαν αύξηση πρωτεϊνικών επιπέδων όλων των HIF-α υπομονάδων. Επίσης αναφέρεται ότι ο PHD-3 έχει άμεση απόκριση στην υποξία, ώστε να μπορέσει να αναστείλει τον HIF-1α αμέσως μετά την επαναοξυγόνωση [123]

Ο VHL αποτελεί γνωστό παράγοντα λόγω του συνδρόμου που προκαλούν οι μεταλλάξεις του, αλλά και της συμμετοχής του στην ογκολογία. Πειραματόζωα με VHL^{-/-} δεν επιβιώνουν λόγω αγενεσίας του πλακούντα [125]. Επίσης με *in vitro* πειράματα σε καταστάσεις υποξίας, αποδεικνύεται η υπερέκφραση του γονιδίου, αλλά και η αυξημένη ανίχνευση πρωτεΐνης, όπως συμβαίνει και για τον παράγοντα HIF-2α [126]. Τέλος, σε μελέτες που έγιναν σχετικά με τον VHL σε προεκλαμπτικούς πλακούντες δε βρέθηκε διαφορά ούτε σε έκφραση ούτε σε πρωτεΐνη, σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στους HIF, ενώ ακόμα κι αν υπήρξε διαφορετική έκφρασή του, νωρίτερα στην εγκυμοσύνη λόγω υποξικών συνθηκών, αυτές εξισορροπούνται με το χρόνο και δε γίνονται αντιληπτές σε τελειόμηνους πλακούντες [127].

Στα παθολογικά δείγματα που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο ερευνητικό πρωτόκολλο, τα συνολικά ευρήματα συνοψίζονται σε μία ελαφρά αύξηση στην έκφραση των HIF-1α και HIF-2α, σε μία σημαντική ελάττωση στην έκφραση των PHD-2 και PHD-3, ενώ ηπιότερες αλλαγές και με αντίθετη έκφραση σε σχέση με τους συγγενικούς τους παράγοντες εμφάνισαν ο HIF-3α και ο PHD-1. Ο ARNT και ο VHL δεν παρουσίασαν ιδιαίτερα σημαντικές αλλαγές στο σύνολο των δειγμάτων.

Αναλυτικά, ο HIF-1α και ο HIF-2α παρουσιάζονται με αυξημένη έκφραση, γεγονός που αν και έρχεται σε αντίθεση με άλλες μελέτες, αποτελεί λογικό και αναμενόμενο αποτέλεσμα. Όπως αναλύθηκε στα κεφάλαια σχετικά με την επιλογή των δειγμάτων, οι πλακούντες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από εγκυμοσύνες με ασύμμετρη εμβρυική υπολειπόμενη ανάπτυξη, το αίτιο της οποίας ήταν ιδιοπαθές, δηλαδή δε συνυπήρχε συγκεκριμένη παθολογική οντότητα που να τη δικαιολογεί. Επίσης, όπως περιγράφηκε νωρίτερα, στην ιδιοπαθή ΕΥΑ κοινό παθογνωμονικό χαρακτηριστικό αποτελεί η προβληματική πλακουντοποίηση, γεγονός που σχετίζεται με μειωμένη παροχή θρεπτικών συστατικών και υποξικά φαινόμενα. Επομένως, η αυξημένη έκφραση παραγόντων που αποτελούν απάντηση στην υποξία, αλλά και μπορούν να ρυθμίσουν το μεταβολισμό, είναι στα πλαίσια της προσπάθειας του πλακούντα να ανταποκριθεί με μηχανισμούς αντιρρόπησης στην υποξία.

Η ρύθμιση όμως της λειτουργίας των HIF, δεν πραγματοποιείται μόνο μεταγραφικά, αλλά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, με σταθεροποίησή των HIF-α υπομονάδων και αναστολή της αποδόμησής τους [123]. Έτσι ενώ στους HIF, η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων τους κυμάνθηκε σε ήπια επίπεδα, οι παράγοντες PHD-2 και PHD-3 παρουσίασαν σημαντική μείωση στην έκφραση των γονιδίων τους. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται αύξηση του PHD-3 στην

προεκλαμψία [122], ενώ παράλληλα αναφέρεται επίσης διαταραχή στο μηχανισμό πρωτεασωμικής αποδόμησης των HIF [128]. Τα ευρήματά μας είναι διαφορετικά και πιστεύουμε ότι με τη μείωση των PHD, πιθανότατα, οι παράγοντες HIF επάγονται ακόμα περισσότερο, αφού σταθεροποιούνται οι υπομονάδες τους, χωρίς να υποστούν υδροξυλίωση από τους PHD, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο την πρωτεασωμική τους αποδόμηση που γίνεται με τη συνδρομή του VHL, αλλά μόνο στην υδροξυλιωμένη μορφή των HIF-α υπομονάδων. Παράδοξο εύρημα σε σχέση με τη βιβλιογραφία, αποτελεί επίσης ότι στα δείγματα που είχαν πέρα από ΕΥΑ και προεκλαμψία, ο HIF-1α και ο PHD-3 εμφάνισαν μειωμένη έκφραση σε σχέση με τα δείγματα που είχαν μόνο ΕΥΑ. Ίσως η προεκλαμψία που συνυπάρχει με την ΕΥΑ, αποτελεί διαφορετική παθοφυσιολογική οντότητα από την προεκλαμψία που δεν οδηγεί σε επιπτώσεις στην εμβρυική ανάπτυξη. Αναλύοντας περαιτέρω την άποψη αυτή, γίνεται η υπόθεση ότι στην προεκλαμψία λόγω των προβλημάτων αιμάτωσης και οξυγόνωσης ο πλακούντας επάγει κάποιους παράγοντες. Η προσπάθεια αυτή του πλακούντα, με την αλλαγή στο εκφραστικό του μοντέλο κρίνεται επιτυχής ή όχι, από το αποτέλεσμα που έχει στο έμβρυο, δηλαδή αν αποτρέπει την καθυστέρηση της ανάπτυξης. Προφανώς, πέρα από πολλές άλλες παραμέτρους, η αποτυχία με επακόλουθο την ΕΥΑ μπορεί να συνεπάγεται και μερική μόνο επαγωγή αυτών των παραγόντων.

Ο PHD-1 αποτελεί ένα γρίφο αναφορικά με τη συμπεριφορά του γονιδίου του. Συνολικά υπερεκφράζεται, ενώ δείχνει μικρότερη υπερέκφραση στις περιπτώσεις εκείνες όπου η πρόσληψη βάρους της μητέρας ήταν άνω των 10 κιλών. Αυτή η μείωση στην υπερέκφραση του PHD-1 υπάρχει επίσης στις καπνίστριες μητέρες, αλλά και σε όσες δεν εμφάνισαν παθολογικό Doppler OA. Είναι δύσκολο να ερμηνευτούν τα αποτελέσματα αυτά, πάντως ειδικά στην περίπτωση του καπνίσματος είναι γνωστό το αποτέλεσμα

απορρύθμισης που έχει σε διάφορους παράγοντες που εκφράζονται από τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης [129]. Το γεγονός πάντως ότι φαίνεται ότι ο PHD-1 δεν ακολουθεί τους PHD-2 και PHD-3 μπορεί να ερμηνεύεται ως κάποιο μονοπάτι παλίνδρομης ανάδρασης, κάτι που φαίνεται να ισχύει και για τον HIF-3 σε σχέση με τους HIF-1 και HIF-2.

