



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ VEGF Η PIGF ΣΕ  
ΠΛΑΚΟΥΝΤΕΣ ΓΥΝΑΙΚΩΝ ΜΕ ΣΙΔΗΡΟΠΕΝΙΚΗ Η  
ΕΤΕΡΟΖΥΓΗ β-ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ»**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΔΗΜ. ΜΙΧΑΛΙΤΣΗ  
ΜΑΙΕΥΤΗΡ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2014**



## **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ**

Ιωάννης Ε.Μεσσήνης , Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγητής	κ. Ιωάννης Μεσσήνης
Καθηγητής	κ. Γεώργιος Συρογιαννόπουλος
Καθηγητής	κ. Γεώργιος Κουκούλης

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καθηγητής	κ. Ιωάννης Μεσσήνης
Καθηγητής	κ. Γεώργιος Συρογιαννόπουλος
Καθηγητής	κ. Γεώργιος Κουκούλης
Καθηγητής	κ. Αντώνιος Γούναρης
Αν. Καθηγητής	κ. Αλέξανδρος Δαπόντε
Αν. Καθηγητής	κ. Κωνσταντίνος Νταφόπουλος
Επικ. Καθηγητής	κ. Αντώνιος Γκαράς



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>	<b>9</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>13</b>
<b>ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ .....</b>	<b>14</b>
<b>ΑΡΧΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ .....</b>	<b>14</b>
Προεμφυτευτικό στάδιο .....	14
Προκενοτοπιώδες στάδιο .....	14
Κενοτοπιώδες στάδιο .....	16
Λαχνικό στάδιο.....	19
<b>ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ .....</b>	<b>22</b>
<b>Βασικές δομές του δικτύου των λαχνών.....</b>	<b>22</b>
<b>Αρχιτεκτονική του δικτύου των λαχνών .....</b>	<b>27</b>
Κατάταξη των λαχνικών τύπων .....	27
<b>ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ.....</b>	<b>33</b>
<b>ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ .....</b>	<b>36</b>
<b>VEGF .....</b>	<b>36</b>
Υποδοχείς VEGF.....	38
<b>PlGF .....</b>	<b>39</b>
Έκφραση των VEGF και PlGF στον πλακούντα .....	41
<b>HIF-1α .....</b>	<b>43</b>
<b>ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ .....</b>	<b>47</b>

<b>Ορισμοί.....</b>	<b>47</b>
<b>Αγγειογένεση I (21<sup>η</sup>-34<sup>η</sup> μέρα μετά τη σύλληψη).....</b>	<b>48</b>
<b>Αγγειογένεση II-Δημιουργία των αγγειακών δικτύων (32<sup>η</sup> μέρα- 25<sup>η</sup> εβδομάδα μετά τη σύλληψη). ....</b>	<b>52</b>
<b>Αγγειογένεση III ( 15<sup>η</sup> εβδομάδα- 32<sup>η</sup> εβδομάδα μετά τη σύλληψη).....</b>	<b>54</b>
α. Δημιουργία στελεχιαίων λαχνών .....	54
β.Υποστροφή περιφερικών αγγείων.....	54
<b>Αγγειογένεση IV. Επικράτηση της μη διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης (24<sup>η</sup>-25<sup>η</sup> εβδομάδα-τέλος της κύησης) .....</b>	<b>55</b>
 <b>Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗ ΤΗΣ</b>	
<b>ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ .....</b>	<b>59</b>
<b>ΣΙΔΗΡΟΠΕΝΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ .....</b>	<b>62</b>
Ορισμός .....	62
Ευαισθησία και ειδικότητα και των διαγνωστικών μεθόδων για τη σιδηροπενική αναιμία.....	63
Επίπτωση της σιδηροπενικής αναιμίας στην κύηση.....	68
Αντιμετώπιση της σιδηροπενικής αναιμίας .....	70
<b>ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΣ β- ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ.....</b>	<b>71</b>
Η δομή του μορίου της αιμοσφαιρίνης .....	71
Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία .....	73
Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και κύηση.....	75
Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	78

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</b>	<b>83</b>
<b>ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>85</b>
Ανοσοϊστοχημεία του VEGF.....	87
Ανοσοϊστοχημεία του PlGF.....	89
Ανοσοϊστοχημεία του HIF-1 <sup>α</sup> .....	91
<b>ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ .....</b>	<b>95</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>98</b>
I. Περιγραφή κατανομών ποσοτικών μεταβλητών .....	98
II. Αναλυτική περιγραφή κατανομών ποσοτικών μεταβλητών.....	103
III. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο $\chi^2$ .....	113
IV. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο ANOVA.....	120
V. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τις μεθόδους Tukey, Post Hoc, (Συσχέτιση των VEGF, PlGF, HIF-1 $\alpha$ με όλες τις ανεξάρτητες μεταβλητές).....	124
VI. Παθολογοανατομικά ευρήματα και εικόνες.....	143
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>159</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>174</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>176</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>179</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>183</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....</b>	<b>205</b>





## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η γέννηση ενός υγιούς παιδιού εξαρτάται από τη φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα, η οποία όταν διαταραχθεί προκύπτει ένας σημαντικός αριθμός επιπλοκών που επηρεάζουν την ομαλή έκβαση της κύησης, όπως προεκλαμψία, ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης ακόμη και ενδομήτριος θάνατος του εμβρύου. Μια πολύ σημαντική παράμετρος στην όλη αυτή διαδικασία αποτελεί και η αγγειογένεση, η οποία αφορά στη *de novo* δημιουργία αιμοφόρων αγγείων και ακολούθως στην επέκταση του προϋπάρχοντος δικτύου με τη δημιουργία νέων αγγειακών κλάδων καθώς και την κατά μήκος επέκταση των αγγείων. Η πολύπλοκη αυτή διεργασία αποτελεί προϊόν συνεργασίας ενός μεγάλου αριθμού αγγειογενετικών παραγόντων, η έκφραση των οποίων στα διάφορα στάδια της κύησης ρυθμίζει την αγγειογενετική διαδικασία. Οι σημαντικότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι οι: VEGF (Vascular endothelial Growth Factor), PlGF (Placenta Growth Factor) και HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α). Αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτελεί η μελέτη των μεταβολών στην ποσοτική έκφραση των ανωτέρω παραμέτρων σε πλακούντες που προέρχονται από κύσεις με σιδηροπενική αναιμία ή ετερόζυγη β-θαλασσαιμία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μαιευτικής- Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κο Ιωάννη Μεσσήνη που μου ανέθεσε την εργασία αυτή καθώς και για την αμέριστη κατανόηση και υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια αυτής μου της προσπάθειας καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για τις χρήσιμες υποδείξεις και συμβουλές που μου

παρείχε κατά τη συγγραφή του παρόντος πονήματος. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κο Γεώργιο Κουκούλη για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην κα Μαρία Ιωάννου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθειά της στην εξέταση και ανοσοϊστοχημική εκτίμηση των παθολογοανατομικών παρασκευασμάτων καθώς και στον κο Δημήτριο Νικούλη, Βιοπαθολόγο, για την επεξεργασία των δειγμάτων με τη μέθοδο ELISA. Η επεξεργασία των στατιστικών δεδομένων έγινε από την κα Κλεάνθη Γουρουντή, Λέκτορα στο Τμήμα Μαιευτικής του ΤΕΙ Αθήνας, η οποία με βοήθησε ποικιλοτρόπως και την ευχαριστώ θερμά.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην κα Ξένια Βανακάρα, Μαιευτήρα-Γυναικολόγο, Επιμελήτρια Α' στο Π.Π.Γ.Ν.Λάρισας για τις πολύτιμες συμβουλές που μου παρείχε. Στη φίλη μου κα Ηλέκτρα Πολύζου και στον κο Θεόδωρο Γιάγκου για την τεχνική υποστήριξή τους στη διαμόρφωση αυτής της ερευνητικής εργασίας. Θα ήθελα επίσης να αναφέρω ότι είμαι βαθύτατα υποχρεωμένη στην αγαπητή φίλη κα Μαριάννα Νάκου, Παθολογοανατόμο, για τη συμπαράστασή της, την ενθουσιώδη υποστήριξή της σε όλα τα στάδια του εγχειρήματός μου και την προθυμία της να μου παρέχει πάντοτε τη συμβουλή της. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που ήτανε πάντοτε παρούσα σε όλες τις δυσκολίες, έτοιμη να συμβάλλει παντοιοτρόπως και ιδιαίτερα στο γιο μου Τάκη που ελπίζω να με συγχωρήσει για τις ώρες παιχνιδιού που του στέρησα εργαζόμενη για το σκοπό αυτό .

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πλακούντας αποτελεί το όργανο, το οποίο επιτρέπει την επικοινωνία μεταξύ μητέρας και εμβρύου κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής. Οι λειτουργίες του, που αφορούν στη μεταφορά και την έκκριση θρεπτικών και άλλων ουσιών, ξεκινούν πολύ νωρίς και εξελίσσονται παράλληλα με τα διάφορα στάδια ανάπτυξής του.

Για πολλά χρόνια επικρατούσε η άποψη ότι η κατανόηση της ανατομίας του πλακούντα προϋποθέτει τη γνώση λιγοστών στοιχείων για την εμφύτευση και τα αρχικά στάδια εξέλιξής του, καθώς θεωρούνταν ότι οι διαταραχές στην έναρξη της πλακουντοποίησης προκαλούσαν κυρίως αποβολές και όχι διαταραχές της πλακουντιακής δομής και λειτουργίας. Ωστόσο, όσο μεγάλωνε η εμπειρία μας στις μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, διαπιστώνονταν ότι διαταραχές της εμφύτευσης μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στην πλακουντοποίηση και ακολούθως στην ομαλή λειτουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας, προκαλώντας τελικά μη ευνοϊκό περιγεννητικό αποτέλεσμα. Το φάσμα των επιπλοκών κυμαίνεται από την ενδομήτρια καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης (IUGR), τα πλακουντιακά αιματώματα έως και αυξημένα ποσοστά περιγεννητικής θνησιμότητας (Beck & Heywinkel, 1990).

# **ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ**

## **ΑΡΧΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

### **Προεμφυτευτικό στάδιο**

Κατά τις ημέρες 4 και 5 μετά τη σύλληψη και ενώ το μορίδιο εξελίσσεται σε βλαστοκύστη, η τροφοβλάστη αποτελεί την πρώτη ομάδα κυττάρων που θα υποστεί διαφοροποίηση. Μετά τη δημιουργία της τροφοβλάστης, η βλαστοκύστη αποτελείται από μια εσωτερική μάζα κυττάρων η οποία περιβάλλεται από ένα μόνο στρώμα μονοπύρηνων τροφοβλαστικών κυττάρων, το οποίο περιβάλλει όχι μόνο των εμβρυοβλάστη αλλά και την κοιλότητα της βλαστοκύστης. Σε μεταγενέστερα στάδια της κύησης, από την τροφοβλάστη δημιουργούνται μεγάλα τμήματα του πλακούντα και οι υμένες, ενώ από την εσωτερική ομάδα κυττάρων προκύπτουν το έμβρυο και ο ομφάλιος λώρος, καθώς και ο πλακουντιακός μεσεγγυματικός ιστός. Ο τελευταίος προέρχεται από το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα του αρχέγονου εμβρυϊκού ιστού. Τις ημέρες 6-7 μετά τη σύλληψη η βλαστοκύστη εκκολάπτεται από τη διαφανή ζώνη και προσκολλάται στο επιθήλιο της μήτρας για εμφύτευση. Από το στάδιο αυτό και πέρα ξεκινά η δημιουργία του πλακούντα (Aplin JD, 2000).

### **Προκενοτοπιώδες στάδιο (Prelacunar stage)**

Το πρώτο στάδιο της εμφύτευσης ονομάζεται εναπόθεση. Η εμφυτευόμενη βλαστοκύστη στη φάση αυτή αποτελείται από 107 έως 256 κύτταρα (Boyd & Hamilton, 1970). Αποτελεί έναν αποπλατυσμένο σχηματισμό διαστάσεων

0.1X0.3X0.3 mm. Τα περισσότερα από τα κύτταρά του αποτελούν το εξωτερικό τοίχωμα (τροφοβλάστη) και περιβάλλουν την κοιλότητα της βλαστοκύστης.

Η τροφοβλάστη αποτελεί τον πρόδρομο των εμβυικών υμένων, συμπεριλαμβανομένου και του πλακούντα. Η έσω κυτταρική στιβάδα, μια μικρή ομάδα κυττάρων μεγαλύτερου μεγέθους που αποτελεί την εμβρυοβλάστη εναποτίθεται στην έσω επιφάνεια του τροφοβλαστικού σχηματισμού. Η εμφύτευση είναι εφικτή μόνο όταν η βλαστοκύστη έχει τέτοιο προσανατολισμό, ώστε ο εμβρυικός πόλος (το τμήμα της βλαστοκύστης που φέρει στο εσωτερικό της την εμβρυοβλάστη) να προσκολληθεί πρώτος στο ενδομήτριο. Περιστροφή της βλαστοκύστης σε αυτό το στάδιο μπορεί να προκαλέσει ακόμη και διακοπή της κύησης λόγω περιορισμένης επαφής του εμβρυικού πόλου με το επιθήλιο της μήτρας. Έχει περιγραφεί ότι ανάλογα με τον προσανατολισμό της βλαστοκύστης τη στιγμή της εμφύτευσης προκαλούνται ανωμαλίες στην πρόσφυση του ομφαλίου λώρου στο χοριονικό δίσκο (McLennan et al., 1968). Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι σε κυήσεις που προέρχονται από IVF παρατηρείται υψηλότερο ποσοστό ανώμαλων σχημάτων πλακούντα καθώς και περίεργες θέσεις εισόδου του ομφαλίου λώρου, γεγονός που αποδίδεται σε διαταραχή της αλληλεπίδρασης μεταξύ των μητρικών και εμβρυικών κυττάρων τα οποία ρυθμίζουν την εμφύτευση (Jauniaux E et al., 1990).

Η εμφύτευση επιτυγχάνεται με την προσκόλληση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των κυττάρων της βλαστοκύστης πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων της μήτρας. Το φαινόμενο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως “βιολογικό παράδοξο” από πολλούς ερευνητές (Denker et

al.,1990), επειδή τα παραπάνω στοιχεία δεν παρουσιάζουν σε καμιά άλλη περίπτωση την ίδια ιδιότητα.

Μόλις η βλαστοκύστη προσκολληθεί στο μητρικό επιθήλιο, η τροφοβλάστη υπόκειται σε μια περαιτέρω διαφοροποίηση, κατά την οποία πραγματοποιείται συγκυτιακή σύντηξη των μονοπύρηνων κυττάρων της προκειμένου να δημιουργηθεί η αρχική συγκυτιοτροφοβλάστη. Στο στάδιο αυτό της ανάπτυξης, η συγκυτιοτροφοβλάστη αρχίζει να εισδύει στο επιθήλιο της μήτρας, προκειμένου να εξασφαλιστεί η εγκατάσταση της βλαστοκύστης (Huppertz B,2008).

Κατά τις επόμενες ημέρες, το έμβρυο εγκαθίσταται μέσα στο στρώμα του φθαρτού με τη συγκυτιοτροφοβλάστη να σχηματίζει ένα περίβλημα γύρω του. Το υπόλοιπο τμήμα της τροφοβλάστης, θα αποτελέσει την κυτταροτροφοβλάστη, η οποία βρίσκεται στη δεύτερη κυτταρική στιβάδα, δίχως να έρχεται σε επαφή με τους μητρικούς ιστούς. Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης λειτουργούν ως βλαστοκύτταρα, τα οποία διαρκώς διαιρούνται και στη συνέχεια συγχωνεύονται με την συγκυτιοτροφοβλάστη, οδηγώντας σε διαρκή επέκταση αυτής (Potgens et al.,2002). Συνεπώς, σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελεί το μόνο εμβρυικό ιστό, που έρχεται σε άμεση επαφή με τους μητρικούς ιστούς.

### **Κενοτοπιώδες στάδιο (Lacunar stage)**

Την 8η ημέρα μετά τη σύλληψη εμφανίζονται μικρά κενοτόπια μέσα στη διαρκώς αυξανόμενη μάζα της συγκυτιοτροφοβλάστης στο σημείο της εμφύτευσης. Τα κενοτόπια αυτά μεγαλώνουν γρήγορα σε μέγεθος και αρχίζουν να συρρέουν



σχηματίζοντας μεγαλύτερες κοιλότητες. Τα τμήματα της συγκυτιοτροφοβλάστης τα οποία βρίσκονται ανάμεσα στις κοιλότητες αυτές ονομάζονται προσεκβολές. Η εμφάνισή τους οριοθετεί την έναρξη του κενотоπιώδους σταδίου της πλακουντοποίησης, η οποία διαρκεί από τη μέρα 8 έως και τη μέρα 13 μετά τη σύλληψη. Αμέσως μετά την εμφάνιση των κενотоπίων, ο πλακούντας υποδιαιρείται σε τρεις κύριες ζώνες: 1) τον αρχέγονο χοριονικό δίσκο, που βρίσκεται απέναντι από το έμβρυο 2) το σύστημα των κοιλοτήτων μαζί με τις προσεκβολές και 3) τον αρχέγονο βασικό δίσκο, ο οποίος έρχεται σε επαφή με το μητρικό ενδομήτριο.

Κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης, η συγκυτιοτροφοβλάστη διεισδύει μέσα στο ενδομήτριο και έρχεται σε επαφή με τα μητρικά αγγεία και το επιπολής φλεβικό δίκτυο του ενδομητρίου. Η διάβρωση των μικρών αυτών αγγείων οδηγεί στην εμφάνιση των πρώτων κυττάρων αίματος μητρικής προέλευσης μέσα στις κοιλότητες της συγκυτιοτροφοβλάστης (Carter AM., 1997). Η εμφάνιση των πρώτων αυτών κυττάρων μητρικής προέλευσης στα κενотоπία της συγκυτιοτροφοβλάστης ισοδυναμεί με την έναρξη της μητρικής κυκλοφορίας στον πλακούντα. Όμως, ο αριθμός των μητρικών ερυθροκυττάρων μέσα στις κοιλότητες είναι εξαιρετικά μικρός και σε αυτή τη φάση της πλακουντοποίησης δεν μπορούν να ανιχνευτούν αρτηριακές συνδέσεις μέσα στο δίκτυο των κενотоπίων. Η μητρική ροή μέσα στα κενотоπία θα μπορούσε να περιγραφεί ως αργή ροή φλεβικού αίματος (Hamilton et al., 1960).

Το ενδομητρικό στρώμα υπόκειται σε σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Η παρουσία της τροφοβλάστης με τη διαβρωτική δράση προκαλεί

ένα μηχανικό ερέθισμα, το οποίο με τη βοήθεια ορμονικών παραγόντων διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διόγκωση των κυττάρων του ενδομητρικού στρώματος, οδηγώντας στο σχηματισμό των κυττάρων του φθαρτού (Welsh & Enders ,1985).

Οι διαβρωτικές δράσεις της βασικής στιβάδας της συγκυτιοτροφοβλάστης από τη 12η μέρα μετά τη σύλληψη προκαλούν αποσύνθεση των τοιχωμάτων των ενδομητρικών αγγείων. Ερυθροκύτταρα διαφεύγουν από τα αγγεία αυτά προς τις κοιλότητες (Boyd and Hamilton,1970). Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της διεργασίας παραμένει αδιευκρίνιστος.

Στη φάση αυτή, η εμφύτευση θεωρείται ολοκληρωμένη. Το έμβρυο και οι περιβάλλοντες ιστοί έχουν λάβει την πρέπουσα θέση τους μέσα στο ενδομήτριο. Η συγκυτιοτροφοβλάστη παρουσιάζει επίσης αλλαγές. Είναι παχύτερη με μεγαλύτερα κενοτόπια κάτω από τον εμβρυικό πόλο στο σημείο διείσδυσης, ενώ γίνεται λεπτότερη, με μικρότερα κενοτόπια και λιγότερες προσεκβολές όσο απομακρύνεται από αυτόν. Τα εξωεμβρυικά μεσοδερματικά κύτταρα έχουν αρχίσει να μεταναστεύουν στην κορυφή της έσω επιφάνειας των τροφοβλαστικών κυττάρων . Ο συνδυασμός της κυτταροτροφοβλάστης και του εξωεμβρυικού μεσοδέρματος θα αποτελέσει το χόριο (Enders et al.,1988, Luckett, 1978).

Ξεκινώντας τη 12η ημέρα μετά τη σύλληψη, οι κυτταροτροφοβλάστες του χοριονικού δίσκου εισδύουν στη συγκυτιοτροφοβλαστική μάζα των προσεκβολών και φτάνουν στη μητρική πλευρά του πλακούντα μέχρι την ημέρα 15. Αυτή είναι η πρώτη φορά, που ένα εμβρυικό κύτταρο ή άλλος ιστός πέρα της συγκυτιοτροφοβλάστης έρχεται σε άμεση επαφή με τους μητρικούς ιστούς. Συνεπώς,

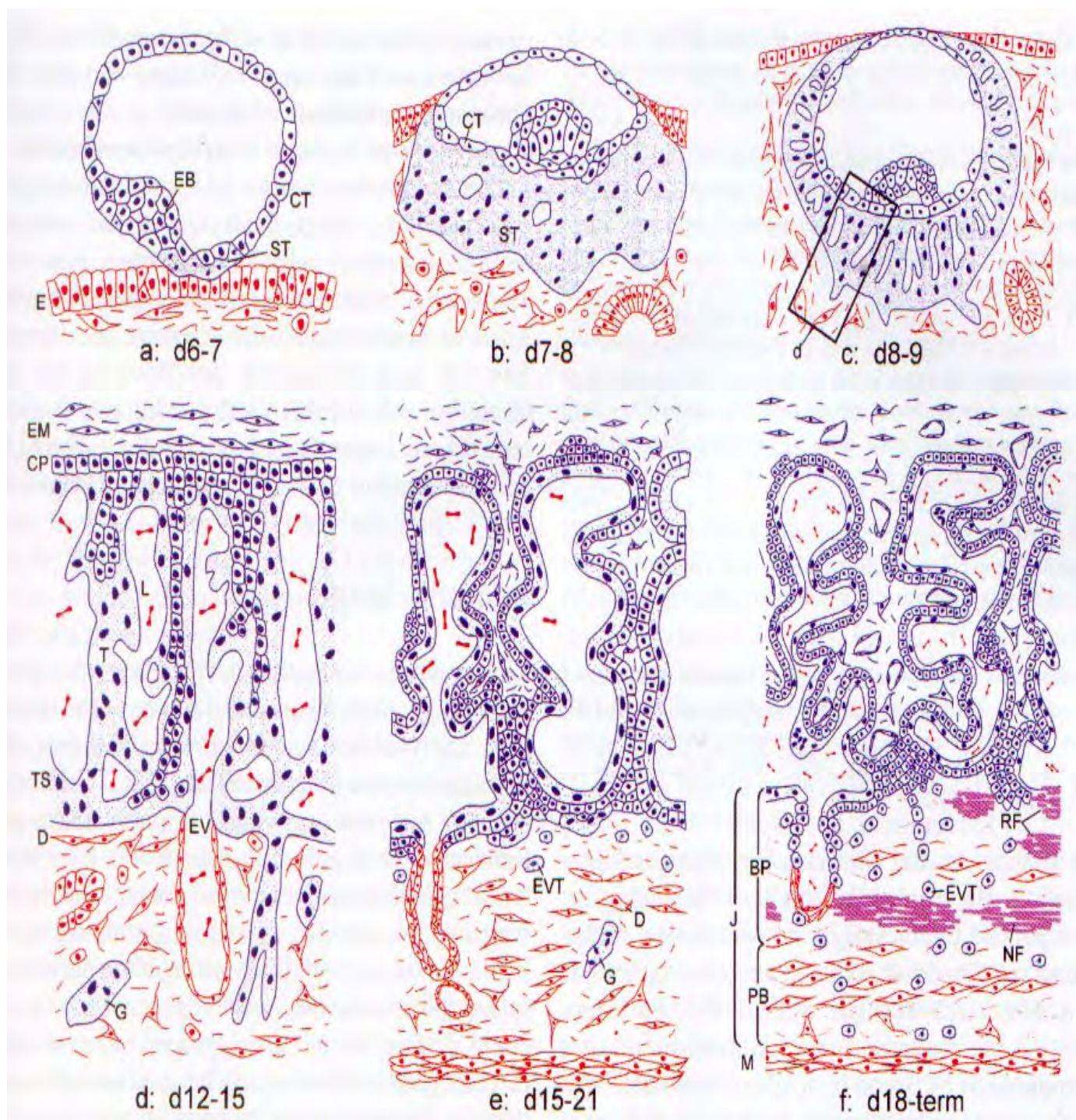
μόλις την 5η εβδομάδα μετά τη σύλληψη οι πρώτοι κυτταροτροφοβλάστες εγκαταλείπουν τον πλακούντα και διαφοροποιούνται σε εξωλάχνιους κυτταροτροφοβλάστες και από τον αρχικό βασικό δίσκο εισδύουν ακόμη βαθύτερα στο ενδομητρικό στρώμα ανάμεσα σε αδένες και αγγεία. Μια ομάδα αυτών των κυττάρων εισδύει στα τοιχώματα των σπειροειδών αρτηριών, εισχωρώντας τελικά στον αυλό τους (Pijneborg, 1990,; Kaufmann et al.,2003). Η φυσιολογική αυτή μετατροπή των σπειροειδών αρτηριών περιλαμβάνει την καταστροφή του αρτηριακού μυϊκού χιτώνα και αντικατάσταση του ενδοθηλίου από τροφοβλαστικό ιστό ( Kaufmann et al.,2003).

### **Λαχνικό στάδιο**

Τη 13η μέρα μετά τη σύλληψη τα διαφράγματα αρχίζουν να αναπτύσσουν τις πρώτες παράπλευρες προσεκβολές, οι οποίες μπορεί να είναι απλώς συγκυτιοτροφοβλαστικές εκβλαστήσεις ή να περιέχουν ήδη ένα πυρήνα γεμάτο με κυτταροτροφοβλάστες. Αυτές οι κυτταροτροφοβλαστικές δομές καλούνται πρωτογενείς λάχνες , οι οποίες τώρα προβάλλουν μέσα στα μεσολάχνια διαστήματα, τις μέχρι τώρα καλούμενες κοιλότητες. Σύντομα, τα εξωεμβρυικά μεσοδερμικά κύτταρα του χοριονικού δίσκου ακολουθούν την πορεία των κυτταροτροφοβλαστών και επίσης εισχωρούν μέσα στα διαφράγματα. Αυτές οι δύο διαδικασίες δηλώνουν την έναρξη του λαχνικού σταδίου της πλακουντοποίησης. Περαιτέρω πολλαπλασιασμός των κυττάρων, με εμφάνιση διακλαδώσεων στις πρωτογενείς λάχνες οδηγεί στην ανάπτυξη των αρχέγονων λαχνικών δικτύων, κλάδοι των οποίων προέχονται από τα μέχρι τώρα διαφραγμάτια (Huppertz , 2008).

Μόλις δύο ημέρες μετά, μεσεγγυματικά κύτταρα που προέρχονται από το εξωεμβρυικό μεσέγγυμα του χοριονικού δίσκου αρχίζουν να διεισδύουν στις λάχνες μετατρέποντάς τις σε δευτερογενείς λάχνες. Μέσα σε λίγες ημέρες το μεσέγγυμα εκτείνεται περιφερικά των λαχνών και κοντά στη βάση των διάμεσων λαχνών (Boyd & Hamilton ,1970).

Με καθυστέρηση λίγων ημερών και μεταξύ της 18ης και 20ης ημέρας, αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα εμβρυικά αγγεία στο μεσέγγυμα, τα οποία προέρχονται από πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα (Demir et al.,1989). Η εμφάνιση διασταυρούμενων αγγείων στο στρώμα των λαχνών σηματοδοτεί την ανάπτυξη των τεταρτογενών λαχνών, οι οποίες θα αποτελέσουν την πλειοψηφία των λαχνών μέχρι και το τέλος της κύησης (Jackson et al.,1992). Περίπου την ίδια στιγμή αρχίζει η εμφάνιση εμβρυικών αγγείων στις λάχνες, ενώ η αλλαντοΐδα συγχωνεύεται με το χοριονικό δίσκο. Σύμφωνα με τον Benirschke (1965), αλλαντοϊκά αγγεία εμφανίζονται μέσα στο χοριονικό δίσκο καθώς και μέσα στις μεγαλύτερες λάχνες. Στο σημείο αυτό έρχονται σε επαφή με τα τμήματα των αγγείων, που υπάρχουν εντός των λαχνών. Πλήρης εμβρυοπλακουντιακή κυκλοφορία εγκαθίσταται περί την αρχή της 5ης εβδομάδας μετά τη σύλληψη, όταν τα παραπάνω αγγεία συγχωνευτούν σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο αγγειακό δίκτυο. Με τον τρόπο αυτό, η μητρική και εμβρυική κυκλοφορία έρχονται σε στενή επαφή, διαχωριζόμενες από τον πλακουντιακό φραγμό, ο οποίος αποτελείται από τις ακόλουθες στιβάδες: (1) μια συνεχή στιβάδα συγκυτιοτροφοβλάστης που καλύπτει την επιφάνεια των λαχνών και



**Εικόνα 1.** Σχηματική αναπαράσταση των αρχικών σταδίων της πλακουντιακής ανάπτυξης. (a,b): Προκενοτοπιώδες στάδιο. (c) : Κενοτοπιώδες στάδιο (d): Μετάβαση από το κενοτοπιώδες στάδιο στην αρχέγονη λαχνική φάση (e) : Δευτερογενής λαχνική φάση (f) : Τεταρτογενής λαχνική φάση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα βασικά τμήματα των αγκυροβόλων λαχνών εντοπίζονται εξολοκλήρου στην τροφοβλάστη δημιουργώντας κυτταρικές στήλες. Οι μητρικοί ιστοί χρωματίζονται με κόκκινο χρώμα και οι εμβρυικοί ιστοί με μπλε χρώμα.

των μεσολαχνίων διαστημάτων, (2) μια αρχικά συνεχόμενη και αργότερα διαλείπουσα στιβάδα κυτταροτροφοβλάστης (κύτταρα Langhans), (3) μια τροφοβλαστική βασική μεμβράνη, (4) συνδετικό ιστό και (5) εμβρυικό ενδοθηλιακό ιστό.

## **ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ**

### **Βασικές δομές του δικτύου των λαχνών**

Σχεδόν το σύνολο της μητρικής-εμβρυικής επικοινωνίας πραγματοποιείται μέσω του δικτύου των λαχνών, ενώ μόνο ελάχιστο τμήμα αυτής μέσω των εξωπλακουντιακών υμένων. Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος των μεταβολικών και ενδοκρινών δραστηριοτήτων του πλακούντα εντοπίζονται στις λάχνες (Polin et al., 2004).

Καθ'όλη τη διάρκεια της πλακουντοποίησης, προκύπτουν διαφορετικοί τύποι λαχνών, οι οποίες έχουν διαφορετικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, όλες οι λάχνες παρουσιάζουν την ίδια βασική δομή, η οποία περιγράφεται παρακάτω:

Η **συγκυτιοτροφοβλάστη** αποτελεί μια συνεχή επιθηλιακή στιβάδα, η οποία εκτείνεται πάνω από τις επιφάνειες όλων των δικτύων των λαχνών, διαχωρίζοντας το εσωτερικό τους από το μητρικό αίμα, το οποίο ρέει γύρω τους. Το ενδιαφέρον στοιχείο σχετικά με τη δομή της, όπως αποδεικνύουν και οι μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, είναι ότι δεν αποτελείται από μεμονωμένα κύτταρα, αλλά αποτελεί μια συνεχή, αδιάλειπτη, πολυπύρηνη επιφάνεια, χωρίς σαφή διαγραφή των κυτταρικών ορίων. Μόνο αργότερα στην κύηση, ως αποτέλεσμα της εστιακής εκφύλισης της συγκυτιοτροφοβλάστης, εμφανίζονται ινώδεις πλάκες, οι οποίες μπορεί να



απομονώσουν μικρές νησίδες αυτής από τη συνέχεια της συγκυτιοτροφοβλάστης (Kaufmann & Stegner, 1972; Schweikhart & Kaufmann, 1977).

Ακριβώς κάτω από τη συγκυτιοτροφοβλάστη υπάρχει μια στιβάδα **κυτταροτροφοβλάστης**, η οποία αποτελείται από μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων, τα **κύτταρα Langhans**, τα οποία αποτελούν τα βλαστικά κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης και υποστηρίζουν τη ανάπτυξη και αναγέννησή τους. Κατά την αρχή της κύησης, η στιβάδα αυτή είναι συνεχής, ενώ αργότερα γίνεται διαλείπουσα. Νεώτερες μελέτες δείχνουν ότι τα κύτταρα Langhans επιμένουν μέχρι το τέλος της κύησης, αποτελώντας όμως λιγότερο από το 20% της συγκυτιοτροφοβλάστης. Τα κύτταρα της αδιαφοροποίητης κυτταροτροφοβλάστης έχουν σχήμα κυβοειδές και κυτταρόπλασμα, το οποίο περιέχει ελάχιστα μόνο οργανίδια (Myatt, 1992). Η διαφοροποίηση οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσων κυττάρων με κυτταρόπλασμα, το οποίο περιέχει μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων και ελεύθερων ριβοσωμάτων καθώς και ενδοπλασματικό δίκτυο και mRNA. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν έντονη ενζυμική δραστηριότητα και εμπλέκονται σε διεργασίες αερόβιας και αναερόβιας γλυκόλυσης (Benirschke et al., 2000; Kaufmann et al., 1972). Τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση οργανιδίων, πρωτεϊνών και mRNA σε σύγκριση με την υποκείμενη συγκυτιοτροφοβλάστη. Αυτά είναι και τα κύτταρα, τα οποία θα συγχωνευτούν μαζί της προκειμένου να αποτελέσουν τμήμα του συγκυτιακού στρώματος, μαζί με όλα τα ανωτέρω στοιχεία τα οποία περιλαμβάνουν.

Η **τροφοβλαστική βασική μεμβράνη** διαχωρίζει την κυτταροτροφοβλάστη και τη

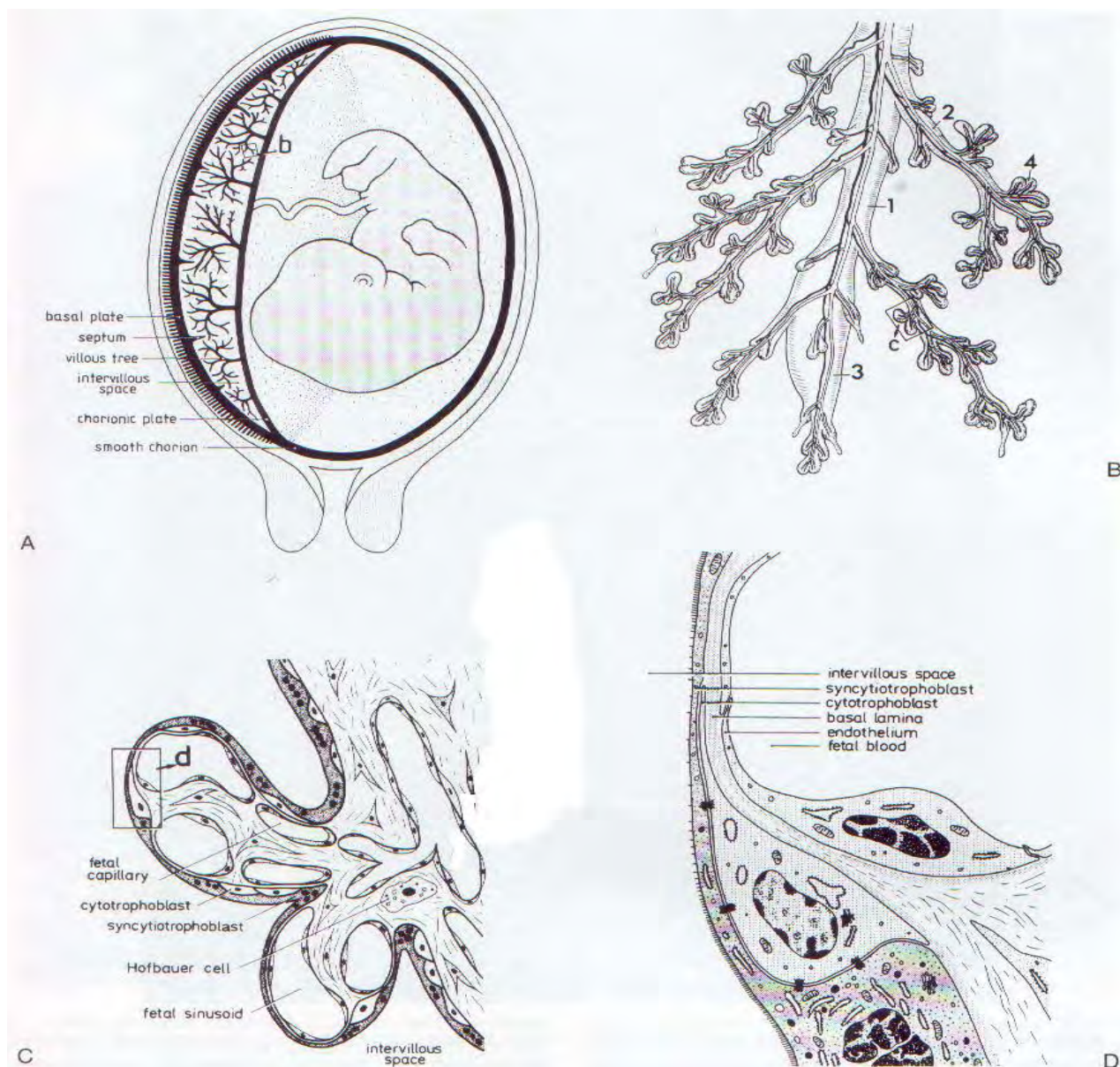
συγκυτιοτροφοβλάστη από το στρώμα της λάχνης. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το πάχος της υπολογίζεται σε 20-50 nm. Αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη και φιμπρονεκτίνη, η οποία έχει πολλά σημεία πρόσδεσης με διάφορους τύπους κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών (Castelucci et al.,1993).

Η τροφοβλαστική βασική μεμβράνη λειτουργεί υποστηρικτικά για τη στιβάδα της κυτταροτροφοβλάστης και της επιτρέπει ένα βαθμό κινητικότητας. Πρωτεΐνες, όπως η τενασίνη, η οποία αλληλεπιδρά με τη φιμπρονεκτίνη, μπορούν να αναστείλουν την πρόσφυση των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, επιτρέποντας σε κύτταρα Langhans να μεταναστεύουν κατά μήκος του βασικού πετάλου προς τις περιοχές στις οποίες απαιτείται να γίνει συγκυτιακή σύντηξη (Castelucci et al.,1991).

Το βασικό αρχιτεκτονικό στοιχείο του **στρώματος** των λαχνών είναι ο συμπαγής συνδετικός ιστός, ο οποίος σχηματίζει ένα δίκτυο, το οποίο ενσωματώνει ίνες συνδετικού ιστού, ελεύθερα κύτταρα του συνδετικού ιστού (κύτταρα Hofbauer) και εμβρυικά αγγεία. Ανάλογα με την ηλικία της κύησης, έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 5 διαφορετικοί τύποι στρωματικών κυττάρων, που αντιστοιχούν σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης, από αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, μέχρι μυοϊνωδοβλάστες υψηλής διαφοροποίησης, (Kohnen et al., 1995; Demir et al.,1997).

Τα πλακουντιακά μακροφάγα ή **κύτταρα Hofbauer** εμφανίζονται για πρώτη φορά στο στρώμα κατά την 5η εβδομάδα της κύησης. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται είτε από πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα του στρώματος είτε από την διείσδυση εμβρυικών κυττάρων του νωτιαίου μυελού μέσα στο στρώμα των λαχνών. Τα κύτταρα αυτά θα υποστούν διαφοροποίηση σε μακροφάγα μόλις ολοκληρωθεί η





**Εικόνα 2.** Βασική μορφολογία των ανθρώπινων πλακουντιακών λαχνών **(Α)** Απλοποιημένη αναπαράσταση κατά μήκος της μήτρας, του πλακούντα και των υμένων σε ανθρώπινη κύηση. Ο χοριονικός σάκκος (με μαύρο χρώμα), αποτελείται από τον πλακούντα (αριστερό ήμισυ) και τους υμένες (δεξιό ήμισυ) **(Β)** Περιφερικές διακλαδώσεις ενός ώριμου δικτύου λαχνών που αποτελείται από μια στελεχιαία λάχνη (1) η οποία συνεχίζει προς άωρη διάμεση λάχνη (3) Οι λεπτοί παράπλευροι κλάδοι (2), αποτελούν τις ώριμες διάμεσες λάχνες, η επιφάνεια των οποίων καλύπτεται από πυκνές, βοτρυοειδείς τελικές λάχνες (4). **(C)** Απλοποιημένη τομή μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δύο τελικών λαχνών όπως εκφύονται από μια ώριμη, διάμεση λάχνη **(D)** Εικόνα του πλακουντιακού φραγμού μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, η οποία απεικονίζει τα τυπικά του στρώματα. **(Intervillous space:** μεσολάχνιο διάστημα. **Syncytiotrophoblast:** Συγκυτιοτροφοβλάστη. **Cytotrophoblast:** Κυτταροτροφοβλάστη. **Basal lamina:** Βασική μεμβράνη. **Endothelium:** Ενδοθήλιο. **Fetal Blood:** Εμβρυικό αίμα. **Fetal Capillary:** Εμβρυικό τριχοειδές).

επικοινωνία μεταξύ πλακούντα και εμβρύου ( Benirschke et al.,2000).

Τα αγγεία του πλακούντα περιβάλλονται από μη θυριδωτό επιθήλιο καθόλη τη διάρκεια της κύησης, το οποίο βοηθά στην επικοινωνία με τα παρακείμενα κύτταρα.

Τα τριχοειδή αγγεία και οι κόλποι που βρίσκονται μέσα στις λάχνες περιβάλλονται από μια βασική μεμβράνη ενώ η διάμετρος του αυλού τους ρυθμίζεται από αυτοκκρινείς ή παρακκρινείς παράγοντες, λόγω απουσίας νευρικού ιστού στον πλακούντα (Myatt ,1972).

Το **ινοειδές**, τέλος, αποτελεί ομοιογενές υλικό, το οποίο είναι παρόν σε όλα τα στάδια εξέλιξης του πλακούντα. Εντοπίζεται στα μεσολάχνια διαστήματα του χοριονικού και βασικού δίσκου, καλύπτοντας πλήρως ή μερικώς τις πλακουντιακές λάχνες. Η σύστασή ερευνήθηκε πρόσφατα και ταξινομήθηκε σε δύο τύπους: το ινοειδές του τύπου της ινικής και το ινοειδές του τύπου της μητρικής ουσίας (Frank et al. ,1994; Hupperzt et al.,1996). Το πρώτο περιέχει ινωδογόνο και ινική και δεν περιέχει κανενός είδους κύτταρο. Αποτελεί προϊόν θρόμβωσης και κυτταρικής εκφύλισης του μητρικού αίματος (Faulk , 1989). Το ινοειδές του τύπου της μητρικής ουσίας εντοπίζεται σε βαθύτερα στρώματα, χωρίς να έρχεται ποτέ σε επικοινωνία με το μητρικό αίμα. Αποτελεί εκκριτικό προϊόν των εξωλαχνικών τροφοβλαστικών κυττάρων και περιέχει όλους τους τύπους εξωκυττάριας μητρικής πρωτεΐνης, όπως φιβρονεκτίνη, τενασίνη, κολλαγόνο τύπου IV, βιτρονεκτίνη και μεροσίνη (Castellucci et al.,1993; King et al.,1997).

## Αρχιτεκτονική του δικτύου των λαχνών

### Κατάταξη των λαχνικών τύπων

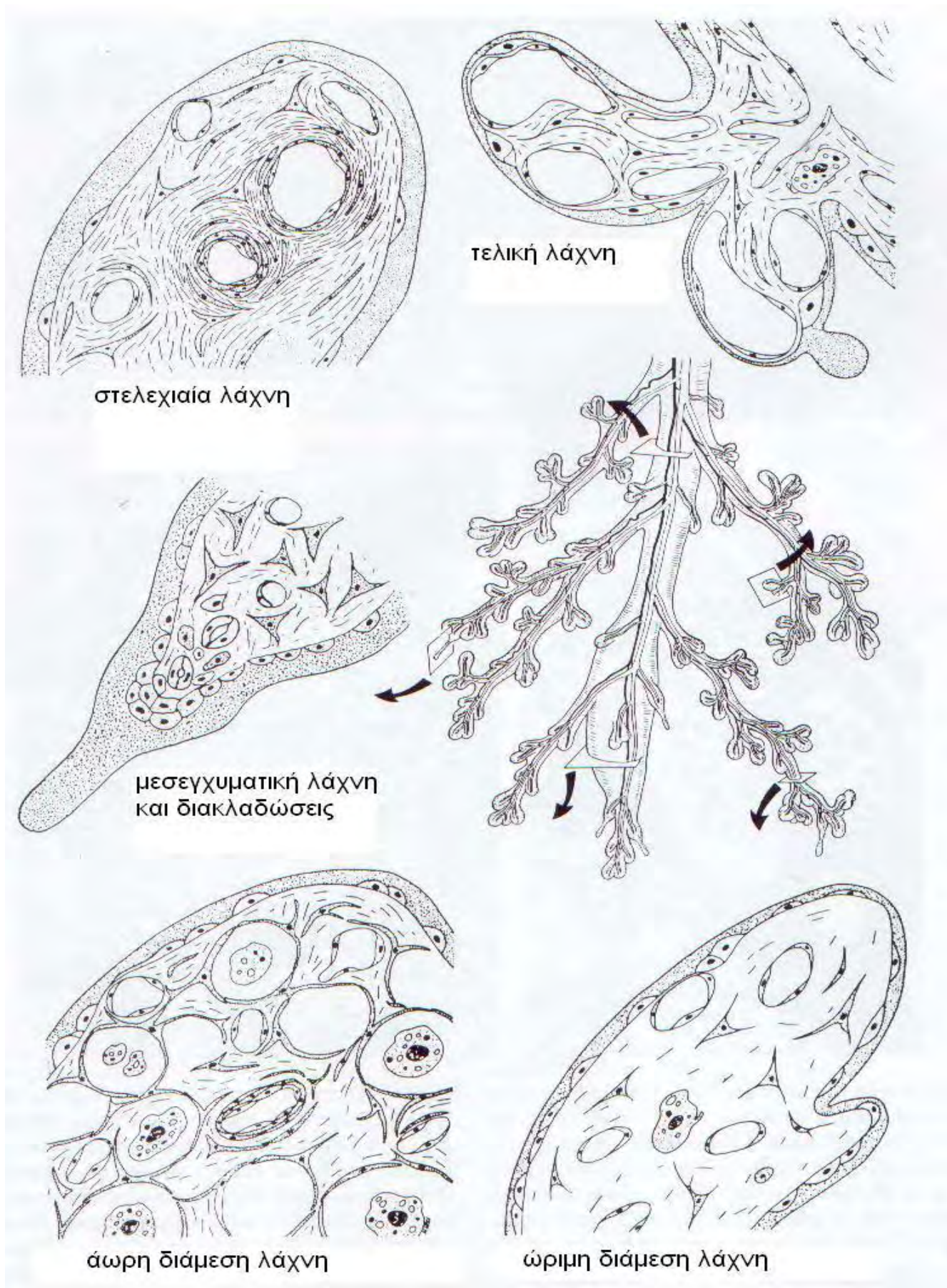
Η διακλάδωση του λαχνικού δικτύου μπορεί να υποδιαιρεθεί σε διάφορους τύπους, ανάλογα με τη δομή του στρώματος, των αγγείων και τη θέση που κατέχουν μέσα στο δίκτυο αυτό. Έχουν περιγραφεί συνολικά πέντε τύποι λαχνών, μερικοί από τους οποίους διαιρούνται σε υποκατηγορίες και περιγράφονται αμέσως παρακάτω. Θα πρέπει να σημειωθεί ξανά ότι όλες οι λάχνες προέρχονται από μια πρόδρομη δομή τις μεσεγγυματικές λάχνες του πρώτου σταδίου της πλακουντοποίησης (Castellucci et al., 2000).

### Στελεχιαίες λάχνες

Οι στελεχιαίες λάχνες αποτελούνται από συμπυκνωμένο ινώδες στρώμα, αρτηρίες και φλέβες ή αρτηριόλια και φλεβίδια. Περιλαμβάνουν τις ακόλουθες δομές:

- Τα **κύρια στελέχη (truncus chorii)**, μέσω των οποίων γίνεται η σύνδεση με το χοριονικό δίσκο.
- Τους **κύριους κλάδους (rami chorii)**, οι οποίοι μπορούν να παρουσιάζουν μέχρι και 4 διακλαδώσεις. Πρόκειται για βραχείς, παχείς κλάδους που εκφύονται από τα κύρια στελέχη κοντά στον χοριονικό δίσκο.
- Δύο έως 30 (κατά μέσο όρο 10) **κλαδίσκους (ramuli chorii)**. Πρόκειται για λεπτότερους κλάδους, οι οποίοι εκτείνονται στην περιφέρεια του λαχνικού δικτύου.
- Τέλος, μια ειδική κατηγορία στελεχιαίων λαχνών αποτελούν οι **αγκυροβόλοι λάχνες (anchoring villi)**, οι οποίες είναι κλαδίσκοι που συνδέονται με το





**Εικόνα 3.** Απλοποιημένη απεικόνιση περιφερικού τμήματος ενός ώριμου πλακουντιακού λαχνικού δικτύου καθώς και τυπικές τομές διαφόρων τύπων λαχνών.

βασικό δίσκο μέσω μιας στιβάδας κυττάρων, που χάρη στον πολλαπλασιασμό τους επιτυγχάνεται η ανάπτυξη των ανωτέρω δομών.

### **Άωρες διάμεσες λάχνες**

Οι άωρες διάμεσες λάχνες αποτελούν ανώριμες, περιφερικές δίκην βολβού προεκτάσεις των στελεχιαίων λαχνών, οι οποίες εντοπίζονται μεταξύ των στελεχιαίων λαχνών και των περιφερικών κλάδων και υπερτερούν στους ανώριμους πλακούντες. Υπό κανονικές συνθήκες, ο τύπος αυτός παραμένει σε μικρές ομάδες στο κέντρο των λαχνικών δικτύων και αντιπροσωπεύει τις άωρες, πρόδρομες μορφές των στελεχιαίων λαχνών.

### **Ώριμες διάμεσες λάχνες**

Πρόκειται για μακριές, λεπτές, περιφερικές διακλαδώσεις, που χαρακτηρίζονται από απουσία αγγείων και την παρουσία μικρής διάμεσης στιβάδας

### **Τελικές λάχνες**

Αποτελούν τις τελικές, βοτρυοειδείς διακλαδώσεις των διάμεσων ώριμων λαχνών, που χαρακτηρίζονται από σημαντικό βαθμό αγγείωση και την παρουσία διατεταμένων φλεβωδών κόλπων. Αντιπροσωπεύουν την κύρια τοποθεσία μητρικής-εμβρυικής επικοινωνίας.