Οι παράγοντες HIF-3α, ARNT και VHL ήταν αυτοί με τη μικρότερη διακύμανση στην έκφραση στα παθολογικά ΕΥΑ δείγματα. Ο ARNT είναι γνωστό ότι εκφράζεται σταθερά [79,130], επομένως δεν αναμένονταν ιδιαίτερες αλλαγές στην έκφρασή του. Μία υποέκφραση που ανιχνεύτηκε στα δείγματα που συνυπήρχε προεκλαμψία, πιθανώς δικαιολογείται από το γεγονός του κοινού εκφραστικού προφίλ λόγω παρόμοιας επαγωγής με τις HIF-α υπομονάδες. Για τον HIF-3α τα δεδομένα είναι λιγοστά και αν και τα αποτελέσματα είναι αντίθετα από τους HIF-2α και HIF-1α, θεωρούμε ότι οι μεταβολές στην έκφρασή του είναι ήπιες και πιθανόν μη αξιολογήσιμες. Πάντως, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι πιθανό να ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στην άνοδο των HIF-1α και HIF-2α. Όσο για τον VHL, οι μεταβολές του γίνονται αντιληπτές σε πρωιμότερα στάδια της εγκυμοσύνης, οπότε και τα υποξικά ερεθίσματα είναι πολύ εντονότερα. Επίσης, φαίνεται ότι η ρύθμιση των HIF-α υπομονάδων σχετικά με το αν θα σταθεροποιηθούν ή αν θα υδροξυλιωθούν προς πρωτεασωμική αποδόμηση δεν εξαρτάται από την ύπαρξη ή όχι του VHL [127]. Πάντως στις εγκυμοσύνες εκείνες που το Doppler της ΟΑ ήταν παθολογικό, ο VHL εμφάνισε μία υπερέκφραση, γεγονός που υποδηλώνει τη σημαντικότερη υποξία στη διάρκεια του χρόνου που υπόκεινται οι συγκεκριμένοι πλακούντες.

Συνολικά μπορούμε να πούμε ότι το αυξημένο υποξικό στρες που επιδρά πάνω στους πλακούντες από περιπτώσεις ΕΥΑ [131] και προεκλαμψίας [128,132,133], έχει σημαντικές επιδράσεις στη δραστηριότητα

πρωτεασωμικής αποδόμησης, αλλά και στην ίδια την έκφραση των HIF. Δηλαδή, η υποέκφραση των PHD-2 και PHD-3, καθώς και η ήπια υπερέκφραση των HIF-1α και HIF-2α που παρατηρήθηκε στα παθολογικά δείγματα, αποτελούν την απάντηση των κυττάρων του πλακούντα στο υποξικό ερέθισμα με σκοπό την επαγωγή του μεταγραφικού ρόλου των HIF. Αν και η πρωτεϊνική επιβεβαίωση δεν έχει ολοκληρωθεί προς το παρόν, είναι φανερό ότι το μονοπάτι των παραγόντων που σχετίζονται με την υποξία, παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές σε επίπεδο έκφρασης των γονιδίων του στις περιπτώσεις με ενδομήτρια εμβρυική υπολειπόμενη ανάπτυξη.

Σε μία πιο αναλυτική ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται αντιληπτό ότι ο PHD-2 υποεκφράζεται περισσότερο στις περιπτώσεις εκείνες όπου το βάρος μητέρας είναι μικρότερο από 60 κιλά και σε εκείνες με πιο χαμηλό Δείκτη Μάζας Σώματος. Επομένως οι μητέρες με καλύτερο προφίλ σωματομετρικών παραμέτρων μείωσαν περισσότερο τον PHD-2, κάτι που μπορεί να υποδηλώνει ότι ήταν σε καλύτερη θέση ο οργανισμός τους να επάγει σε μεγαλύτερο βαθμό το μηχανισμό αντιρρόπησης της υποξίας. Επίσης σημαντικότερη μείωση της έκφρασης του PHD-2 παρατηρήθηκε στις καπνίστριες και ειδικά σε εκείνες που κάπνιζαν και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Δηλαδή όταν υπήρχε παράγοντας που επιτείνει την υποξία, όπως το κάπνισμα, ο PHD-2 υποεκφράζεται περισσότερο για να αντισταθμίσει την υποξία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βαρύτητα της υπολειπόμενης ανάπτυξης φαίνεται ότι σχετίζεται με την ικανότητα προσαρμογής στην υποξία, εμφανίζοντας διακυμάνσεις στις περιπτώσεις ΕΥΑ με διαφορετικό προφίλ, αλλά και διαφορετικό αίτιο [134]. Μία τέτοια προσέγγιση έχει ήδη προταθεί για τις περιπτώσεις ΕΥΑ που συνδυάζονται με προεκλαμψία [63]. Είναι αποδεκτό ότι προεκλαμψία και ΕΥΑ μοιράζονται κάποια κοινά στοιχεία παθοφυσιολογίας, αν και τα ευρήματα κάποιες φορές είναι αμφισβητήσιμα [135,136]. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η εμφάνιση ΕΥΑ μαζί με προεκλαμψία αντανακλά την εμβρυική απάντηση της μειωμένης διάθεσης θρεπτικών συστατικών από τον πλακούντα που δεν είναι επαρκής να ανταπεξέρθει στο στρες της υποθρεψίας. Αντίθετα, η ΕΥΑ χωρίς προεκλαμψία συμβαίνει χωρίς την εμβρυική αυτή προσπάθεια αντιρρόπησης [63,136,137].

Το συγκεκριμένο ερευνητικό πρωτόκολλο τολμά να προτείνει ότι ένα αντίστοιχο μοντέλο μπορεί να προταθεί χωρίς την ανάγκη κλινικής εκδήλωσης προεκλαμψίας. Έτσι, μπορεί να εισαχθεί η υπόθεση ότι έμβρυα με ηπιότερη εικόνα υπολειπόμενης ανάπτυξης, όπως προκύπτει από τις διάφορες διαθέσιμες κλινικές και σωματομετρικές παραμέτρους που καταγράφηκαν για μητέρες και έμβρυα, είναι σε θέση να παράγουν ένα σήμα για επαγωγή αντιρροπιστικών παραγόντων, πυροδοτούμενο από την υπολειπόμενη θρέψη που παρέχει ο πλακούντας και προφανώς την υποξία. Αντίθετα τα βαρύτερης πρόγνωσης και εικόνας έμβρυα με στασιμότητα στην ανάπτυξη, αδυνατούν να παράγουν ένα αντίστοιχο σήμα και για αυτό το λόγο δεν ανιχνεύονται ή ανιχνεύονται σε μικρότερο βαθμό αντίστοιχες αλλαγές στην έκφραση των αντιρροπιστικών παραγόντων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

11. Lee, P.A., et al., International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics*, 2003. 111(6 Pt 1): p. 1253-61.
12. Seeds, J.W. and T. Peng, Impaired growth and risk of fetal death: is the tenth percentile the appropriate standard? *Am J Obstet Gynecol*, 1998. 178(4): p. 658-69.
13. Resnik, R., Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol*, 2002. 99(3): p. 490-6.
14. Villar, J. and J.M. Belizan, The timing factor in the pathophysiology of the intrauterine growth retardation syndrome. *Obstet Gynecol Surv*, 1982. 37(8): p. 499-506.
15. Lockwood, C.J. and S. Weiner, Assessment of fetal growth. *Clin Perinatol*, 1986. 13(1): p. 3-35.
16. Bauer, R., et al., Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003. 110 Suppl 1: p. S40-9.
17. Hindmarsh, P.C., et al., Intrauterine growth and its relationship to size and shape at birth. *Pediatr Res*, 2002. 52(2): p. 263-8.
18. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: Implications for the pathogenesis of intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1-7.
19. Hamilton, B.E., J.A. Martin, and P.D. Sutton, Births: preliminary data for 2003. *Natl Vital Stat Rep*, 2004. 53(9): p. 1-17.
20. Jarvis S, Glinianaia S, Torrioli M, et. al. Cerebral palsy and intrauterine growth in single births: European collaborative study. *Lancet* 2003;362:1106-11.

21. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 1998;95:115-28.
22. Murphy, V.E., et al., Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev*, 2006. 27(2): p. 141-69.
23. Sacks, D.A., Determinants of fetal growth. *Curr Diab Rep*, 2004. 4(4): p. 281-7.
24. Kleijer, M.E., G.A. Dekker, and A.R. Heard, Risk factors for intrauterine growth restriction in a socio-economically disadvantaged region. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2005. 18(1): p. 23-30.
25. Lang, J.M., A. Cohen, and E. Lieberman, Risk factors for small-for-gestational-age birth in a preterm population. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. 166(5): p. 1374-8.
26. Alexander, G.R., et al., Birth outcomes of Asian-Indian-Americans. *Int J Gynaecol Obstet*, 2007. 97(3): p. 215-20.
27. Thompson, J.M., et al., Risk factors for small-for-gestational-age babies: The Auckland Birthweight Collaborative Study. *J Paediatr Child Health*, 2001. 37(4): p. 369-75.
28. Raum, E., et al., The impact of maternal education on intrauterine growth: a comparison of former West and East Germany. *Int J Epidemiol*, 2001. 30(1): p. 81-7.
29. Thame, M., et al., Fetal growth is directly related to maternal anthropometry and placental volume. *Eur J Clin Nutr*, 2004. 58(6): p. 894-900.
30. Hackman, E., et al., Maternal birth weight and subsequent pregnancy outcome. *JAMA*, 1983. 250(15): p. 2016-9.