### **Μεσεγχυματικές λάχνες**

Οι μεσεγχυματικές λάχνες αντιστοιχούν στις πιο πρωτόγονες μορφές λαχνών. Υπερτερούν στα πρώτα στάδια της κύησης οπότε και αποτελούν τις πρόδρομες μορφές των άωρων διάμεσων λαχνών. Στα τελευταία στάδια της κύησης, αποτελούν αδιαφοροποίητες, μικρές και λεπτές δομές, που εντοπίζονται πρωτίστως κατά μήκος

των επιφανειών των άωρων διάμεσων λαχνών ή στις παρυφές των ώριμων διάμεσων λαχνών. Στη φάση αυτή, λειτουργούν ως ζώνες πολλαπλασιασμού και περαιτέρω διακλάδωσης των λαχνών.

Το φαινόμενο της διακλάδωσης των λαχνών αποτελεί σημείο “κλειδί” για την ανάπτυξη του πλακούντα. Η σημασία μάλιστα των μεσεγχυματικών λαχνών για την κατανόηση του όλου φαινομένου είναι θεμελιώδης (Castellucci et al., 2000). Οι μεσεγχυματικές λάχνες είναι αυτές που άμεσα ή έμμεσα θα διαφοροποιηθούν σε όλους τους άλλους τύπους λαχνών, που περιγράφηκαν ανωτέρω. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι την 5η εβδομάδα μετά τη σύλληψη όλες οι πλακουντιακές λάχνες είναι μεσεγχυματικές (Castellucci et al., 1990). Στη συνέχεια, ένας αυξανόμενος αριθμός λαχνών μετατρέπεται σε άωρες διάμεσες λάχνες, που χαρακτηρίζονται από αύξηση της διαμέτρου της λάχνης καθώς και την παρουσία πολλών διαύλων επιμήκως προσανατολισμένων εντός του στρώματος (Castellucci & Kaufmann, 1982). Οι άωρες διάμεσες λάχνες μετατρέπονται τελικά σε στελεχιαίες λάχνες, μέσω της εμφάνισης ινωδών στοιχείων στο στρώμα γύρω από τα εμβρυικά αγγεία, τα οποία ταυτόχρονα μετατρέπονται σε αρτηρίες και φλέβες. Η διαρκής ελάττωση του πληθυσμού των μεσεγχυματικών και των άωρων διάμεσων λαχνών προς όφελος των στελεχιαίων λαχνών αντισταθμίζεται από τη συνεχή εκβλάστηση μεσεγχυματικών λαχνών κατά μήκος των επιφανειών των μεσεγχυματικών και των άωρων διάμεσων λαχνών. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζεται ταχύτατη αύξηση της συνολικής μάζας των λαχνών και παρέχεται επαρκής επιφάνεια για τη μητρική-εμβρυική επικοινωνία.

Από την 23η εβδομάδα μετά τη σύλληψη, λαμβάνει χώρα ένα εξαιρετικά σημαντικό

γεγονός για την ανάπτυξη του πλακούντα. Η ανάπτυξη των λαχνών αλλάζει κατεύθυνση. Οι μεσεγγυματικές λάχνες μετατρέπονται κυρίως σε ώριμες διάμεσες λάχνες παρά σε άωρες (Castellucci et al., 1990). Οι ώριμες διάμεσες λάχνες διαφέρουν από τις άωρες, όχι μόνο στην απουσία στρωματικών διαύλων, στη μικρότερη κυτταροτροφοβλαστική πυκνότητα και την καλύτερη αγγείωση αλλά και στο ότι δεν διαφοροποιούνται σε στελεχιαίες λάχνες. Απεναντίας, κατά μήκος των επιφανειών τους παράγουν τελικές λάχνες με αυξημένη αγγείωση, οι οποίες αποτελούν τις πιο αποτελεσματικές δομές για τη διάχυση ουσιών ανάμεσα στη μητέρα και το έμβρυο (Benirschke & Kaufmann, 2000). Η διαφοροποίηση των μεσεγγυματικών λαχνών προς ώριμες διάμεσες λάχνες θα λαμβάνει χώρα διαρκώς από την 23η εβδομάδα μέχρι και το τέλος της κύησης. Καθυστέρηση της αλλαγής κατεύθυνσης προς το σχηματισμό διάμεσων λαχνών θα οδηγήσει στην επικράτηση των μεσεγγυματικών και άωρων διάμεσων λαχνών, σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των λαχνικών δικτύων και στη δημιουργία ενός μεγάλου, αδιαφοροποιήτου πλακούντα, ο οποίος είναι λειτουργικά ανεπαρκής. Η κατάσταση αυτή σχετίζεται με συμβάματα, όπως η ασυμβατότητα Rhesus ή με την ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης (IUGR) (Macara et al., 1995;1996; Todros et al., 1999).

Αντιθέτως, η πολύ γρήγορη έναρξη της μετατροπής προς την κατεύθυνση των ώριμων διάμεσων λαχνών οδηγεί προς την αναστολή της ανάπτυξης των λαχνών, με αποτέλεσμα την παρουσία ενός ασυνήθιστα μικρού σε μέγεθος πλακούντα, ο οποίος παρά την παρουσία διαφοροποιημένων λαχνών, δεν μπορεί να είναι λειτουργικός, καθώς δεν παρέχει επαρκή επιφάνεια ανταλλαγής. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν

κυήσεις IUGR με αυξημένες αντιστάσεις στις ομφαλικές αρτηρίες. Αυτές οι περιπτώσεις διαταραχής της ανάπτυξης του πλακούντα είναι αρκετά συχνές και καταλήγουν σε ενδομήτριο θάνατο του εμβρύου ή σε κακή έκβαση της κύησης (Kingdom & Kaufmann, 1997).

## **ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΣΕ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΗ ΚΥΗΣΗ**

Ο πλακούντας στην τελειόμηνη κύηση αποτελεί ένα στρογγυλό δισκοειδές όργανο με διάμετρο περίπου 22 εκ, πάχος 2.5 εκ και μέσο όρο βάρους 470 γραμ. Φυσικά, υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις από πλακούντα σε πλακούντα, ανάλογα με τον τρόπο τοκετού. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όταν πραγματοποιείται μορφομετρική ανάλυση του πλακούντα θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν παράγοντες που σχετίζονται με το χρόνο και τη θέση απολίνωσης του ομφαλίου λώρου, διότι η απώλεια μητρικού/εμβρυικού αίματος θα επηρεάσει σημαντικά τις διαστάσεις του (Bouw et al., 1976).

### **Εμβρυική επιφάνεια του πλακούντα**

Ο χοριονικός δίσκος αντιπροσωπεύει την εμβρυική επιφάνεια του πλακούντα, η οποία καλύπτεται από το άμνιο. Το άμνιο αποτελείται από μονόστιβο επιθήλιο και το αμνιακό μεσέγγχυμα, το οποίο είναι ανάγγειος συνδετικός ιστός. Το αμνιακό μεσέγγχυμα είναι πολύ χαλαρά συνδεδεμένο με το χοριονικό μεσέγγχυμα και μπορεί πολύ εύκολα να αποχωριστεί από τον πλακούντα.

Ο ομφάλιος λώρος εισδύει σχετικά έκκεντρα στο χοριονικό δίσκο. Το χοριονικό

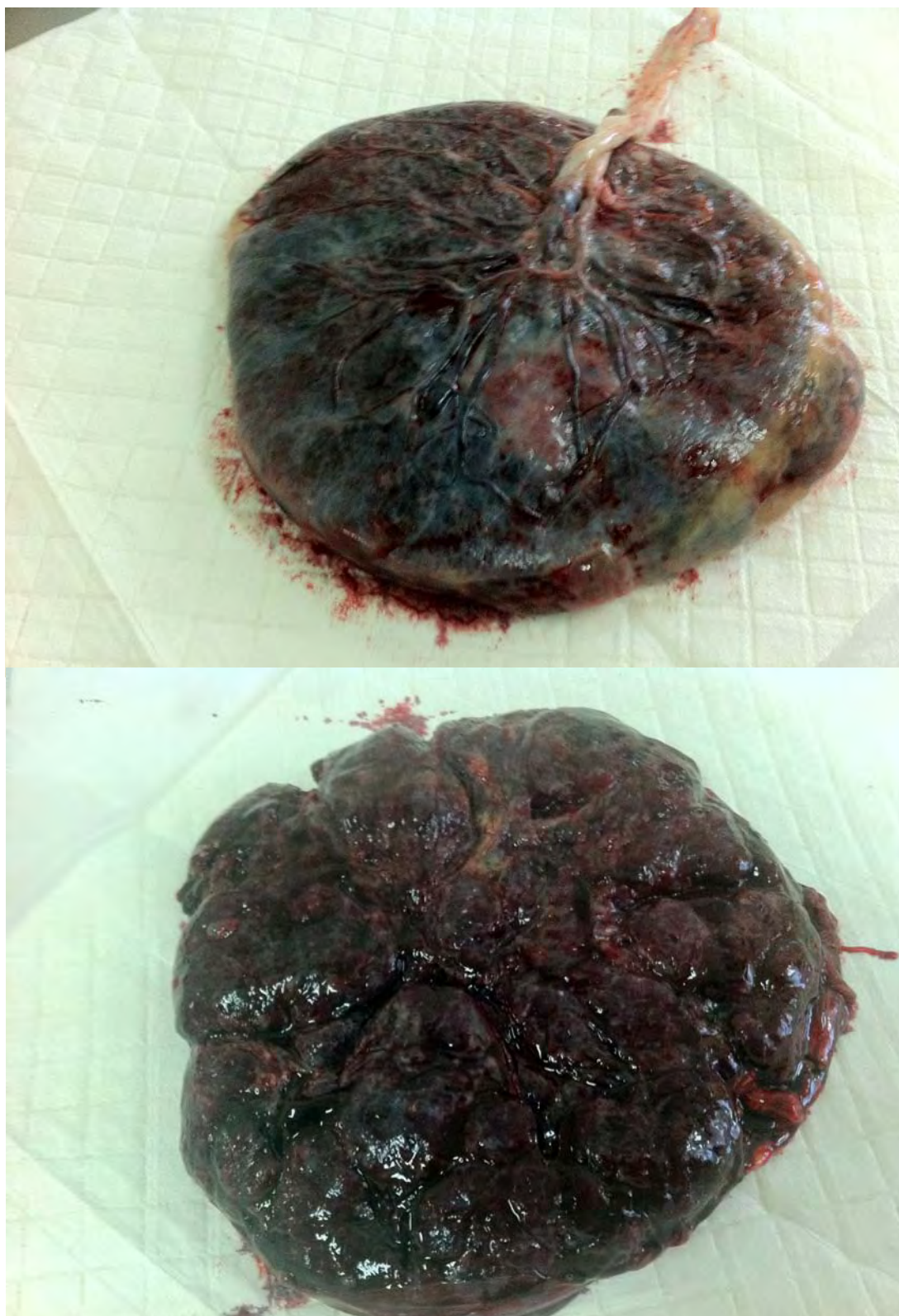


μεσέγγυμα περιέχει τα αγγεία του χορίου τα οποία βρίσκονται σε συνέχεια με τα αγγεία του ομφαλίου λώρου. Τα αγγεία του χορίου, προερχόμενα από τις 2 ομφαλικές αρτηρίες διακλαδίζονται με φυγόκεντρο τρόπο μέχρι τους τελικούς τους κλάδους, οι οποίοι αιματώνουν τα δίκτυα των λαχνών. Οι χοριονικές φλέβες αποτελούν άμεση συνέχεια των φλεβών του δικτύου των λαχνών και συνήθως διασταυρώνονται κάτω από τις αρτηρίες. Στη συνέχεια όλες αυτές οι φλέβες συνενώνονται στη μονήρη ομφαλική φλέβα.

### **Μητρική επιφάνεια του πλακούντα**

Ο βασικός δίσκος αντιπροσωπεύει τη μητρική επιφάνεια του πλακούντα. Αποτελεί μια επιφάνεια, η οποία προκύπτει τεχνητά μετά τον τοκετό, ύστερα από το διαχωρισμό του πλακούντα από το τοίχωμα της μήτρας. Ο βασικός δίσκος αποτελεί μείγμα εμβρυικού εξωλαχνικού τροφοβλαστικού ιστού και διαφόρων μητρικών κυττάρων του φθαρτού, όπως κύτταρα του στρώματος του φθαρτού, φονικά κύτταρα (NK cells), μακροφάγα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Επίσης, ο βασικός δίσκος περιέχει μεγάλες ποσότητες εξωκυττάριας μητρικής ουσίας, ινώδους και θρόμβων αίματος (Huppertz, 2008).

Ένα σύστημα αυλάκων υποδιαιρεί το βασικό δίσκο σε 10-40 ελαφρώς υπεργερμένες περιοχές, οι οποίες καλούνται κοτυληδόνες. Οι αύλακες αυτές, αντιστοιχούν στο εσωτερικό του πλακούντα στα πλακουντιακά διαφράγματα. Οι κοτυληδόνες, που



**Εικόνα 4.** Εμβρυική (πάνω εικόνα) και μητρική (κάτω εικόνα) ενός ώριμου, ανθρώπινου πλακούντα αμέσως μετά τον τοκετό. Παρατηρείται έκκεντρη είσοδος του ομφαλίου λώρου στον πλακούντα, η οποία αποτελεί σύνηθες εύρημα. Οι χοριακές αρτηρίες διασταυρώνονται με τις αντίστοιχες φλέβες. Η εμβρυική επιφάνεια υποδιαιρείται σε κοτυληδόνες ποικίλου μεγέθους, οι οποίες αφορίζονται από ένα διαλείπον δίκτυο βαθέων, σκουρόχρωμων αυλάκων.

διακρίνονται στην πλακουντιακή επιφάνεια, βρίσκονται σε αντιστοιχία με τις περιοχές των δικτύων των λαχνών που ξεκινούν από τον χοριονικό δίσκο και καταλήγουν στα μεσολάχνια διαστήματα. Στον τελειόμηνο πλακούντα, από τον χοριονικό δίσκο ξεκινούν 60-70 δίκτυα λαχνών (ή εμβρυικά λοβίδια), έτσι ώστε τελικά μια κοτυληδόνα να αποτελείται από ένα έως τέσσερα λοβίδια (Kaufmann, 1985). Στην περιφέρεια του πλακούντα, ο χοριονικός και ο βασικός δίσκος συμφύονται και σχηματίζουν τους εμβρυικούς υμένες, οι οποίοι αποτελούνται από τρία στρώματα το άμνιο, με το επιθήλιο και το μεσέγγχυμα, το χόριο με ένα στρώμα μεσεγγύματος και ένα στρώμα εξωλαχνικής τροφοβλάστης και τη στιβάδα του φθαρτού.

## ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ

### VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Είναι γνωστό ότι μεγάλος αριθμός αυξητικών παραγόντων και οι υποδοχείς τους εκφράζονται στον ανθρώπινο πλακούντα. Ωστόσο, σύμφωνα με πολλές μελέτες, η ομάδα των αυξητικών παραγόντων του αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factors – VEGF) αποτελεί τον αγγειογενετικό παράγοντα “κλειδί”, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Η ομάδα αυτή των παραγόντων περιγράφηκε αρχικά ως ένας παράγων αγγειακής διαπερατότητας (**Vascular Permeability Factor – VPF**), (Senger et al., 1983; Connolly et al., 1989). Σήμερα όμως γνωρίζουμε ότι οι VEGF αποτελούν μια μεγάλη ομάδα γλυκοπρωτεϊνικών, δισουλφιδικών ενώσεων μοριακού βάρους 40-45 KDa (Sherer et al., 2000), η οποία εμφανίζεται με τη μορφή 5 ισομερών και προέρχονται από τη διάσπαση του mRNA σε 5 πρωτεΐνες με 121, 145, 165, 189 και 206 αμινοξέα αντίστοιχα (Dvorak et al., 1995).

Το ανθρώπινο γονίδιο για τον VEGF εδράζεται στο χρωμόσωμα 6p21.3 (Vincenti et al., 1996). Η περιοχή, που το κωδικοποιεί, έχει έκταση 14 Kb και περιλαμβάνει 8 εξόνια (Houck et al., 1991).

Ο VEGF εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και σε αντίθεση με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες η αυξητική του δράση περιορίζεται σε αυτά. Αν και ο VEGF έχει μιτογόνο δράση στα λεμφοκύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα της ωχράς κηλίδας και στα κύτταρα Schwann, φαίνεται ότι η σύνδεσή του σε μη επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί διαφορετικές δράσεις, όπως τη μετακίνηση

μονοκυττάρων (Robinson et al.,2001).

Ο VEGF είναι απαραίτητος για την αγγειογένεση (vasculogenesis), τη de novo δημιουργία αιμοφόρων αγγείων από πρόδρομα αγγειακά κύτταρα. Μάλιστα, σε πειράματα σε ποντίκια αποδεικνύεται ότι η απώλεια ενός μόνο αλληλόμορφου VEGF προκαλεί σημαντικές διαπλαστικές διαταραχές στην ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου και σε εμβρυικό θάνατο στις ημέρες 11-12 (Carmeliet et al.,1996; Ferrara et al.,1996). Επίσης, προκύπτει ότι από τον VEGF εξαρτάται όχι μόνο η αγγειογένεση στον πλακούντα και στο έμβρυο αλλά και ότι υπάρχουν συγκεκριμένες τιμές αυτού, πάνω από τις οποίες είναι δυνατή η φυσιολογική αγγειακή ανάπτυξη (Reynolds et al., 2001).

Πέρα από την αυξητική του δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο VEGF έχει και άλλες δραστηριότητες. Διεγείρει την ενδοθηλιακή έκφραση πρωτεασών, όπως η διάμεση καλλαγενάση και οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου ιστικού τύπου και του τύπου της ουροκινάσης. Οι πρωτεάσες αυτές μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν την αγγειογένεση μέσω της απελευθέρωσης παραπροϊόντων.

Οι περισσότεροι τύποι όγκων υπερεκκρίνουν VEGF mRNA. Το γεγονός αυτό σχετίζεται άμεσα με περιοχές, στις οποίες παρατηρείται έντονη αγγειογένεση και αυξημένη αγγειακή πυκνότητα. Γενικά, υψηλά επίπεδα VEGF σχετίζονται με υποξία, ενώ αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, που βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση με όγκους προκαλούν αυξημένη έκφραση των υποδοχέων VEGF. Τα νεοαγγεία έχουν τοιχώματα με μεγάλη διαπερατότητα, γεγονός το οποίο ευοδώνει την εμφάνιση μεταστάσεων. Μελέτες, οι οποίες συσχετίζουν την έκφραση του VEGF με την

επιθετικότητα των όγκων, τη δυνατότητα μετάστασης και την πιθανότητα υποτροπής, δείχνουν ότι υψηλά επίπεδα VEGF σχετίζονται με κακή πρόγνωση της υποκείμενης νόσου (Toi et al., 1996).

### **Υποδοχείς VEGF**

Τις παραπάνω ανακαλύψεις ακολούθησε η διαπίστωση ότι υπάρχουν ειδικοί VEGF υποδοχείς οι VEGFR-1(flt-1) και VEGFR-2 (KDR), οι οποίοι μαζί με τον VEGFR-3 απαρτίζουν την υποομάδα flt των υποδοχέων της τυροσίνης-κινάσης. Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται από την παρουσία επτά εξωκυττάρων περιοχών με δομή ανάλογη των ανοσοσφαιρινών και μια ενδοκυττάρια περιοχή τυροσίνης-κινάσης, η οποία διακόπτεται από μια αλληλουχία κινάσης (Pajusola et al., 1992).

Ο VEGFR-1, μια γλυκοπρωτεΐνη 180-kDa, ήταν ο πρώτος υποδοχέας, που ταυτοποιήθηκε και παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγγένεια με το VEGF. Ωστόσο, παρουσιάζει συγγένεια και με τους “συγγενείς” παράγοντες PlGF και VEGF-B.

Ο VEGFR-2 ή KDR είναι μια γλυκοπρωτεΐνη 200-230 Kda με μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με τους VEGF, VEGF-D και VEGF-C (Robinson et al., 2001).

Οι VEGFR-1 και 2 εκφράζονται πρωτίστως σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο VEGFR-1 εκφράζεται σε τροφοβλαστικά κύτταρα, μονοκύτταρα και σε νεφρικά μεσαγγειακά κύτταρα (Neufeld et al., 1999). Από την άλλη, ο VEGFR-2 εκφράζεται στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, στα μεγακαρυοκύτταρα, στα κύτταρα της ωχράς κηλίδας και στα πρόδρομα νεφρικά κύτταρα. Οι δύο αυτοί υποδοχείς ενεργοποιούνται πιθανώς από όλα τα ισομερή του VEGF, αλλά φαίνεται ότι in vivo

εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες. Και οι δύο υποδοχείς μπορούν να διεκπεραιώσουν μηνύματα από άλλους αυξητικούς παράγοντες, που ανήκουν στην οικογένεια των VEGF, αλλά μόνο τα ισομερή του VEGF μπορούν να προσδεθούν πάνω τους.

Η έκφραση των VEGFR-1 και 2 φαίνεται ότι επίσης επηρεάζεται από την υποξία, αν και σε μικρότερο βαθμό απ' ό,τι ο VEGF. Η μεταγραφή του VEGFR-1 αλλά όχι του VEGFR-2 ενισχύεται από την υποξία. Η παραγωγή του VEGFR-2 αυξάνεται επίσης σε συνθήκες υποξίας, ωστόσο ο μηχανισμός που την προκαλεί φαίνεται ότι δρα μετά τη μεταγραφή. Αυτή η λόγω της υποξίας αλλαγή στους VEGFR-1 και VEGFR-2 μπορεί να ενεργοποιείται έμμεσα, εφόσον ο VEGF επιτρέπει την έκφραση και των δύο τύπων υποδοχέων (Wilting et al., 1996).

### **PlGF (Placenta Endothelial Growth Factor)**

Ο PlGF είναι ένα ομοδιμερές γλυκοπρωτεϊνικό μόριο 50kDa, το οποίο παρουσιάζει κατά 53% την ίδια αλληλουχία αμινοξέων με το VEGF (Maglione et al., 1991). Περιγράφονται δύο ισομερή που προέρχονται από τη διάσπασή του, ο PlGF-1 με 149 αμινοξέα και ο PlGF-2 με 170 αμινοξέα, τα οποία διαφέρουν μόνο στην παρουσία ενός τμήματος στο καρβοξυλικό άκρο του PlGF-2. Τα 2 ομοδιμερή του PlGF έχουν αγγειογενετική δράση και μπορούν να διεγείρουν τη δραστηριότητα του VEGF ακόμη σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αυξάνοντας τη διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μιτωτική τους δραστηριότητα (Debieve et al., 2001) Το γονίδιο του PlGF έχει 7 εξόνια και εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 (Maglione et al., 1991). Ένα

τρίτο ισομερές του PlGF περιγράφηκε το 1997 από τους Cao και συν. Αυτά τα τρία διμερή διαφέρουν στον αριθμό των εξονίων τους και αν και ο λόγος της ύπαρξής τους δεν είναι ξεκάθαρος, είναι πιθανόν να εξυπηρετούν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες.

Αντίθετα με το VEGF, ο οποίος εκφράζεται μέσω της σύνδεσής του με τους VEGFR-1 και VEGFR-2, ο PlGF φαίνεται ότι συνδέεται μόνο με τον VEGFR-1. Αν και είναι γνωστό ότι ο PlGF παρουσιάζει μια ήπια μιτωτική δράση σε καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι πλέον προφανές ότι μπορεί και ενισχύει την αγγειογενετική δράση του VEGF, απομακρύνοντάς τον από τον VEGFR-1, σχηματίζοντας μαζί του ετεροδιμερή, τα οποία μπορούν να ενεργοποιήσουν τον VEGFR-2 (Zhao et al., 2004). Επιπλέον, πρόσφατα δείχθηκε από τους Cao et al. (1997), ότι ο PlGF μέσω του VEGFR-1 συνεισφέρει στην παθολογική αγγειογένεση, παρατείνοντας την επιβίωση των κυττάρων και διατηρώντας τα αγγειακά δίκτυα. Σε πειραματικά μοντέλα με ποντίκια, η απουσία PlGF πυροδοτούσε την επανεμφάνιση δικτύων νεοαγγείωσης (Carmeliet et al., 2001), ωστόσο είναι άγνωστη ακόμη η ταυτότητα των κυττάρων, που τον παράγουν καθώς και τι ρυθμίζει την έκφρασή τους. Ο PlGF, σε αντίθεση με τον VEGF, δεν επηρεάζεται τόσο πολύ από την υποξία και αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς άλλοι είναι οι εμπλεκόμενοι παράγοντες (Zhao et al., 2004).

Οι Ziche et al. (1997), πραγματοποίησαν μελέτες *in vitro* και διαπίστωσαν ότι ο PlGF έχει παρόμοια δράση με τον VEGF όσον αφορά στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου. Μάλιστα, ο PlGF-1 μπορεί να διεγείρει την αγγειογένεση *in*



νίνο καθώς και τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων in vitro. Το mRNA, που κωδικοποιεί τον PlGF, εντοπίζεται κυρίως στον τελειόμηνο πλακούντα (Sherer et al., 2001). Όπως διαπιστώθηκε από τους Khaliq et al.(1996), η μεγαλύτερη συγκέντρωση PlGF mRNA εντοπίζεται στην αγγειακή-συγκυτιακή μεμβράνη των πλακουντιακών λαχνών. Επίσης, τα μητρικά κύτταρα του φθαρτού παρουσίασαν ισχυρή χρώση για τον PlGF, ενώ δεν εκφράστηκε καθόλου στα μεσεγχυματικά κύτταρα των λαχνών. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο PlGF μπορεί να αποτελεί έναν ισχυρό παρακκρινή παράγοντα για τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την αγγειογένεση στον πλακούντα και έναν αυτοκκρινή μεσολαβητή της τροφοβλαστικής λειτουργίας, με σημαντικό ρόλο στην τροφοβλαστική διείσδυση, διαφοροποίηση και μεταβολική δραστηριότητα (Shore et al.,1997).

### **Έκφραση των VEGF και PlGF στον πλακούντα**

Στον ανθρώπινο πλακούντα, ο VEGF εκφράζεται στις λάχνες (τροφοβλαστικά κύτταρα και κύτταρα Hofbauer του στρώματος) και στα μητρικά κύτταρα του φθαρτού κατά το πρώτο τρίμηνο (Clark et al.,1998; Jackson et al.,1994). Μπορεί να ανιχνευτεί στο πλάσμα της μητέρας κατά την 6η εβδομάδα της κύησης, ενώ φτάνει στην υψηλότερη τιμή του προς το τέλος του πρώτου τριμήνου, αυξανόμενος παράλληλα με τη hCG (Evans et al., 1998). Η έκφραση του VEGF στον τροφοβλαστικό ιστό ελαττώνεται όσο η κύηση προχωρά και το γεγονός αυτό έχει αποδειχθεί και από μελέτες Western και Northern Blot. Η μεταγραφή του VEGF ευοδώνεται σε συνθήκες υποξίας και η όλη διαδικασία υποβοηθείται σημαντικά από

τον HIF-1a. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, τα οποία επιβεβαιώνουν την αύξηση του mRNA των VEGF και HIF-1a σε τροφοβλαστικό ιστό υπό συνθήκες υποξίας (Sellingman et al.,1997).

Όπως θα αναφερθεί παρακάτω στο κεφάλαιο της αγγειογένεσης, ο VEGF διεγείρει τη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση *in vitro* (Kurz et al.,1998) και κατά τα φαινόμενα είναι αυτός που ευθύνεται για την έντονη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση που παρατηρείται κατά το πρώτο μισό της κύησης.

Ο PlGF, σε αντίθεση με το VEGF, εντοπίζεται στα λαχνικά και εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα. Το είδος της αγγειογένεσης, που προωθεί ο PlGF, διαφέρει από το VEGF κατά δύο τρόπους: Πρώτον, η έκφραση του PlGF διεγείρεται από το οξυγόνο (Kurz et al.,1998), σε αντίθεση με το VEGF και δεύτερον, ο PlGF διεγείρει τη μη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση, που παρατηρείται κατά το δεύτερο μισό της κύησης (Khaliq et al.,1999). Τα επίπεδα του PlGF mRNA αυξάνονται με την πρόοδο της κύησης. Όπως θα δούμε παρακάτω, αυτή η βαθμιαία μετατόπιση της ισορροπίας από τη δράση του VEGF προς την κατεύθυνση του PlGF, που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της κύησης, ευθύνεται για τις μεταβολές της αγγειογένεσης που απαιτούνται για το σχηματισμό των τελικών λαχνών (Kingdom et al.,2000).

## **Hypoxia-inducible Factor 1-α (HIF-1α).**

Οι ζωντανοί οργανισμοί αντιδρούν στη χαμηλή μερική τάση οξυγόνου μέσω της αυξημένης μεταγραφής ορισμένων γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στη γλυκόλυση, στη διανομή του οξυγόνου και στην αγγειογένεση (Bunn et al., 1996). Ένας από τους σημαντικότερους ρυθμιστικούς παράγοντες των παραπάνω γονιδίων είναι η ομάδα των HIF (Hypoxia-inducible Factors), παράγοντες που διεγείρονται από την υποξία, οι οποίοι είναι παράγοντες μεταγραφείς με δομή έλικας-αγκύλης-έλικας (Pringle et al., 2010). Ο HIF είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από τους HIF-α και -β (Park et al., 2003). Το πρώτο ισομερές του HIF-α, ο HIF-1α, πρωτοπεριγράφηκε από τους Wang et al. (1985), ως μια δεσμευτική πρωτεΐνη ισχυρής συνάφειας με το DNA, η οποία εντοπίζεται στο HRE (Hypoxia-Responsive -Element, στοιχείο που αντιδρά στην υποξία) του γονιδίου της ερυθροποιητίνης. Δύο επιπλέον υπομονάδες του HIF-α έχουν απομονωθεί και ονομάστηκαν HIF-2α και HIF-3α (Ema et al., 1997; Gu et al., 1998). Ο HIF-1α είναι συνδεδεμένος με τον HIF-1β και οι δύο μαζί αποτελούν μέλη της bHLH-PAS οικογένειας πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές, έχουν μια ομόλογη περιοχή, την PAS (PER-ARNT-SIM), η οποία έχει την ιδιότητα να δρα τόσο ως δεσμευτική περιοχή, ως περιβαλλοντικός αισθητήρας, όσο και ως επεξεργαστής σήματος (Caniggia et al., 2002).

Στην υπομονάδα-α, υπάρχει ένας τομέας η διάσπαση του οποίου εξαρτάται από το οξυγόνο (ODD, oxygen-dependent-domain), ο οποίος υδροξυλιώνεται από την υδροξυλάση 2 της προλίνης (PHD-2), καθιστώντας την ευάλωτη στη διάσπαση υπό συνθήκες φυσιολογικής μερικής πίεσης οξυγόνου (Ziello et al., 2007).

Βιοχημικές μελέτες με *in vitro* DNA ανάλυση έδειξαν ότι οι HIF-1α και HIF-2α λειτουργούν ως παράγοντες μεταγραφής που συμβάλλουν στην έκφραση των ίδιων γονιδίων- στόχων και διαφέρουν μόνο στην έκταση που μπορεί να λάβει η έκφρασή τους. Ο HIF-1α σε συνδυασμό με τον HIF-1β, αποτελούν έναν “πανταχού παρόντα” ρυθμιστή, ο οποίος εκφράζεται σε όλους τους τύπους των κυττάρων και φαίνεται ότι παίζει ένα γενικό ρόλο σηματοδοτώντας την υποξία. Αντίθετα, ο HIF-2α και HIF-3α εκφράζονται μόνο σε ορισμένους τύπους ιστών (επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα, ήπαρ, εγκέφαλος και καρδιά) και έχουν πιο εξειδικευμένο ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου (Park et al.,2003). Έμβρυα ομόζυγα στην απουσία του HIF-1α πεθαίνουν πολύ νωρίς στο πρώτο τρίμηνο της κύησης και διαπιστώνονται βλάβες στο Κ.Ν.Σ., στην αγγείωση του εγκεφάλου και στο καρδιαγγειακό σύστημα. Αντίστοιχα, έμβρυα ομόζυγα στην απουσία του HIF-2α έχουν και αυτά παρόμοια τύχη. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι δύο ισομορφές του HIF-α παίζουν ξεχωριστούς αλλά εξίσου σημαντικούς ρόλους στην εμβρυική ανάπτυξη (Iyer et al.,1998 & Ryan et al.,1998).

Έχει βρεθεί ότι ο HIF-1α εκφράζεται έντονα στον πλακούντα από την 5η κιόλας εβδομάδα της κύησης, πρωτίστως στην εξωλαχνική τροφοβλάστη, στη συγκυτιοτροφοβλάστη και στη λαχνική τροφοβλάστη, ως απάντηση στο χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο περιβάλλον, που παρατηρείται κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης (Caniggia et al.,2000; Rajakumar and Conrad, 2000). Ωστόσο, η έκφρασή του ελαττώνεται από την 9η εβδομάδα της κύησης και από τη 12η εβδομάδα η ανοσοαντίδραση για τον HIF-1α εξασθενεί ή απουσιάζει πλήρως (James et al.,2006;

Caniggia et al.,2000; Caniggia and Winter, 2002).

Σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, η σταθερή υπομονάδα HIF-1α σχηματίζει ένα διμερές με τον HIF-1β, ενεργοποιώντας το σύμπλεγμα του HIF-1. Ο ενεργοποιημένος αυτός παράγοντας μπορεί στη συνέχεια να προσδεθεί στο cis-τμήμα του ενεργοποιητή ενός οξυγο-εξαρτώμενου γονιδίου, διεγείροντας τη μεταγραφή του (Wang et al.,1985). Με τον τρόπο αυτό ο HIF-1 έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει την έκφραση πάνω από 60 γονιδίων σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων (Semenza, 2000). Σε αυτά περιλαμβάνονται η ερυθροποιητίνη, ο VEGF και τα ένζυμα που ρυθμίζουν τη γλυκόλυση (Forsythe et al., 1996).

Αντίθετα, σε συνθήκες υψηλής πίεσης οξυγόνου, ο HIF-1α αποδομείται ταχύτατα από πρωτεασώματα μέσω της αλληλεπίδρασής του με τον πρωτεϊνικό παράγοντα von Hippel-Lindau (Maxwell et al., 1999).