31. Stein, A.D., et al., Intrauterine famine exposure and body proportions at birth: the Dutch Hunger Winter. *Int J Epidemiol*, 2004. 33(4): p. 831-6.
32. Mitchell, E.A., et al., Maternal nutritional risk factors for small for gestational age babies in a developed country: a case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004. 89(5): p. F431-5.
33. Cheng, C.J., et al., Body mass index change between pregnancies and small for gestational age births. *Obstet Gynecol*, 2004. 104(2): p. 286-92.
34. Dejmek, J., et al., The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth. *Environ Health Perspect*, 2002. 110(6): p. 601-6.
35. Kallen, K., Maternal smoking during pregnancy and infant head circumference at birth. *Early Hum Dev*, 2000. 58(3): p. 197-204.
36. Verspyck, E., et al., Thrombophilia and fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004. 113(1): p. 36-40.
37. Garite, T.J., et al., Twins and triplets: the effect of plurality and growth on neonatal outcome compared with singleton infants. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 191(3): p. 700-7.
38. Chauhan, S.P., et al., Detecting fetal growth restriction or discordant growth in twin gestations stratified by placental chorionicity. *J Reprod Med*, 2004. 49(4): p. 279-84.
39. Snijders, R.J., et al., Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*, 1993. 168(2): p. 547-55.
40. Hohlfeld, P., et al., Fetal toxoplasmosis: ultrasonographic signs. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1991. 1(4): p. 241-4.

41. Buchheit, J., et al., Congenital cytomegalovirus disease in the Louisville area: a significant public health problem. *J Ky Med Assoc*, 1994. 92(10): p. 411-5.
42. Brodsky, D. and H. Christou, Current concepts in intrauterine growth restriction. *J Intensive Care Med*, 2004. 19(6): p. 307-19.
43. Soothill, P.W., et al., Prediction of morbidity in small and normally grown fetuses by fetal heart rate variability, biophysical profile score and umbilical artery Doppler studies. *Br J Obstet Gynaecol*, 1993. 100(8): p. 742-5.
44. Baker, J., et al., Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 1993. 75(1): p. 73-82.
45. Gilbert, W.M., A.L. Young, and B. Danielsen, Pregnancy outcomes in women with chronic hypertension: a population-based study. *J Reprod Med*, 2007. 52(11): p. 1046-51.
46. Shepard, M.J., et al., An evaluation of two equations for predicting fetal weight by ultrasound. *Am J Obstet Gynecol*, 1982. 142(1): p. 47-54.
47. Hadlock, F.P., et al., Sonographic estimation of fetal weight. The value of femur length in addition to head and abdomen measurements. *Radiology*, 1984. 150(2): p. 535-40.
48. Cruz-Martinez, R. and F. Figueras, The role of Doppler and placental screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2009. 23(6): p. 845-55.
49. Westergaard, H.B., et al., A critical appraisal of the use of umbilical artery Doppler ultrasound in high-risk pregnancies: use of meta-analyses in evidence-based obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2001. 17(6): p. 466-76.

50. Lingman, G., J. Laurin, and K. Marsal, Circulatory changes in fetuses with imminent asphyxia. *Biol Neonate*, 1986. 49(2): p. 66-73.
51. Rizzo, G., et al., Umbilical vein pulsations and acid-base status at cordocentesis in growth-retarded fetuses with absent end-diastolic velocity in umbilical artery. *Biol Neonate*, 1995. 68(3): p. 163-8.
52. Harvey, D., et al., Abilities of children who were small-for-gestational-age babies. *Pediatrics*, 1982. 69(3): p. 296-300.
53. Barker, D.J. and C. Osmond, Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, 1986. 1(8489): p. 1077-81.
54. Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2003; 102:181-192
55. Davey DA, MacGillivray I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:892-898
56. Suzanne Baumwell, S. Ananth Karumanchi. Pre-Eclampsia: Clinical Manifestations and Molecular Mechanisms. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c72-c81
57. Μ Τζιβράς, Δ. Κουρτέσας. Ηπατικά νοσήματα ειδικά της κύησης 2007. Εκδόσεις "Βαγιονάκη"
58. Benirschke, Gersell DJ, Kraus FT, Diseases of the placenta. In: Blaustein' s pathology of the female genital tract, 2002, 5th ed./ editor Kurman RJ, 1103-1193
59. Stella CL, Sibai BM. Preeclampsia: diagnosis and management of the atypical presentation. *The Journal of Maternal- Fetal and Neonatal Medicine*, July 2006; 19(7): 81-386

60. Sibai BM, G Dekker, M Kupfermine. Pre-eclampsia. Lancet 2005; 365: 785-99
61. Sibai BM. Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (near term) births. Semin Perinatol 2006; 30: 16-19
62. Taylor RN. Review: immunobiology of preeclampsia. Am J Reprod Immunol. 1997; 37(1):79-86. Review
63. Roberts JM, Hubel CA. The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. Placenta. 2009 March ; 30(Suppl A): S32-S37. doi:10.1016/j.placenta.2008.11.009
64. Early Development of the Human Placenta. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R eds. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2006:42-50
65. William J. Larsen Εμβρυολογία του ανθρώπου, επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου ΑΕ Αθήνα, 1996, κεφ. 2, "Η δεύτερη εβδομάδα της ανάπτυξης", σελ. 32-49, μετ. Γ.Ν. Αντωνακόπουλος
66. M. Castellucci, p. Kaufmann. Basic structure of the villous trees. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R eds. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2006:50-121
67. Joshi VV. Handbook of placental pathology. New York, Igaku-Shoin,1994
68. Macroscopic features of the delivered placenta. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R eds. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2006:13-16
69. Langston C, Kaplan C, Macpherson T, Mancini E, Peevy K, Clark B, et al. Practise Guideline for Examination of the Placenta. Arch Pathol Lab Med 1997;121:449-476

70. The placenta. In: Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, 4th edition, ed SE Mills, Lippincott Williams & Wilkins 2004: 2301-2333
71. Α. Π. Σάββας, Το Γεννητικό Σύστημα Θήλεος, Επίτομη ανατομική του Ανθρώπου και Άτλας, εκδ. οίκος Αφων Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1985, σελ. 413-439
72. Anatomy and pathology of the umbilical cord. In: Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R eds. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2006:380-452
73. Kaplan CG. Gross pathology of the placenta: weight, shape, size, colour. J Clin Pathol 2008; 61: 1285-1295
74. Ο πλακούντας και τα αναπτυξιακά εξαρτήματα σελ. 69-87. Εμβρυολογία και τερατολογία του ανθρώπου, Ronan O' Rahilly & Fabiola Müller, μεταφρ. Αζαρίας Καραμανλίδης - Γιάννης Σιατίστας, Ιατρ. Εκδ. Πασχαλίδης 2000, Αθήνα
75. Kiichi Hirota, Gregg L. Semenza. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. Critical Reviews in Oncology/Hematology 59 (2006) 15-26
76. Bruick, R. K.; McKnight, S. L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science 294: 1337-1340, 2001
77. Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S. Chang, G. W. Clifford, S. C. Vaux, E. C. Cockman, M. E.; Wykoff, C. C.; Pugh, C. W.; Maher, E. R.; Ratcliffe, P. J. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 399: 271-275, 1999
78. Min, J.-H.; Yang, H.; Ivan, M.; Gertler, F.; Kaelin, W. G., Jr.; Pavletich, N. P. Structure of an HIF-1-alpha-pVHL complex:

- hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296: 1886-1889, 2002
79. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996; 271:C1172-80.
 80. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redoxinduced changes. *J Biol Chem* 1997; 272:22642-7.
 81. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.
 82. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:17987-92.
 83. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
 84. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7.
 85. Tian H, McKnight SL, Russel DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997;11:72-82.
 86. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2a plays an important role in vascular remodelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8386-91.

87. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 1998;12:3320-4.
88. Compornolle V, Brusselmans K, Acker T, et al. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 2002;8:702-10.
89. Makino Y, Cao R, Svensson K, et al. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001;414:550-4.
90. Wang X, Campos B, Kaetzel MA, Dedman JR. Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1008-16.
91. Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, Von der Mark K, Hofmann C, et al. Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* 2003;23:2907-13.
92. Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, Zhou XD, Guller S, Calandri C, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoblasts: immunolocalization and in vitro regulation. *Placenta* 1994;15:601-12.
93. Wu XX, Arslan AA, Wein R, Reutelingsperger CP, Lockwood CJ, Kuczyński E, et al. Analysis of circulating annexin A5 parameters during pregnancy: absence of differences between women with recurrent spontaneous pregnancy losses and controls. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:971-8.

94. Reutelingsperger CP, van Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine - catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53:527-32.
95. Matsubayashi H, Arai T, Izumi S, Sugi T, McIntyre JA, Makino T. Anti-annexin V antibodies in patients with early pregnancy loss or implantation failures. *Fertil Steril* 2001;76:694-9.
96. Rand JH, Wu XX, Guller S, Scher J, Andree HA, Lockwood CJ. Antiphospholipid immunoglobulin G antibodies reduce annexin-V levels on syncytiotrophoblast apical membranes and in culture media of placental villi. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:918-23.
97. Gharavi AE, Pierangeli SS, Levy RA, Harris EN. Mechanisms of pregnancy loss in antiphospholipid syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44:11-9.
98. Sugimura M, Kobayashi T, Shu F, Kanayama N, Terao T. Annexin V inhibits phosphatidylserine-induced intrauterine growth restriction in mice. *Placenta* 1999;20:555-60.
99. Bizzaro N, Antico A, Musso M, Platzgummer S, Camogliano L, Tozzoli R, et al. A prospective study of 1038 pregnancies on the predictive value of anti-annexin V antibodies for fetal loss. *Ann N Y Acad Sci* 2005;105:348-56.
100. Shu F, Sugimura M, Kanayama N, Kobayashi H, Kobayashi T, Terao T. Immunohistochemical study of annexin V expression in placenta of preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2000;49:17-23.
101. Van Eerden P, Wu XX, Chazotte C, Rand JH. Annexin A5 levels in midtrimester amniotic fluid: association with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1371-6.
102. B. Huppertz a, E. Abe, P. Murthi, T. Nagamatsu, D. Szukiewicz, C. Salafia. Placental Angiogenesis, Maternal and Fetal Vessels. A

- Workshop Report. *Placenta* 28, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 21 (2007) S94eS96
103. M. Zygunt et al. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 110 (2003) S10-S18
104. J.L. James, P.R. Stone and L.W. Chamley. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Human Reproduction Update*, Vol.12, No.2 pp. 137-144, 2006
105. Semenza, G. L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14: 1983-1991, 2000
106. Smith. Angiogenesis and reproduction. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* August 2001, Vol. 108, pp. 777-783
107. Gian Carlo Di Renzo. The role of an 'anti-angiogenic state' in complications of pregnancy. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, January 2008; 21(1): 3-7
108. Lando, D.; Peet, D. J.; Whelan, D. A.; Gorman, J. J.; Whitelaw, M. L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 295: 858-861, 2002
109. Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, et al. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 2002;62:4316-24.
110. Rapisarda A, Uranchimeg B, Sordet O, Pommier Y, Shoemaker RH, Melillo G. Topoisomerase I-mediated inhibition of hypoxia-inducible factor 1: mechanism and therapeutic implications. *Cancer Res* 2004; 64:1475-82.

111. Mabweesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003;3:363-75.
112. Macpherson GR, Figg WD. Small molecule-mediated anti-cancer therapy via hypoxia-inducible factor-1 blockade. *Cancer Biol Ther* 2004;3:503-4.
113. Todros T, Sciarrone A, Piccoli E, Guiot C, Kaufmann P, Kingdom J. Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1999;93:499-503.
114. Rajakumar A, Conrad KP. Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol Reprod.* 2000 Aug;63(2):559-69.
115. Rajakumar A, Jeyabalan A, Markovic N, Ness R, Gilmour C, Conrad KP. Placental HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, membrane and soluble VEGF receptor-1 proteins are not increased in normotensive pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R766-74.
116. Dai SY, Kanenishi K, Ueno M, Sakamoto H, Hata T. Hypoxia-inducible factor-2alpha is involved in enhanced apoptosis in the placenta from pregnancies with fetal growth restriction. *Pathol Int* 2004;54: 843-9.
117. Tal R, Shaish A, Barshack I, Polak-Charcon S, Afek A, Volkov A, Feldman B, Avivi C, Harats D. Effects of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression in pregnant mice: possible implications for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol.* 2010 Dec;177(6):2950-62. Epub 2010 Oct 15.

118. Kaya A, Boztosun A, Seckin H, Guven AS, Kucukdurmaz Z, Gulturk S, Cevit O. The evaluation of hypoxia-inducible factor 1 in N-nitro-L-arginine methyl ester preeclampsia model of pregnant rats. *J Investig Med*. 2011 Dec;59(8):1268-72
119. Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, Daftary AR, Markovic N, Conrad KP. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2alpha, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 2001;64:499-506.
120. Jarvenpaa J, Vuoristo JT, Savolainen ER, Ukkola O, Vaskivuo T, Ryyanen M. Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:351-5.
121. Caniggia I, Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies - a review. *Placenta* 2002;23 (Suppl A):S47-57.
122. Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP. Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF-alpha proteins. *Placenta* 2008;29:290-9.
123. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:617-26.
124. Takeda K, Ho VC, Takeda H, Duan LJ, Nagy A, Fong GH. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2. *Mol Cell Biol*. 2006 Nov;26(22):8336-46. Epub 2006 Sep 11.

125. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, Wagner JR, Devor DE, Grinberg A, Emmert-Buck MR, Westphal H, Klausner RD, Linehan WM. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9102-7
126. Genbacev O, Krtolica A, Kaelin W, Fisher SJ. Human cytotrophoblast expression of the von Hippel-Lindau protein is downregulated during uterine invasion in situ and upregulated by hypoxia in vitro. *Dev Biol*. 2001 May 15; 233(2):526-36.
127. Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Markovic N, Conrad KP. Expression of von Hippel Lindau (pVHL) protein in placentae from normal pregnant women and women with preeclampsia. *Placenta*. 2006 Apr-May;27(4-5):411-21. Epub 2005 Jun 13.
128. Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Harger G, Conrad KP. Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1alpha and -2alpha proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2003;24:199-208.
129. Genbacev O, McMaster MT, Zdravkovic T, Fisher SJ. Disruption of oxygen-regulated responses underlies pathological changes in the placentas of women who smoke or who are passively exposed to smoke during pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2003 Sep-Oct;17(5):509-18.
130. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;59:15-26.
131. Burton G, Yung HW. Placental stress, protein synthesis inhibition, and growth restriction. *Biol Reprod* 2008;78 (Suppl 1):275.
132. Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005; 2005:re12.

133. Hass R, Sohn C. Increased oxidative stress in pre-eclamptic placenta is associated with altered proteasome activity and protein patterns. *Placenta* 2003;24:979-84.
134. Nüsken KD, Schneider H, Plank C, Trollmann R, Nüsken E, Rascher W, Dötsch J. Fetal programming of gene expression in growth-restricted rats depends on the cause of low birth weight. *Endocrinology*. 2011 Apr;152(4):1327-35. Epub 2011 Jan 25.
135. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195:40-9.
136. Mayhew TM, Wijesekara J, Baker PN, Ong SS. Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by preeclampsia. *Placenta* 2004;25:829-33.
137. Shibata E, Hubel CA, Powers RW, von Versen-Hoeynck F, Gammill H, Rajakumar A, et al. Placental system A amino acid transport is reduced in pregnancies with small for gestational age (SGA) infants but not in preeclampsia with SGA infants. *Placenta* 2008;29:879-82.

Reduced placental prolyl hydroxylase 3 mRNA expression in pregnancies affected by fetal growth restriction

V Gourvas,^a S Sifakis,^b E Dalpa,^a N Soultziz,^a O Koukoura,^b DA Spandidos^a

^a Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece ^b Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Correspondence: Prof DA Spandidos, Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, PO Box 2208, Heraklion 71003, Crete, Greece. Email spandidos@spandidos.gr

Accepted 27 August 2010. Published Online 13 October 2010.

Objective To investigate the role of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in fetal growth restriction (FGR).

Design A case–control study.

Setting Research laboratory and gynaecology clinic.

Sample Twenty placentas from normal pregnancies and 20 from FGR pregnancies.