Αν και ο HIF-1α ρυθμίζεται σχεδόν αποκλειστικά από τις μεταβολές στη μερική τάση του οξυγόνου, νεώτερες μελέτες υποδεικνύουν ότι πιθανόν και άλλοι παράγοντες μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασής του. Σε αυτούς περιλαμβάνονται κυτοκίνες και ορμόνες όπως η προγεστρόνη, τα οιστρογόνα, η ινσουλίνη ο TNF-α, με μηχανισμούς που στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί (Daikoku et al.,2003;Huber et al., 2006; Jiang et al., 2001).

Μια σημαντική λειτουργία του HIF-1α είναι η διέγερση της αγγειογένεσης, κατευθύνοντας τη μετανάστευση ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων προς ένα υποξικό περιβάλλον (Gebacef et al., 1997; Carmeliet et al., 1998). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης της μεταγραφής του VEGF, ο οποίος ως γνωστόν, είναι ένας από τους

κύριους αγγειογενετικούς παράγοντες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνεισφέρουν στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων εξασφαλίζοντας έτσι στην υποξική περιοχή επαρκή ποσότητα οξυγονωμένου αίματος ( Dery et al.,2004; Hewitson et al., 2004; Vaupel et al., 2004)

Στα πλαίσια της δράσης του σε καταστάσεις υποξίας ο HIF-1α παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Καθώς ένας όγκος αναπτύσσεται, δημιουργείται ένα υποξικό περιβάλλον εξαιτίας των αυξημένων ενεργειακών αναγκών ενός τεράστιου πληθυσμού ταχέως πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων. Λόγω της αδρανοποίησης του παράγοντα Von Hippel-Lindau και μέσω της ενεργοποίησης και άλλων μηχανισμών, ο HIF-1α σταθεροποιείται και αυξάνεται. Οι δράσεις του έχουν να κάνουν όχι μόνο με την αγγειογένεση, αλλά και με την αύξηση του όγκου, την εξέλιξή του, την εμφάνιση μεταστάσεων και το μεταβολισμό της γλυκόζης (Klatte et al., 2007), ενώ παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου (Schmid et al., 2004).

## ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

### Ορισμοί

Στην ελληνική βιβλιογραφία με τον όρο αγγειογένεση περιγράφεται μια σύνθετη διεργασία, η οποία περιλαμβάνει τις δύο ακόλουθες συνιστώσες:

- Την *de novo* δημιουργία αιμοφόρων αγγείων από πρόδρομα κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης (**Vasculogenesis**). Λαμβάνει χώρα καθ'όλη τη διάρκεια της πλακουντοποίησης, ξεκινώντας από την ανάπτυξη του πρώτου λαχνικού αγγείου, κατά τη μετάβαση από τις δευτερογενείς στις τεταρτογενείς λάχνες (18η έως 35η μέρα), καθώς και αργότερα στην κύηση, με τη διαφοροποίηση των αρχέγονων μεσεγγυματικών λαχνών.
- Την επέκταση του προϋπάρχοντος αγγειακού δικτύου, η οποία περιλαμβάνει τη δημιουργία νέων αγγειακών κλάδων από προηγούμενους, καθώς και την κατά μήκος ανάπτυξη των αγγείων (**Angiogenesis**). Καθ' όλη τη διάρκεια της πλακουντοποίησης αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ανάπτυξης της αγγειακής παροχής των άωρων και ώριμων διάμεσων λαχνών, των στελεχιαίων και των τελικών λαχνών (Folkman et al., 1992; Risau, 1997; Benirschke et al., 2006).

Η διαδικασία αυτή είναι εξαιρετικής σημασίας καθώς όλοι οι οργανισμοί έχουν απόλυτη ανάγκη από ένα αποτελεσματικό μηχανισμό μεταφοράς οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών καθώς και αποβολής των αχρήστων. Στην περίπτωση δε του εμβρύου και του πλακούντα, το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία, επειδή η ανάπτυξη των ανωτέρω δομών εξαρτάται όχι μόνο από τη δημιουργία ικανοποιητικού αγγειακού δικτύου στη μητέρα και το έμβρυο αλλά και από την

αυξανόμενη αιματική ροή προόδου της κύησης (Charnock-Jones et al., 2004).

Δεδομένου ότι ο πλακούντας αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς και πρέπει να ανταποκρίνεται ικανοποιητικά στις αυξανόμενες μεταβολικές ανάγκες του εμβρύου, η αγγειώσή του εξελίσσεται και μεταβάλλεται διαρκώς προκειμένου να ανταποκριθεί ικανοποιητικά. Η ταυτοποίηση των παραγόντων που καθορίζουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του λαχνικού αγγειακού δικτύου και της αγγείωσης της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας θα μπορούσε να συμβάλει και στη βελτίωση της παρακολούθησης και της έκβασης της κύησης. Ένας σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας είναι το οξυγόνο και για το λόγο αυτό ο ρόλος της υποξίας στην πλακουντιακή ανάπτυξη, στην ομαλή εξέλιξη του εμβρύου και στην εμφάνιση καρδιαγγειακών επιπλοκών στην ενήλικη ζωή αποτελεί αντικείμενο έρευνας στον τομέα της μαιευτικής (Kingdom et al., 2000; Larsen et al., 2002).

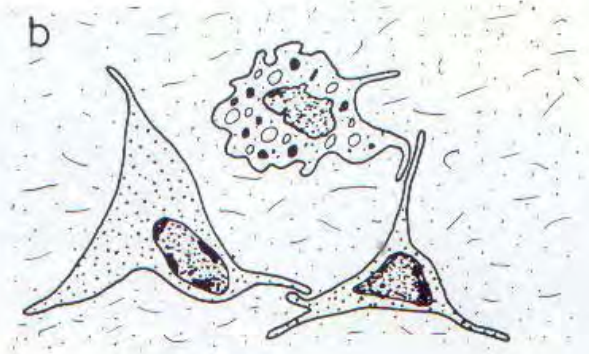
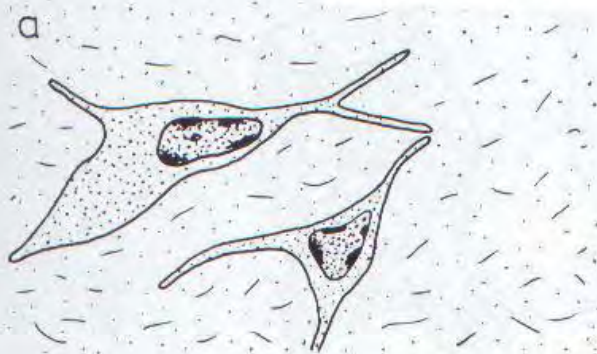
### **Αγγειογένεση I (21η-34η μέρα μετά τη σύλληψη)**

Τα πρώτα μορφολογικά δείγματα αγγειογένεσης εντοπίζονται στον πυρήνα των μεσεγγυματικών λαχνών και αποτελούν προϊόν *de novo* δημιουργίας, παρά προβολής εμβρυικών αγγείων εντός του πλακούντα. Η αγγειογένεση ξεκινά περίπου 21 ημέρες μετά τη σύλληψη. Στον πίθηκο Rhesus, που παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με τον άνθρωπο (η κύηση διαρκεί 166 ημέρες), η αγγειογένεση ξεκινά τη 19η ημέρα. Στο στάδιο αυτό, τα λαχνικά δίκτυα περιλαμβάνουν πρωτογενείς και δευτερογενείς λάχνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από τη διείσδυση μεσεγγυματικών στοιχείων που προέρχονται από την εξωεμβρυική κοιλότητα (Demir et al., 1989).

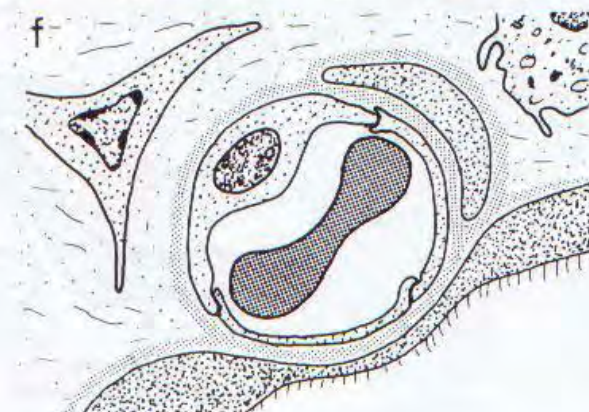
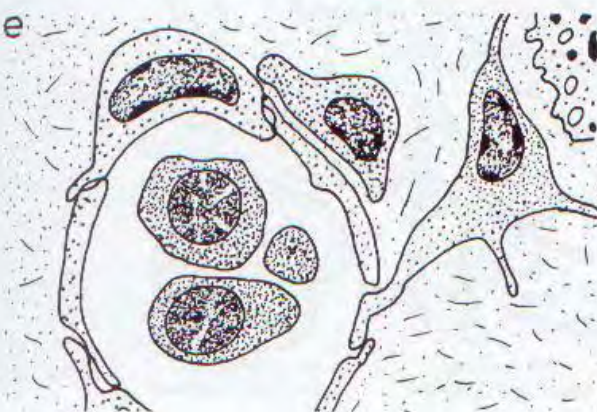
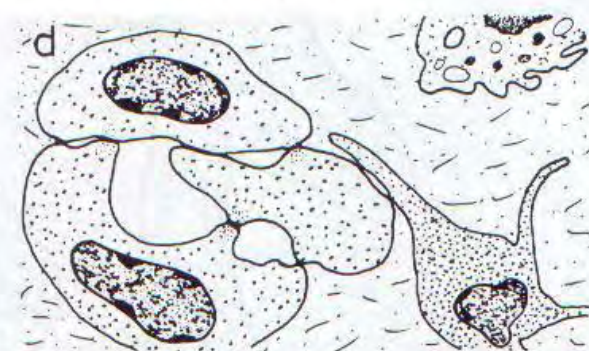
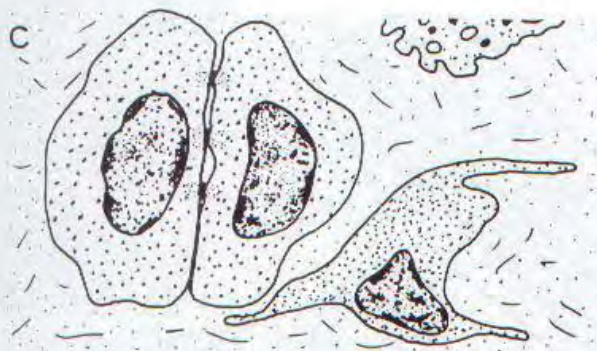


Τα πρώτα πρόδρομα κύτταρα του εμβρυικού ενδοθηλίου, τα επονομαζόμενα αιμαγγειοβλαστικά κύτταρα εντοπίζονται ήδη από την 15η-21η μέρα μετά τη σύλληψη. Τα κύτταρα αυτά δημιουργούν αθροίσματα πολυγωνικών κυττάρων που μοιάζουν με χορδές, τα οποία διαφέρουν από τα πρόδρομα μεσεγγυματικά κύτταρα στην απουσία κυτταρικών προσεκβολών και στην παρουσία λιγότερων κυτταροπλασματικών οργανιδίων. Τα στενά μεσοκυττάρια διαστήματα ανάμεσα στα κύτταρα γεφυρώνονται είτε με δεσμοσωμάτια ή με ισχυρούς δεσμούς δίκην δεσμίδος (Kaufmann et al., 2004). Τα πρώτα σημεία εμφάνισης αγγειακού αυλού εμφανίζονται την 23η μέρα, ενώ ανοσοϊστοχημικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι και η απόπτωση εμπλέκεται στην όλη διαδικασία (Tertemitz et al., 2005).

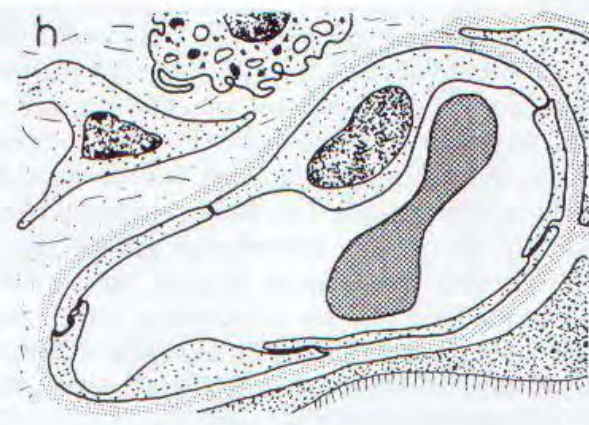
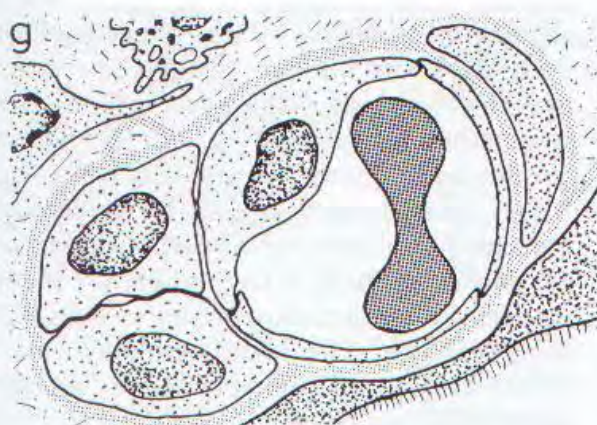
Πρώιμο αγγειογενετικό στάδιο (22η ημέρα)



Αρχόμενη αγγειογένεση (22η ημέρα - 26η εβδομάδα)



Τελική επέκταση του αγγειακού δικτύου (26η εβδομάδα - 40 εβδομάδα)



**Εικόνα 5** Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της αγγειογένεσης στις πλακουντιακές λάχνες.

Αρχέγονα εμπύρρινα ερυθροκύτταρα ανευρίσκονται συχνά μέσα στο νεοσχηματιζόμενο αυλό, προερχόμενα από τη διαφοροποίηση του έσω τμήματος των αιμαγγειοβλαστικών κυττάρων. Οι χορδές επιμηκύνονται μέσω ενός συνδυασμού δημιουργίας αντιγράφων και ενσωμάτωσης στρωματικών κυττάρων. Τέλος, συνδέονται με τα αγγεία δημιουργώντας τον αλλαντοειδικό σχηματισμό, θέτοντας έτσι τα θεμέλια της εμβρυοπλακουντιακής κυκλοφορίας (Burton et al., 2009)

Ο FGF-2 (Fibroblast Growth Factor- Ινωδοβλαστικός Αυξητικός Παράγων) πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των αιμαγγειοβλαστικών πρόδρομων κυττάρων και η έκφρασή του στις πλακουντιακές λάχνες έχει μελετηθεί εκτενώς. Ο VEGF, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση, ανάπτυξη και άθροιση των των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δημιουργία των χορδών εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό κατά το αρχικό στάδιο της κύησης (Ahmed et al., 1997; Wheeler et al., 1995; Vuorela et al., 1997).

Στον ανθρώπινο πλακούντα, η δημιουργία ενδοθηλιακών σωληναρίων από την αιμαγγειοβλαστική χορδή ξεκινά την 21η μέρα μετά τη σύλληψη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της εστιακής διάταξης ενδοκυττάρων σχισμοειδών δομών, οι οποίες αργότερα συγχωνεύονται σχηματίζοντας ένα μεγαλύτερο αυλό. Οι Fong et al. (1999), έδειξαν ότι ο VEGF-R ρυθμίζει τη δράση του VEGF πάνω στα πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, η απενεργοποίηση του τμήματος του γονιδίου του VEGF που κωδικοποιεί την τυροσίνη-κινάση σταματά και τη δράση του στα αγγεία. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι το εξωκυτταρικό τμήμα του μορίου του VEGF είναι αυτό που απαιτείται για την αγγειακή ανάπτυξη του πλακούντα. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες

έδειξαν ότι ο VEGF-R εκφράζεται στο ενδοθήλιο των λαχνών καθώς και στα μακροφάγα, ενώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι η τροφοβλάστη αποτελεί σπουδαία πηγή VEGFR-1 (Clark et al., 1998; He et al., 1999).

Μέχρι την 28η μέρα μετά τη σύλληψη, οι αιμαγγειοβλαστικές χορδές των περισσότερων λαχνών παρουσιάζουν καλά διαμορφωμένους, μακρείς, πολυγωνικούς και αποπλατυσμένους αυλούς με ενδοθηλιακά κύτταρα στην περιφέρεια. Μεσεγχυματικά κύτταρα εναποτίθενται στα ενδοθηλιακά σωληνάρια και οι προεκτάσεις τους ενσωματώνονται στο δίκτυο των μεσεγχυματικών κυττάρων και στα ενδοθηλιακά σωληνάρια. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου μέσα στον αυλό των αγγείων εμφανίζονται τα πρώτα πρόδρομα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, τα οποία δεν έχουν μπει ακόμη στην κυκλοφορία καθώς δεν έχει ακόμη αποκατασταθεί η εμβρυική κυκλοφορία μέσω του ομφαλίου λώρου. Ο παραπάνω αναπτύσσεται λίγες ημέρες αργότερα (32η-35η ημέρα μετά τη σύλληψη), από τη συγχώνευση λαχνικών τριχοειδών και μεγαλύτερων αλλαντοειδικών αγγείων. Τα αγγεία αυτά σχηματίζονται στο εσωτερικό της αλλαντοΐδας και ακολούθως εξαπλώνονται και προς τη μητέρα και προς το έμβρυο, εγκαθιστώντας την επικοινωνία μεταξύ του εμβρυικού και του πλακουντιακού δικτύου (Benirschke et al., 2000).

### **Αγγειογένεση II-Δημιουργία των αγγειακών δικτύων (32η ημέρα-25η εβδομάδα μετά τη σύλληψη).**

Από την 32η εβδομάδα μετά τη σύλληψη μέχρι το τέλος του πρώτου τριμήνου, τα ενδοθηλιακά σωληνάρια εξελίσσονται σε πρόδρομα αγγειακά δίκτυα με την



παράλληλη δράση δύο μηχανισμών:(α) της επιμήκυνσης των προϋπαρχόντων σωληναρίων μέσω της μη διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης και (β) της διακλάδωσης των σωληναρίων μέσω πλευρικών εκβλαστήσεων.

Στο στρώμα των μεσεγχυματικών λαχνών η διακλαδιζόμενη αγγειογένεση είναι λιγότερο συχνή από τη μη-διακλαδιζόμενη και τα αγγειακά δίκτυα που προκύπτουν δεν είναι καλά αναπτυγμένα. Καθώς η κύηση προχωρά και αυξάνεται η διάμετρος των λαχνών, δίνεται το ερέθισμα για την έναρξη της διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης και τα μέχρι τότε ελάχιστα διακλαδισμένα αγγεία μετετρέπονται σε ένα πυκνό δίκτυο που εντοπίζεται κάτω ακριβώς από την επιφάνεια των λαχνών. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται με ιδιαίτερα εντυπωσιακό τρόπο στις άωρες διάμεσες λάχνες που προκύπτουν από τις μεσεγχυματικές λάχνες από την 9η εβδομάδα της κύησης και πέρα (Kaufmann et al., 2004).

Σε πειράματα *in vitro* διαπιστώνεται η σύνδεση του VEGF και με τους 2 υποδοχείς του (VEGFR -1 και 2), η οποία διεγείρει τη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση και συνεπώς οδηγεί σε έντονα διακλαδιζόμενα αγγειακά δίκτυα. Η έκφραση του VEGF και του υποδοχέα του (VEGFR-2) είναι πιο ισχυρή στα αρχόμενα στάδια της κύησης και ελαττώνεται απότομα καθώς η κύηση προχωρά (Vucovic et al., 1996 & Jackson et al., 1994 & Cooper et al., 1996 & Kumazaki et al., 2002).

Αντίθετα, η έκφραση του PlGF και του VEGFR-1 αυξάνεται προς το τέλος της κύησης όταν η διακλαδιζόμενη αγγειογένεση αντικαθίσταται σε σημαντικό βαθμό από τους μηχανισμούς της μη-διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης (Crescimanno et al., 1995 & Kumazaki et al., 2002). Ο PlGF, συνδέεται επιλεκτικά με το VEGFR-1 και

σε ορισμένες περιπτώσεις φαίνεται ότι καταστέλλει τη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση.

### **Αγγειογένεση ΙΙΙ ( 15η εβδομάδα- 32η εβδομάδα μετά τη σύλληψη)**

#### **α. Δημιουργία στελεχιαίων λαχνών**

Κατά τον 3ο μήνα της κύησης, μερικά από κεντρικά εντοπιζόμενα ενδοθηλιακά σωληνάρια των άωρων διάμεσων λαχνών αποκτούν μεγαλύτερη διάμετρο ( $>100\mu\text{m}$ ) και αναπτύσσουν διάμεσες δομές μέσω της ίνωσης του στρώματος και της διαφοροποίησης των πρόδρομων λείων μυικών κυττάρων. Τα αγγεία που προκύπτουν αποτελούν πρόδρομες μορφές των αρτηριών και των φλεβών των λαχνών. Σε μεγαλύτερες, ώρες διάμεσες λάχνες οι έξω χιτώνες των πρόδρομων αγγείων συγχωνεύονται δημιουργώντας ένα ινώδη στρωματικό πυρήνα στο εσωτερικό της λάχνης. Ο νέος τύπος λάχνης που προκύπτει αποτελεί τη στελεχιαία λάχνη (Kaufmann et al., 2004).

#### **β.Υποστροφή περιφερικών αγγείων**

Στο δεύτερο μισό της κύησης, η διαδικασία ίνωσης στο εσωτερικό των στελεχιαίων λαχνών εξελίσσεται ακτινωτά προς την τροφοβλάστη. Τα επιφανειακά αγγεία μετατρέπονται σε ένα παράπλευρο αγγειακό δίκτυο. Επιπλέον, όσο η διαδικασία ίνωσης στις στελεχιαίες λάχνες εξαπλώνεται και η μετατροπή των κεντρικών τριχοειδών σε αρτηρίες και φλέβες προχωρά, τα επιφανειακά αγγειακά δίκτυα υποστρέφουν. Προς το τέλος της κύησης, απομένουν ελάχιστα παράπλευρα αγγεία μέσα στις μεγαλύτερες στελεχιαίες λάχνες. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου

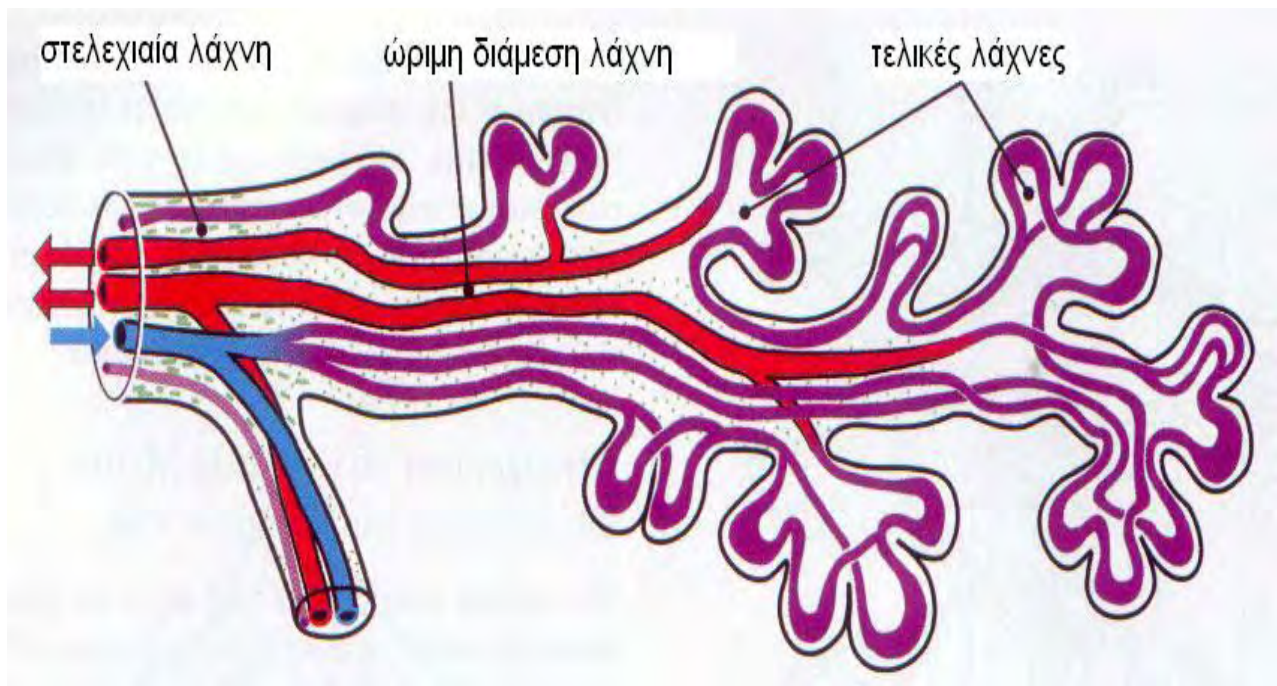
προκύπτει η παραπάνω διαδικασία δεν έχει ακόμη διελευκανθεί πλήρως (Leiser et al.,1985).

#### **Αγγειογένεση IV. Επικράτηση της μη διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης (24-25η εβδομάδα-τέλος της κύησης)**

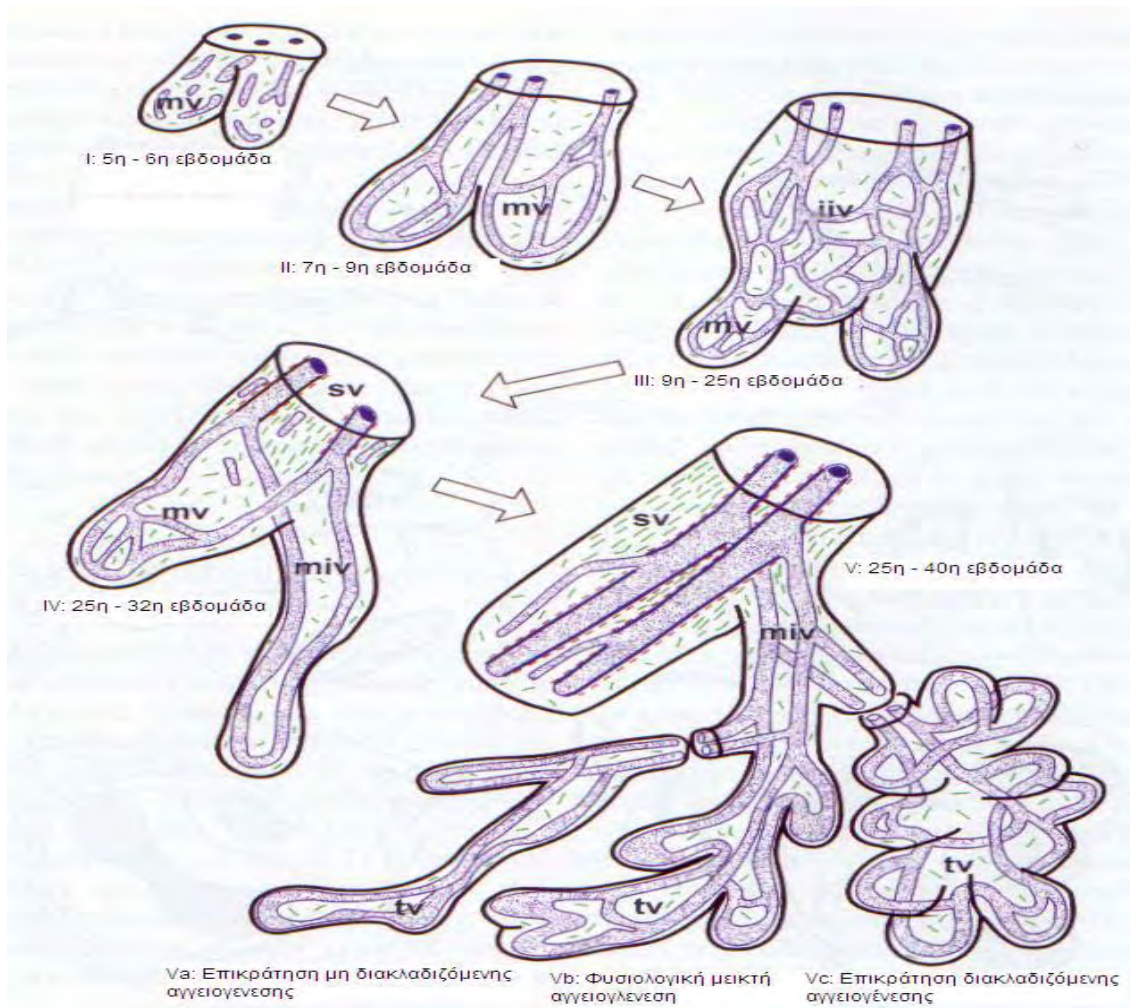
Από την 25η εβδομάδα μέχρι και το τέλος της κύησης, παρατηρείται μεταστροφή της αγγειογένεσης από τη διακλαδιζόμενη προς τη μη διακλαδιζόμενη μορφή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη ενός νέου είδους λαχνών, των ώριμων διάμεσων λαχνών, στις παρυφές του υφιστάμενου λαχνικού δικτύου. Οι ώριμες διάμεσες λάχνες είναι επιμήκεις ( $> 1000 \mu\text{m}$ ), λεπτές (διάμετρος  $80-120 \mu\text{m}$ ) και περιέχουν ένα ή δύο αγγειακά δίκτυα με περιορισμένη διακλάδωση. Κατά το στάδιο αυτό διαπιστώνεται ελάττωση του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστικών κυττάρων και αύξηση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλικών κυττάρων καθ'όλο το μήκος των δομών αυτών, συντελώντας στην αύξηση της μη διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης, μέσω της ανάπτυξης κατά μήκος. Το τελικό μήκος αυτών των περιφερικών αγγειακών δικτύων μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να υπερβαίνει τα  $4000 \mu\text{m}$  ( Kaufmann et al.,1985; 1988). Η κατά μήκος ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου είναι τόσο έντονη, ώστε να υπερβαίνει την ανάπτυξη και των ίδιων των λαχνών, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία αγγειακών αγκυλών, οι οποίες προπίπτουν εντός της επιφάνειας της τροφοβλάστης συντελώντας στη δημιουργία των τελικών λαχνών. Καθεμία από αυτές, τροφοδοτείται από δύο αγγειακές αγκύλες και καλύπτεται από ένα εξαιρετικά λεπτό στρώμα τροφοβλάστης, το οποίο αποτελεί τμήμα της

αγγειακής-συγκυτιακής μεμβράνης. Η περιοχή αυτή αποτελεί την κύρια τοποθεσία ανταλλαγής αερίων μεταξύ μητέρας-εμβρύου μέσω της διάχυσης (Kaufmann et al., 2004). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι αγγειακές αγκύλες 5-10 τελικών λαχνών επικοινωνούν μέσω λεπτών, επιμήκων τριχοειδών που βρίσκονται στο κέντρο των ώριμων διάμεσων λαχνών. Όσο η κύηση προχωρά, τα τελικά αγγεία διαστέλλονται δημιουργώντας μεγάλα κολπώδη τριχοειδή, τα οποία πιστεύεται ότι αντιρροπούν τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα τα οποία μπορεί να προκαλέσουν οι επιμήκεις, ελάχιστα διακλαδιζόμενες αγγειακές αγκύλες στις αντιστάσεις της εμβρυοπλακουντιακής κυκλοφορίας.





**Εικόνα 6.** Διάταξη των εμβρυικών αγγείων σε μια ομάδα τελικών λαχνών, οι οποίες προέρχονται από μια ώριμη διάμεση λάχνη. Βασίζεται σε μια τρισδιάστατη απεικόνιση των περιφερικών κλάδων ενός ώριμου δικτύου λαχνών. Η διακλάδωση ξεκινά από τη συγχώνευση δύο τριχοειδικών κλάδων. Κάθε ερυθροκύτταρο κατά τη διάρκεια της πορείας του μέσα στο δίκτυο των λαχνών θα πρέπει να διέλθει από τους τελικούς τριχοειδικούς κλάδους ενός μεγάλου αριθμού τελικών λαχνών σε όλο τους το μήκος. Οι κατά τόπους διατάσεις, οι επονομαζόμενες κολποειδή ελαττώνουν τις αντιστάσεις στη ροή του αίματος. Στην παραπάνω εικόνα, με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι φλέβες και τα φλεβίδια των λαχνών, με μπλε οι εμβρυικές αρτηρίες και τα αρτηριόλια και με μωβ χρώμα τα τριχοειδή των λαχνών και τα κολποειδή.



**Εικόνα 7.** Η ανάπτυξη των λαχνών σε σχέση με την ανάπτυξη του εμβρυικού αγγειακού δικτύου.

**Στάδιο I:**(5η-6η εβδομάδα κύησης). Δημιουργία των πρώτων εμβρυικών τριχοειδών μέσα στις μεσεγχυματικές λάχνες (mv). **Στάδιο II:** (7η-8η εβδομάδα) . Τα αρχέγονα αγγεία συνενώνονται για να σχηματίσουν ένα απλό αγγειακό δίκτυο . **Στάδιο III:** (9η-25η εβδομάδα) .Οι μεσεγχυματικές λάχνες εξελίσσονται σε άωρες διάμεσες λάχνες (iiv) και το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο εξαπλώνεται ευρέως με τη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση και τη διαμεσολάβηση του VEGF. **Στάδιο IV:**(15η-32η εβδομάδα). Οι άωρες διάμεσες λάχνες εξελίσσονται σε στελεχιαίες λάχνες. Τα κεντρικά τριχοειδή μετατρέπονται σε στελεχιαία αγγεία (αρτηρίες και φλέβες)ενώ τα περιφερικά τριχοειδή υποστρέφονται. Οι μεσεγχυματικές λάχνες μετατρέπονται σε ώριμες διάμεσες λάχνες (miv), μέσω της μη διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης με αποτέλεσμα τη σημαντική επιμήκυνση των προϋπάρχοντων αγγειακών δομών. Στη φάση αυτή τα επίπεδα του VEGF ελαττώνονται με αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων του PlGF. **Στάδιο V:**(32η εβδομάδα-τέλος κύησης). **(Va)** Επικράτηση του PlGF με επικράτηση της μη διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης.**(Vb)**Φυσιολογική τελειόμηνος κύηση με ισορροπία στην έκφραση των VEGF και PlGF και αντίστοιχα ανάμεσα στη διακλαδιζόμενη και μη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση. **(Vc)** Επικράτηση του VEGF και της διακλαδιζόμενης αγγειογένεσης σε περιπτώσεις πλακουντιακής υποξίας .