Methods RNA extraction, cDNA synthesis, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay, statistical analysis.

Main outcome measures mRNA expression of HIF-1 α , HIF-2 α and HIF- β (ARNT), along with prolyl hydroxylase domain 3 (PHD3), which leads to proteasomal degradation of HIF- α subunits.

Results No statistically significant differences in the transcription levels of ARNT and HIF-2 α were found between FGR and normal placentas. By contrast, PHD3 and HIF-1 α mRNA were downregulated in FGR placentas. PHD3 mRNA expression was associated with gestational age at delivery ($P = 0.008$), birthweight centile ($P = 0.029$) and abnormal umbilical artery (UA) Doppler measurements ($P = 0.034$).

Conclusions As PHD3 regulates the HIF-mediated hypoxic response in FGR, we deduce that fetal adaptation to hypoxia ranges from impaired to adequate, as observed by the gradient of PHD3 downregulation in relation to the severity of FGR.

Keywords ARNT, HIF-1 α , HIF-2 α , hypoxia, intrauterine growth restriction.

Please cite this paper as: Gourvas V, Sifakis S, Dalpa E, Soultziz N, Koukoura O, Spandidos D. Reduced placental prolyl hydroxylase 3 mRNA expression in pregnancies affected by fetal growth restriction. BJOG 2010; DOI: 10.1111/j.1471-0528.2010.02735.x.

Introduction

Fetal growth restriction (FGR) is a complex obstetric complication with an incidence of 4–7% of births. It is associated with a between six- and ten-fold increased risk of perinatal morbidity and mortality.^{1,2} FGR is not a disease entity with a unique pathophysiology.³ A variety of factors are involved, including congenital abnormalities, drug abuse, infectious diseases, and immunological and anatomical disorders. However, abnormal placentation (placental development) is observed in most cases.⁴

A successful pregnancy outcome depends on the appropriate development of the fetoplacental vasculature in the villous core, which follows the infiltration of cytotrophoblast in the decidua, and is completed in conjunction with the spiral arteries.^{5,6} It is widely accepted that shallow trophoblast invasion can lead to fetal hypoxia and impaired

growth.⁷ Adequate proliferation and differentiation of villous cytotrophoblast into invasive extravillous trophoblast, a process that is controlled by hypoxia, is critical for successful placentation.^{8,9} Thus, the entire repertoire of hypoxia-associated growth factors is remarkably active during placental development.

A prerequisite for many hypoxia-mediated responses are the basic helix-loop-helix (bHLH) Per–ARNT–Sim (PAS) family member transcription factors hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α .^{10,11} After stabilisation, these two molecules heterodimerise into the nucleus with aryl hydrocarbon nuclear translocator protein (ARNT or HIF- β),¹² and then bind to the hypoxia response element (HRE) in responsive genes that play a pivotal role in angiogenesis, glucose transport, glycolysis and erythropoiesis. HIFs are critical in mouse development, as all homozygous knock-out mice manifest embryonic lethality.¹³ Degradation

of HIF- α protein is triggered by oxygen, which activates the prolyl hydroxylase domain enzymes (PHDs) that, in turn, hydroxylate proline residues 402 and 564 in HIF- α . These hydroxylated proline residues are required for the recognition and binding of the chaperone von Hippel Lindau (vHL) protein, which is part of a larger complex of proteins that ubiquitinates HIF- α , thereby targeting it for proteosomal degradation.^{14,15} As the regulation of HIF activity is mainly mediated by protein stabilisation, vHL, PHD1, 2 and 3 are constitutively expressed in order to achieve complete proteasomal degradation of HIFs (Figure 1).¹⁶

In the present study, we investigated the possible involvement of the HIF/PHD pathway in extracted villi of pregnancies complicated by FGR, evaluating HIF-1 α , HIF-2 α , ARNT and PHD3 placental mRNA expression levels by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). We focussed on PHD3, and not on PHD1 or PHD2, because it is strongly upregulated by hypoxia, presumably to rapidly cope with elevated HIF-1 α protein abundance upon oxygenation.¹⁷

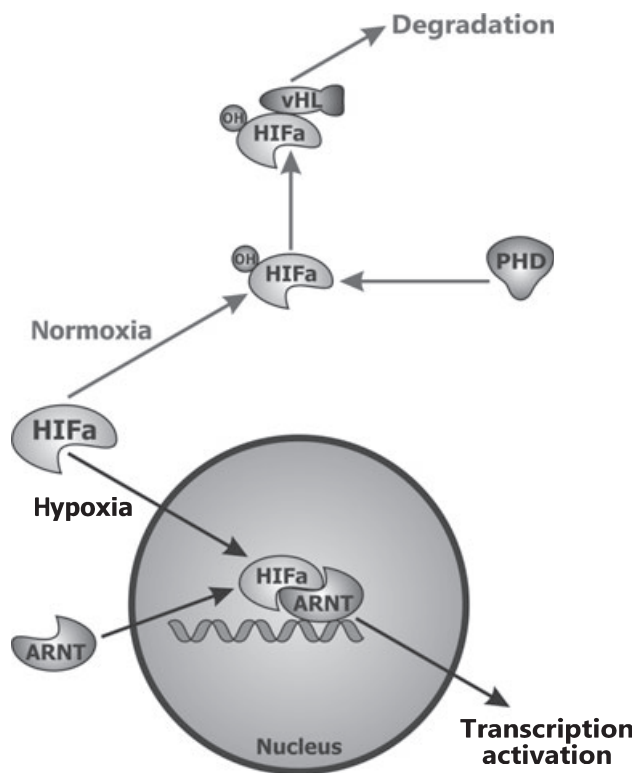


Figure 1. Graphical representation of the HIF pathway during normoxic and hypoxic conditions. In normoxia (grey arrows) PHD hydroxylates HIF- α , which then binds to vHL, leading to its proteosomal degradation. In hypoxia (black arrows) HIF- α enters the nucleus, forms a dimer with ARNT, which then binds to DNA, leading to gene transcription activation.

Methods

Placental collection and processing

Placentas were obtained from women with normal ($n = 20$) and FGR ($n = 20$) pregnancies, immediately after delivery. Six basal plate biopsy specimens of the medial part of the maternal–fetal interface were obtained from each placenta, in such a way that each sample contained the decidua basalis and villous placenta, but not the chorionic plate.^{18,19} Tissue biopsies were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Three of the above six biopsy specimens were randomly chosen for our measurements. The Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion approved the study, and written informed consent was obtained from all participants.

Clinical definitions

Clinical details for the study groups are shown in Table 1. FGR was established by fetal weight and size below the tenth centile, along with an asymmetrical pattern of growth

Table 1. Clinical characteristics of the study groups

	FGR pregnancies	Normal pregnancies	<i>P</i>
Cases, <i>n</i>	20	20	
Maternal age (mean \pm SD, years)	28.3 \pm 5.6	28.1 \pm 5.4	0.91*
BMI (mean \pm SD)	23.0 \pm 4.0	25.0 \pm 6.8	0.28*
Maternal weight gain (mean \pm SD, kg)	11 \pm 5	15 \pm 6	0.056*
Gestational age at delivery (mean \pm SD, weeks)	36.6 \pm 3.8	38.4 \pm 1.7	0.058*
Birthweight (mean \pm SD, g)	2022 \pm 613	3123 \pm 430	<0.001*
Mode of delivery			
Vaginal (%)	7 (35.0)	11 (55.0)	0.20**
Caesarean section (%)	13 (65.0)	9 (45.0)	
Parity			
Nulliparous (%)	12 (60.0)	9 (45.0)	0.34**
Multiparous (%)	8 (40.0)	11 (55.0)	
Child gender			
Male (%)	9 (45.0)	8 (40.0)	0.75**
Female (%)	11 (55.0)	12 (60.0)	
Smoking			
Yes (%)	11 (55.0)	5 (25.0)	0.053**
No (%)	9 (45.0)	15 (75.0)	
Abnormal UA Doppler			
Yes (%)	8 (40.0)	1 (5.0)	0.02**
No (%)	12 (60.0)	19 (95.0)	

*Student's *t* test (two-tailed).

**Chi-square or Fisher's exact test (two-tailed).

P-values in bold indicate statistically significant differences between the two study groups.

and abnormal measurements in the second trimester ultrasonography. Based on the above criteria, the fetuses examined in our study were considered to be growth restricted rather than constitutionally small babies. Interestingly, all of them had sizes below the third centile. Pregnant women with pre-eclampsia, pre-existing medical disorders, TORCH [toxoplasmosis, other (congenital syphilis and viruses), rubella, cytomegalovirus and herpes simplex virus] infections and substance abuse were excluded from the study. Additionally, no recognised chromosomal or genetic defects were observed in the neonates, and amniotic fluid index (AFI) values were within the normal range. Finally, pregnancies with a birthweight above the tenth centile, no recognised defect or pathology, and delivery after 37 completed weeks of gestation were classified as normal pregnancies, irrespective of the mode of delivery.

The umbilical artery (UA) Doppler flow velocity waveform was also measured, and it was considered to be abnormal if the systolic-to-diastolic ratio was >95%, or if the diastolic flow was absent or reversed.²⁰ However, abnormal UA Doppler measurements alone were not sufficient to categorise a baby as being growth restricted: only in combination with other clinical findings can FGR be diagnosed,²¹ as FGR babies can have normal UA Doppler measurements.²²

RNA extraction and cDNA preparation

A 100-mg sample of each tissue specimen was homogenised in 1 ml of TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) using a power homogeniser, followed by the addition of chloroform and centrifugation. Total RNA was precipitated from the supernatant with isopropanol, washed with 75% ethanol and resuspended in 30 μ l of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water. RNA concentration and purity were calculated after measuring the 260-nm absorbance and 260/280-nm absorbance ratio, respectively, on a UV spectrophotometer.

cDNA was synthesised by reverse transcription (RT) with the ThermoScript[™] RT kit (Invitrogen), using random hexamers as amplification primers. In detail, 2.5 μ g of total RNA, 50 ng of random hexamers and 1 mmol/l deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) were heated at 65°C for 5 minutes, in order to remove RNA secondary structures, and placed on ice until the addition of cDNA synthesis mix, which contained 1 \times cDNA synthesis buffer (50 mmol/l Tris-acetate, pH 8.4, 75 mmol/l potassium acetate and 8 mmol/l magnesium acetate), 5 mmol/l dithiothreitol (DTT), 40 units RNaseOut[™] and 15 units ThermoScript[™] reverse transcriptase. The final mix (volume 20 μ l) was incubated for 10 minutes at 25°C for primer extension, and cDNA synthesis was conducted at 55°C for 50 minutes. The reaction was terminated by heating at 85°C for 5 minutes. In order to remove the RNA template, cDNA was

incubated at 37°C for 20 minutes with 2 units of *Escherichia coli* RNaseH, and stored at -20°C until use.

Quantitative real-time polymerase chain reaction assay

The expression of HIF-1 α , HIF-2 α , PHD3 and ARNT mRNA was measured using a qRT-PCR assay with SYBR[®] Green I dye. A housekeeping gene, β -actin, was used as an internal control, in order to normalise HIF-1 α , HIF-2 α , PHD3 and ARNT mRNA expression levels. The mRNA-specific primers, which were designed with LASERGENE[®] (DNASTAR, Madison, WI, USA), and span at least one intron with an average length >800 bp, are listed in Table 2. Their specificity was verified with the BLAST program (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). After initial experiments, in order to optimise the concentration and annealing temperature of the primers, 1 μ l of cDNA from FGR or control samples was amplified in a PCR reaction containing 2 \times Brilliant SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Stratagene, La Jolla, CA, USA), 300 nmol/l of each primer and 30 μ mol/l Rox passive reference dye, in a final volume of 20 μ l. To ensure the accuracy of the quantification measurements, a representative pool of all the samples was diluted in a series of five 2 \times dilutions, and was run on the same plate, in order to construct a standard curve for the quantification process. After initial denaturation at 95°C for 10 minutes, samples were subjected to 40 cycles of amplification, comprised of denaturation at 95°C for 20 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds and elongation at 72°C for 30 seconds, followed by a melt-curve analysis (in order to verify the presence of only one PCR product and the absence of dimers), in which the temperature was increased from 60 to 95°C at a linear rate of 0.2°C/second. Data collection was performed during both annealing and extension, with two measurements at each step, and at all times during the melt-curve analysis. PCR

Table 2. Primer sequences used for qRT-PCR

Primer pair	Sequence (5' \rightarrow 3')	Amplicon size (bp)
HIF-1 α	CGGCGGAACGACAAGAA GGAAGTGGCAACTGATGAGCAAG	126
HIF-2 α	ATGACAGCTGACAAGGAGAAGAA TGGGCCAGCTCATAGAACAC	116
PHD3	CCGCTGGGCAAATACTAC GTCCACGTGGCGAACATAAC	91
ARNT	GCCATTGCCTCTGGAACTCT CTGTTCCCTTCTCCATCATCATC	113
β -actin	CGGCATCGTCAACCACTG GGCACACGCAGTCTATTG	70

experiments were conducted on an Mx3000P real-time PCR thermal cycler using software v4.01, build 369, schema 80 (Stratagene). PCR products were electrophoresed on 2% (w/v) agarose gels and stained with ethidium bromide, in order to verify that the corresponding product band (as visualised with the help of a UV transilluminator) had the correct size. Representative bands of all PCR products analysed were extracted from the agarose gels, purified and sequenced, as a final confirmation step that the appropriate gene was amplified at each PCR reaction. After amplification, standard curves were constructed from the samples used in the series of consecutive dilutions. Subsequently, using these standard curves and the cycle threshold (C_t) value of the samples, we calculated the mRNA expression of the genes studied. Samples with no amplification plots or with dissociation curves that exhibited signs of primer-dimer formation or by-products were excluded. To normalise the mRNA expression of each gene, the expression value was divided by the β -actin mRNA value. The normalised values of FGR samples were divided by the average normalised values of normal samples. The result of this division provided the relative expression of an FGR specimen in relation to the control group. This mathematical process is summarised in the following formula:

Normalised sample/control

$$= (1 + E_{\text{gene}})^{-\Delta C_{t\text{gene}}} / (1 + E_{\beta\text{-actin}})^{-\Delta C_{t\beta\text{-actin}}}$$

A two-fold increased (i.e. a value ≥ 2) or decreased (i.e. a value ≤ 0.5) expression was considered biologically significant (for overexpression or downregulation, respectively). In each PCR reaction two negative controls were included, one with no cDNA template and one with no reverse transcription treatment. All qRT-PCR measurements were conducted in triplicate.

Statistical analysis

The mRNA levels of HIF-1 α , HIF-2 α , PHD3 and ARNT were first evaluated by the one-sample Kolmogorov–Smirnov goodness-of-fit test, in order to determine whether they followed a normal distribution pattern. Depending on the results, Pearson's or the non-parametric Spearman's rank test was used to examine their relationship pairwise, and their association with continuous variables [maternal age, body mass index (BMI), weight gain, gestational age at delivery and birthweight centile]. Moreover, their association with categorical data (smoking habits, mode of delivery, child gender, parity and UA Doppler measurements) was examined using a Student's t test (after an assessment of the equality of variances using Levene's test), or its non-parametric equivalents Mann–Whitney U - and Kruskal–Wallis H -tests. Additionally, the chi-square (χ^2) test, replaced by Fisher's exact test when indicated by the analy-

sis, was used to examine the expression status of the four genes with the various clinicopathological parameters after stratification. Statistical analyses were two-sided, and were performed with SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical significance was set at the 95% level ($P < 0.05$).

Power and sample size calculations

Power and sample size calculations were performed with PS POWER AND SAMPLE SIZE CALCULATIONS v3.0.14 (biostat.mc.vanderbilt.edu/wiki/Main/PowerSampleSize). For sample size calculations, the power (type-II error, or β) was set to 80% and the statistical significance (type-I error, or α) was set to 0.05. For power calculations, the size was set to 20 (the specimen and control groups size in our study), and the type-I error was set to 0.05. For both calculations, the minimum difference in the mean value (0.88) of PHD3 or HIF-1 α mRNA expression between FGR samples and controls in the clinical parameters that yielded statistically significant results (gestational age, birthweight centile, UA Doppler and mode of delivery), and the maximum standard deviation (0.92) within the two study groups in each of the above parameters, were used.

Results

The results of our qRT-PCR analysis are shown in Table 3. Compared with controls, mRNA expression levels of HIF-1 α and PHD3 exhibited downregulation in 45% (9/20) and 65% (13/20) of FGR samples, respectively. On the contrary, HIF-2 α and ARNT transcription levels were similar in the majority of FGR women when compared with controls.

Further analysis revealed statistically significant associations between placental mRNA levels and particular pathological parameters in FGR cases (Figure 2). PHD3 mRNA expression was higher in FGR specimens with a gestational age of <37 weeks (8/20 samples) compared with those with gestational age of >37 weeks (12/20 samples) (2.08 ± 0.92 versus 0.50 ± 0.24 , Mann–Whitney U test, $P = 0.008$).

Table 3 mRNA expression analysis of HIF-1 α , HIF-2 α , PHD3 and ARNT in FGR women

Gene	Relative mRNA expression		
	↑ (%)	— (%)	↓ (%)
HIF-1 α	5/20 (25.0)	6/20 (30.0)	9/20 (45.0)
HIF-2 α	3/20 (15.0)	11/20 (55.0)	6/20 (30.0)
PHD3	3/20 (15.0)	4/20 (20.0)	13/20 (65.0)
ARNT	3/20 (15.0)	11/20 (55.0)	6/20 (30.0)

↑, overexpression; —, normal expression; ↓, reduced expression.

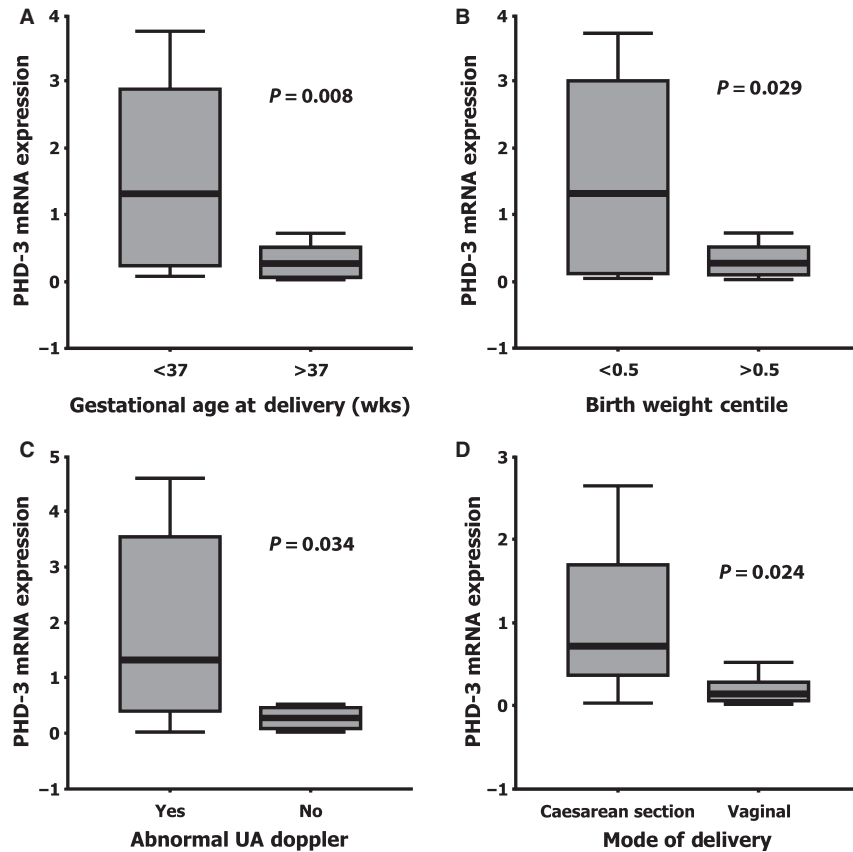


Figure 2. Box and whisker plots depicting statistically significant associations of PHD3 placental mRNA expression with various clinical parameters in FGR-affected pregnancies. (A) PHD3 expression is decreased as gestational duration is elongated [1.32 (2.64) versus 0.28 (0.45), $P = 0.008$]. (B) PHD3 mRNA levels are lower in FGR specimens with birthweights in higher centiles [1.32 (2.90) versus 0.28 (0.42), $P = 0.029$]. (C) PHD3 is downregulated in FGR samples with normal umbilical artery (UA) Doppler measurements [1.32 (3.14) versus 0.27 (0.38), $P = 0.034$]. (D) PHD3 mRNA levels are decreased in FGR samples with vaginal delivery [0.72 (1.33) versus 0.09 (0.22), $P = 0.024$]. All values are presented as medians [interquartile range (IQR) = $Q_3 - Q_1$]. The thick line near the centre of each rectangular box represents the median value, the bottom and top edges of the box indicate the first (Q_1) and third (Q_3) quartiles, and the ends of the whiskers depict the tenth (P_{10}) and 90th (P_{90}) percentiles. Statistical analysis was conducted with a two-tailed Mann–Whitney U test.

Moreover, FGR cases with birthweights lower than the 0.5 centile (11/20 samples) had higher PHD3 mRNA levels compared with FGR pregnancies with birthweights higher than the 0.5 centile (9/20 samples) (1.97 ± 0.77 versus 0.30 ± 0.08 , Mann–Whitney U test, $P = 0.029$). Additionally, FGR pregnancies with abnormal UA Doppler (8/20 samples) exhibited increased PHD3 mRNA expression levels compared with FGR cases with normal UA Doppler (12/20 samples) (2.28 ± 0.92 versus 0.37 ± 0.13 , Mann–Whitney U test, $P = 0.034$). Finally, HIF-1 α mRNA levels were decreased in FGR specimens with birthweights lower than the 0.5 centile (11/20 samples) compared with FGR pregnancies with birthweights higher than the 0.5 centile (9/20 samples) (0.99 ± 0.29 versus 1.87 ± 0.73 , Mann–Whitney U test, $P = 0.039$).

There was no statistically significant association between HIF-1 α placental mRNA levels and gestational age at

delivery or UA Doppler measurements. Additionally, no statistically significant associations were observed regarding HIF-1 α or PHD3 placental mRNA levels and maternal age, BMI, smoking habits, weight gain, gender of the child and parity. Finally, the transcription levels of the other two genes studied (HIF-2 α and ARNT), did not exhibit any statistically significant associations with the pathological parameters.

Using Spearman's rank test, we tested the co-expression pattern of the four examined genes in a pairwise manner in the FGR samples (after normalisation). This test examines whether two molecules are upregulated or downregulated together (positive association), or whether when one is overexpressed the other has reduced expression (negative association). The results indicated that HIF-1 α is positively associated with PHD3 and ARNT [correlation coefficient (CC) = 0.58, $P = 0.007$; CC = 0.83, $P < 0.001$, respec-

tively], PHD3 is positively associated with ARNT (CC = 0.47, $P = 0.038$), whereas HIF-2 α mRNA expression is not associated with HIF-1 α , PHD3 and ARNT transcription levels (CC = 0.02, $P = 0.94$; CC = 0.06, $P = 0.82$; and CC = 0.10, $P = 0.66$, respectively).

In FGR-affected pregnancies for which a caesarean section (13/20 samples) was performed, increased PHD3 mRNA levels were observed compared with FGR pregnancies with a vaginal delivery (7/20 samples) (1.64 ± 0.61 versus 0.19 ± 0.07 , Mann–Whitney U test, $P = 0.024$).

Finally, according to power and sample size calculations, our study had 83.8% power to find the statistically significant associations that were observed. Interestingly, only 18 samples and controls were needed in order for our study to have 80% power.

Discussion

In the present study, we found PHD3 expression in FGR placentas to be downregulated, a finding that differs from the reported PHD3 mRNA levels in pre-eclamptic placentas.²³ It has already been established that increased oxidative stress in the pre-eclamptic placenta is associated with altered proteosomal activity and protein patterns.^{24–26} A similar stress, although of different severity, has been reported in FGR placentas.²⁷ We suggest that reduced PHD3 expression is an impaired hypoxic response of placental cells that occurs in order to activate HIFs. It is also known that vaginal delivery is associated with higher stress to the fetus.^{28,29} The impact of this stress on PHD3 expression is additionally revealed by our findings, as among FGR cases that exhibited PHD3 downregulation, those with a vaginal delivery exhibited decreased PHD3 expression compared with those delivered by caesarean section.

This study also demonstrated a less profound downregulation of HIF-1 α compared with PHD3, whereas HIF-2 α and ARNT mRNA levels showed no significant differences compared with controls. According to the literature, HIF-1 α and -2 α mRNA expression is not altered in FGR-affected pregnancies,³⁰ although an increase in protein levels, especially for HIF-2 α , has been observed as a result of post-translational modifications.³¹ In contrast, in pre-eclampsia, both HIF-1 α and HIF-2 α are overexpressed.^{32–34} There is also evidence to suggest that the impairment of protein degradation rather than increased synthesis causes the inadequate oxygen-dependent reduction of HIF-1 α protein in pre-eclamptic placentas.²⁵

Based on the above data, we assume that the regulation of HIFs in the placentas of FGR-affected pregnancies is mainly achieved through protein stabilisation (post-translational modification),¹⁷ which could explain why we did not observe large-scale variations in the expression levels of HIFs. Although HIF-1 α mRNA appeared to be slightly

downregulated, we considered HIF-1 α to be more active through minimal proteosomal activity, implying a decrease in HIF- α degradation. HIF-1 α downregulation could probably be explained as a result of co-expression with PHD3, because these two molecules share a positive internal feedback mechanism.³⁵ Regarding ARNT, it is well documented that it is constitutively expressed.^{36,37} Consequently, we did not expect to observe alterations in its mRNA expression. From the above we deduce that, although our mRNA data should have been accompanied by experimental work conducted at the protein level, in order to verify and strengthen our observations, our results still indicate that the HIF/PHD pathway is deregulated in the placenta of FGR-affected women.

Notable statistical associations between PHD3 mRNA expression and some of the pathological characteristics of our FGR specimens were also observed. PHD3 expression was inversely related to the gestational age at delivery. Moreover, FGR-affected pregnancies with a birthweight centile higher than 0.5 had decreased PHD3 expression compared with FGR-affected pregnancies with birth weights lower than the 0.5 centile. Additionally, PHD3 mRNA levels were reduced in FGR samples with normal UA Doppler measurements compared with FGR samples with abnormal UA Doppler measurements. A growth-restricted fetus can have a placenta with positive end-diastolic flow, suggesting an adaptive pathway for the placenta in the face of uteroplacental ischemia.²² Thus, it was observed that FGR-affected pregnancies with a less adverse outcome displayed increased PHD3 downregulation. The severity of FGR appears to be related to differences in the adaptation model to hypoxia, ranging from adequate to impaired or absent adaptation. This approach has already been suggested in FGR cases associated with pre-eclampsia.³⁸

It is believed that pre-eclampsia and FGR share common components in their pathogenesis, although some disparate findings have been described.^{7,39} Furthermore, it has been suggested that FGR in pre-eclampsia represents the response to a fetal signal stimulated by reduced placental nutrient availability that is inadequate to overcome the subsequent malnutrition stress. Conversely, FGR without pre-eclampsia occurs as a result of the absence of this signal.^{38,40} We suggest that this model could be applied to the FGR cases of this study. Based on our results, it can be hypothesised that FGR babies with less severe disease produce a signal stimulated by the reduced placental nutrient and oxygen availability, in contrast to FGR babies with a more adverse outcome that fail to produce this signal.

Conclusion

This pilot study has demonstrated that PHD3 may play an important role in the molecular adaptation that occurs

during oxidative stress in FGR pathophysiology. Further studies are needed in order to verify these results and to investigate whether PHD3 could be used as a prognostic marker of FGR severity.

Disclosure of interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

Contribution to authorship

VG, concept and design, data acquisition and interpretation, manuscript drafting and revision; SS, concept and design, data interpretation, manuscript revision; ED, concept and design, data acquisition, manuscript drafting; NS, data analysis, manuscript revision; OK, concept and design; DAS, concept and design, manuscript revision, final version approval.

Details of ethics approval

This study was approved by the University Hospital of Heraklion Ethics Committee (no. 462/01-11-2007).

Funding

This study was financially supported by the Empeirikeion Foundation, Athens, Greece.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mr Demetrios Koutroulakis, MD, for his assistance in acquiring the placental tissue samples. ■

References

- 1 Jarvis S, Glinianaia SV, Torrioli MG, Platt MJ, Miceli M, Jouk PS, *et al*. Cerebral palsy and intrauterine growth in single births: European collaborative study. *Lancet* 2003;362:1106–11.
- 2 Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998;95:115–28.
- 3 Cetin I, Foidart JM, Miozzo M, Raun T, Jansson T, Tsatsaris V, *et al*. Fetal growth restriction: a workshop report. *Placenta* 2004;25:753–7.
- 4 Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1–7.
- 5 Huppertz B, Abe E, Murthi P, Nagamatsu T, Szukiewicz D, Salafia C. Placental angiogenesis, maternal and fetal vessels—a workshop report. *Placenta* 2007;28 (Suppl A):S94–6.
- 6 Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004;25:127–39.
- 7 Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:40–9.
- 8 James JL, Stone PR, Chamley LW. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2006;12:137–44.
- 9 Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277:1669–72.
- 10 Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:551–78.
- 11 Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4273–8.
- 12 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5510–4.
- 13 Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 1997;386:403–7.
- 14 Brucic RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337–40.
- 15 Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002;296:1886–9.
- 16 Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997;272:22642–7.
- 17 Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:617–26.
- 18 Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2505–12.
- 19 Winn VD, Haimov-Kochman R, Paquet AC, Yang YJ, Madhusudhan MS, Gormley M, *et al*. Gene expression profiling of the human maternal-fetal interface reveals dramatic changes between midgestation and term. *Endocrinology* 2007;148:1059–79.
- 20 Intrauterine growth restriction. clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American college of obstetricians and gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;72:85–96.
- 21 Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van derPost JA, Coomarasamy A, *et al*. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ* 2008;178:701–11.
- 22 Todros T, Sciarrone A, Piccoli E, Guiot C, Kaufmann P, Kingdom J. Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1999;93:499–503.
- 23 Rajakumar A, Michael HM, Daftary A, Jeyabalan A, Gilmour C, Conrad KP. Proteasomal activity in placentas from women with preeclampsia and intrauterine growth restriction: implications for expression of HIF- α proteins. *Placenta* 2008;29:290–9.
- 24 Wenger RH, Stiehl DP, Camenisch G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005;2005:re12.
- 25 Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Harger G, Conrad KP. Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2003;24:199–208.
- 26 Hass R, Sohn C. Increased oxidative stress in pre-eclamptic placenta is associated with altered proteasome activity and protein patterns. *Placenta* 2003;24:979–84.
- 27 Burton G, Yung HW. Placental stress, protein synthesis inhibition, and growth restriction. *Biol Reprod* 2008;78 (Suppl 1):275.
- 28 Ruth V, Hallman M, Laatikainen T. Corticotropin-releasing hormone and cortisol in cord plasma in relation to gestational age, labor, and fetal distress. *Am J Perinatol* 1993;10:115–8.
- 29 Bird JA, Spencer JA, Mould T, Symonds ME. Endocrine and metabolic adaptation following caesarean section or vaginal delivery. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996;74:F132–4.

- 30 Rajakumar A, Jeyabalan A, Markovic N, Ness R, Gilmour C, Conrad KP. Placental HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, membrane and soluble VEGF receptor-1 proteins are not increased in normotensive pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R766–74.
- 31 Dai SY, Kanenishi K, Ueno M, Sakamoto H, Hata T. Hypoxia-inducible factor-2alpha is involved in enhanced apoptosis in the placenta from pregnancies with fetal growth restriction. *Pathol Int* 2004;54:843–9.
- 32 Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, Daftary AR, Markovic N, Conrad KP. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2alpha, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 2001;64:499–506.
- 33 Jarvenpaa J, Vuoristo JT, Savolainen ER, Ukkola O, Vaskivuo T, Ryyanen M. Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:351–5.
- 34 Caniggia I, Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies – a review. *Placenta* 2002;23 (Suppl A):S47–57.
- 35 Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ* 2008;15:635–41.
- 36 Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;59:15–26.
- 37 Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271:C1172–80.
- 38 Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta* 2009;30 (Suppl A):S32–7.
- 39 Mayhew TM, Wijesekara J, Baker PN, Ong SS. Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by preeclampsia. *Placenta* 2004;25:829–33.
- 40 Shibata E, Hubel CA, Powers RW, von Versen-Hoeynck F, Gammill H, Rajakumar A, *et al.* Placental system A amino acid transport is reduced in pregnancies with small for gestational age (SGA) infants but not in preeclampsia with SGA infants. *Placenta* 2008;29:879–82.