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΩΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, είναι προφανές ότι η ομοιόσταση του οξυγόνου είναι κεφαλαιώδους σημασίας τόσο για την εμβρυική, όσο και για την ενήλικη ζωή. Η απόκλιση από τα φυσιολογικά πλαίσια αυξάνει τον κίνδυνο οξειδωτικής βλάβης λόγω υπερβολικής παροχής οξυγόνου (υπεροξία), ή, μεταβολικής διαταραχής λόγω ανεπαρκούς παροχής οξυγόνου (υποξία). Οι μεταβολές στη συγκέντρωση του οξυγόνου εξαιτίας μεταβολών στην παροχή ή στις ανάγκες του, μπορεί να οδηγήσουν σε οξείες ή χρόνιες αντιδράσεις, τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε οργανικό επίπεδο (Charnock-Jones et al., 2004).

Ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών μελέτησε τις μεταβολές της μερικής πίεσης του οξυγόνου ( $pO_2$ ), στα μεσολάχνια διαστήματα, με αποτέλεσμα να έχουμε μια αρκετά καλή εικόνα για το τι ακριβώς συμβαίνει σε όλη τη διάρκεια της κύησης (Soothill et al., 1986 & Rodesch et al., 1992; Jauniaux et al., 2001).

Στα αρχικά και τελικά στάδια της κύησης, είναι απαραίτητο να προστατευτεί το έμβρυο από τις πιθανές ανεπιθύμητες βλάβες που μπορεί να προκαλέσει η υψηλή  $pO_2$ . Για το λόγο αυτό, η ανάπτυξη του πλακούντα κατά το πρώτο τρίμηνο πραγματοποιείται κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Jauniaux et al., 2000).

Είναι προφανές ότι η φυσιολογική τιμή της  $pO_2$  στα αρτηριακά ενδοθηλιακά κύτταρα είναι διαφορετική από αυτή που μετράται στα αντίστοιχα φλεβικά. Η  $pO_2$  στα μεσολάχνια διαστήματα κατά την 8η εβδομάδα της κύησης είναι μικρότερη από 20

mmHg αλλά μετά τη 12η εβδομάδα η τιμή της ξεπερνά τα 50 mmHg. Υπάρχει ωστόσο μια χρονική διαφορά 2 περίπου μηνών ανάμεσα στην αύξηση της  $pO_2$  στα μεσολάχνια διαστήματα και των ποσοστών διάχυσης από τη μια και στις μορφολογικές μεταβολές που διαπιστώνονται ποσοτικά (αύξηση του αριθμού των λαχνών και των τριχοειδών) και ποιοτικά (τύπος αγγειογένεσης). Τα επίπεδα του οξυγόνου αυξάνονται στη 12η εβδομάδα, ενώ ουσιαστικές μεταβολές στην περιφερική αγγείωση γίνονται αντιληπτές μόλις από την 20η-25η εβδομάδα της κύησης (Kaufmann et al., 2000). Οι ανατομικές μεταβολές είναι σε σημαντικό βαθμό παρατεταμένες σε σχέση με τις ταχείες *in vitro* μεταβολές που προκαλούν οι αυξομειώσεις της  $pO_2$  σε καλλιεργημένα κύτταρα και αντανακλούν τις διαφορές ανάμεσα στην οξεία και στη χρόνια ανταπόκριση στο οξυγόνο. Είναι προφανές ότι η διαμόρφωση του εμβρυοπλακουντιακού αγγειακού δικτύου είναι μια χρονοβόρος διαδικασία και προκειμένου ο πλακούντας να λειτουργεί ως σύνολο θα πρέπει να εναρμονίζεται με τις μεταβολές που λαμβάνουν χώρα μέσα στις δομές του, και ιδιαίτερα στην τροφοβλάστη (Kaufmann et al., 2004).

Ωστόσο, είναι σκόπιμο να διευκρινιστεί ότι ακόμη και αν οι τιμές  $pO_2$  που ισχύουν στο πρώτο τρίμηνο είναι πολύ χαμηλές, πρόκειται για φυσιολογικές τιμές οι οποίες διαπιστώνονται σε κυήσεις δίχως επιπλοκές και για το λόγο αυτό σε καμιά περίπτωση δεν θα πρέπει να χαρακτηρίζονται “υποξικές”, αλλά απλώς φυσιολογικά χαμηλές (Charnock-Jones et al., 2004).

Κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου οι ανάγκες του εμβρύου για οξυγόνο αντιμετωπίζονται ικανοποιητικά καθώς σταδιακά οι πιέσεις αυξάνουν ακόμη

περισσότερο, φτάνοντας στη μέγιστη τιμή τους (60 mmHg), στις 16 εβδομάδες της κύησης. Από το σημείο αυτό και πέρα, παρατηρείται μια σταδιακή πτώση μέχρι και το τέλος της κύησης (45 mmHg), καθώς αυξάνεται η κατανάλωση του οξυγόνου από το έμβρυο και τον πλακούντα (Jauniaux et al., 2001).

Οι τιμές της  $pO_2$  που αναφέρονται παραπάνω, προέρχονται από αναρρόφηση αίματος από τα μεσολάχνια διαστήματα διαμέσου του χοριονικού δίσκου, που πραγματοποιήθηκε κατά την παρακέντηση του ομφαλίου λώρου. Μας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την οξυγόνωση του πλακούντα χωρίς να λαμβάνουν υπόψη εστιακές μεταβολές στη συγκέντρωση του οξυγόνου. Όταν το μητρικό αίμα φτάνει στον πλακούντα μέσω των σπειροειδών αρτηριών, κατευθύνεται στο κέντρο της κάθε κοτυληδόνας και στη συνέχεια διανέμεται περιφερικά. Συνεπώς, θα πρέπει να αναμένεται μια κλίση πίεσης κατά μήκος των λοβιδίων αλλά, το γεγονός αυτό δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με τα μέσα που διαθέτουμε (Burton et al., 2009)

## ΣΙΔΗΡΟΠΕΝΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ

### *Ορισμός*

Ως αναιμία ορίζεται η χαμηλή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης ή η παρουσία χαμηλού αιματοκρίτη και επηρεάζει το ένα τέταρτο του παγκόσμιου πληθυσμού. Η επίπτωσή της είναι υψηλότερη σε παιδιά προσχολικής ηλικίας (47.4%), σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας (30.2%), καθώς και στις εγκύους (41.8%). Το 50% των εγκύων στην Αφρική, πάνω από το 40% στην Ασία και πάνω από το 30% στη Λατινική Αμερική και την Ωκεανία πάσχει από σιδηροπενική αναιμία. Αντιθέτως στην Ευρώπη τα ποσοστά της σιδηροπενικής αναιμίας στον πληθυσμό των εγκύων είναι πολύ χαμηλότερα (18.7%), ενώ στη Β. Αμερική φτάνουν μόλις το 6%. Η συχνότητά της είναι μεγαλύτερη στα χαμηλότερα κοινωνικοοικονομικά στρώματα και τα ποσοστά της αυξάνονται όσο η κύηση προχωρά (Mc Lean et al., 2008; Polhamus et al., 2009).

Η σιδηροπενική αναιμία αποτελεί την πιο συχνή αναιμία κατά τη διάρκεια της κύησης, παρά τις αξιοσημείωτες προσπάθειες που γίνονται διεθνώς για τη μείωση της επίπτωσής της. Από τους βασικότερους παράγοντες που οδηγούν στην ανεπαρκή πρόσληψη σιδήρου, είναι η αποτυχία να συμπεριληφθούν στην καθημερινή διατροφή τροφές πλούσιες σε σίδηρο, καθώς επίσης και η ταυτόχρονη κατανάλωση τροφών που λειτουργούν ως αναστολείς της απορρόφησης του σιδήρου. Οι αυξημένες απαιτήσεις του εμβρύου και του πλακούντα σε σίδηρο, όπως και η αύξηση του όγκου του πλάσματος και των ερυθρών αιμοσφαιρίων κατά τη διάρκεια της κύησης

οδηγούν σε πιο εκτεταμένη εκδήλωση αναιμίας ( Chandler et al, 2008; Scholl et al., 1994).

Το έμβρυο προσλαμβάνει το σίδηρο από τον ορό της μητέρας με ενεργό μεταφορά, μέσω του πλακούντα. Το έμβρυο προσλαμβάνει ημερησίως 4 mg σιδήρου, ενώ τις τελευταίες εβδομάδες, περίπου 6 mg. Καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης, το έμβρυο απαιτεί συνολικά 1000 mg. Από αυτά, τα 350 καλύπτουν ανάγκες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα, 500 mg για την αύξηση της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων και 250 mg θα δαπανηθούν με την απώλεια αίματος κατά τον τοκετό (Scholl, 2011). Οι ανάγκες του εμβρύου σε σίδηρο καλύπτονται από τις σιδηροαποθήκες της μητέρας. Η φυσιολογική διατροφή προσφέρει στη μητέρα 14 mg σιδήρου, όμως από αυτό απορροφώνται μόνο 1.3-2.6 mg. Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι περισσότερες γυναίκες έχουν μικρά αποθέματα σιδήρου, η προφυλακτική χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου κρίνεται απαραίτητη (Scholl et al., 1994; Breyman C, 2002).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (W.H.O. 2008) εκτιμά ότι 52% του συνόλου των εγκύων θα εμφανίσουν σιδηροπενική αναιμία κατά την κύηση, ενώ οι έγκυοι που δε λαμβάνουν σκευάσματα σιδήρου θα παρουσιάσουν σιδηροπενία κατά το τέλος της κύησης σε ποσοστό 85%.

### **Ευαισθησία και ειδικότητα των διαγνωστικών μεθόδων της σιδηροπενικής αναιμίας.**

Η πιο συχνή μέθοδος για την εκτίμηση του σιδήρου είναι η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης και ο αιματοκρίτης. Είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε ότι η



χαμηλότερη τιμή αιμοσφαιρίνης, ώστε να τεθεί η διάγνωση της αναιμίας, είναι τα 11g/dl στο πρώτο και τρίτο τρίμηνο της κύησης και τα 10.5 g/dl στο δεύτερο τρίμηνο (Centres of Disease Control 1989). Παρ' όλα αυτά, η διάγνωση της αναιμίας βασισμένη μόνο σε αυτές τις δύο τιμές δεν έχει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, καθώς θα θεωρεί ως σιδηροπενικά άτομα που δεν είναι και το αντίθετο (Garby et al., 1969). Η επιβεβαίωση της αναιμίας ολοκληρώνεται μέσα από πολλές δοκιμασίες (ο υπολογισμός της φερριτίνης ορού, του MCV, του κορεσμού της τρανσφερρίνης, η ανταπόκριση σε θεραπευτική χορήγηση σιδήρου) (Dallman et al., 1980) (Πίνακας 1). Κατά τη διάρκεια της κύησης, η εμφάνιση της αναιμίας είναι εν μέρει τεχνητή καθώς επηρεάζεται από την αύξηση του όγκου του πλάσματος της μητέρας, γεγονός που είναι απόλυτα φυσιολογικό. Αν και τα ερυθρά αιμοσφαίρια αυξάνουν επίσης κατά τη διάρκεια της κύησης, η αύξησή τους δεν είναι σύγχρονη με την αύξηση του όγκου του πλάσματος. Για το λόγο αυτό η αιμοσφαιρίνη και ο αιματοκρίτης μειώνονται διαρκώς κατά τη διάρκεια του 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> τριμήνου, ενώ παρατηρείται μια μικρή αύξηση προς το 3<sup>ο</sup> τρίμηνο (Sifakis et al., 1999). Καθώς η κύηση εξελίσσεται, η διαφορική διάγνωση της αληθούς αναιμίας από την πλασματική, που οφείλεται σε αιμοδιάλυση καθίσταται δυσχερής. Σε κάθε περίπτωση, μια πολύ χρήσιμη εργαστηριακή παράμετρος είναι η μέτρηση της φερριτίνης του ορού της εγκύου, η οποία αντανakλά τις αποθήκες του σιδήρου. Ο συνδυασμός της χαμηλής αιμοσφαιρίνης και της χαμηλής φερριτίνης ορού έχει προταθεί ως ο πιο ειδικός τρόπος ανίχνευσης της σιδηροπενικής αναιμίας, καθώς άλλες καταστάσεις που οδηγούν σε αναιμία (π.χ. λοίμωξη) κατά τη διάρκεια της κύησης δεν χαρακτηρίζονται



από χαμηλά επίπεδα φερριτίνης ( $>12\mu\text{g/dl}$ ). Παρ' όλα αυτά, το πιο δύσκολο είναι να εκτιμηθεί η έλλειψη του σιδήρου σε ασθενείς που οι αποθήκες σιδήρου είναι άδειες και δεν έχουν ακόμη εκδηλώσει αναιμία.

Μια νέα τεχνική, που κερδίζει όλο και μεγαλύτερο έδαφος, κυρίως στη Μαιευτική, είναι ο υπολογισμός των υποδοχέων τρανσφερρίνης στον ορό της μητέρας (serum transferrin receptor – sTfR). Ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται στην επιφάνεια κάθε κυττάρου, που έχει ενσωματωμένο σίδηρο. Είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δύο πανομοιότυπες αλυσίδες, που η καθεμία από αυτές έχει MB 95 kD. Ο υποδοχέας αυτός απελευθερώνεται σε κάθε περίπτωση, που οι ιστοί έχουν αυξημένες ανάγκες για σίδηρο ή κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης με τη διαμεσολάβηση της τρανσφερρίνης του πλάσματος (Thorstensen et al., 1993; Cook et al., 1993). Ο αριθμός των υποδοχέων τρανσφερρίνης στην επιφάνεια των κυττάρων αντανακλά τις ανάγκες του οργανισμού σε σίδηρο και η ανεπάρκεια σιδήρου αποτελεί έναυσμα για την παραγωγή νέων υποδοχέων (Rao et al., 1985). Οι υποδοχείς αυτοί δεν επηρεάζονται σε περιπτώσεις χρόνιας λοίμωξης και για το λόγο αυτό η δοκιμασία αυτή καθίσταται αξιόπιστη, ιδίως όταν η ερμηνεία των επιπέδων φερριτίνης καθίσταται δύσκολη, όπως κατά την περίοδο της λοχείας (Akersson et al., 1998) (Πίνακας 2).

Ο προσδιορισμός των υποδοχέων τρανσφερρίνης γίνεται με τη μέθοδο ELISA ενώ υπάρχουν τουλάχιστον 6 διαφορετικοί τύποι αναλυτών. Το πρόβλημα, που προκύπτει, είναι η απουσία τιμών αναφοράς, καθώς αυτές ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του αναλυτή. Πρόσφατα, έχει ξεκινήσει και η χρήση των μονοκλωνικών

αντισωμάτων για τον προσδιορισμό των υποδοχέων (Skikne, 2008).

Ο Kohgo et al.(2002) και ο Beguin et al.(2003), ήταν οι πρώτοι ερευνητές που προσδιόρισαν ποσοτικά τον υποδοχέα της τρανσφερρίνης στον ορό (sTfR) σε ανθρώπους και αρουραίους. Το αρχικό πρόβλημα ήταν να καθιερωθεί ένα κοινό μέτρο αναφοράς. Η καθιέρωση έγινε μετά από μελέτη 165 ατόμων, ενώ η μεταβλητή αυτή θεωρήθηκε σταθερή για άτομα ηλικίας 18-80 ετών και ανεξάρτητη του φύλου. Η μέση τιμή της παραμέτρου αυτής βρέθηκε ότι είναι  $5 \pm 1$  mg/l.

Οι Punnonen et al.(1997), συνέκριναν τα επίπεδα sTfR σε άτομα με σιδηροπενική αναιμία και σε ασθενείς με χρόνια αναιμία άλλης αιτιολογίας και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο αριθμός των υποδοχέων ήταν υψηλός μόνο στην ομάδα της σιδηροπενικής αναιμίας, οπότε προκύπτει το συμπέρασμα ότι αποτελεί έναν ιδιαίτερα αξιόπιστο δείκτη για τη διάγνωση της σιδηροπενικής αναιμίας.

Ο προσδιορισμός της αναλογίας sTfR/log φερριτίνης, ένας συνδυασμός των τιμών των υποδοχέων τρασφερρίνης και της φερριτίνης, αποτελεί μια ακόμη εξαιρετικά χρήσιμη παράμετρο για τη διάγνωση των ασθενών με ελαττωμένες αποθήκες σιδήρου. Τέλος, η μέτρηση της τρανσφερρίνης αποτελεί μια θαυμάσια εναλλακτική λύση για τη διάγνωση της σιδηροπενικής αναιμίας, η οποία μπορεί να υποκαταστήσει επιτυχώς τις παραδοσιακές διαγνωστικές μεθόδους (Skikne .,1990).

<b>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ</b>	<b>MCV (fL)</b>
<b>Σιδηροπενική αναιμία</b>	$85.12 \pm 1.25 \dagger$
<b>Άλλη αναιμία</b>	$87.58 \pm 0.83$
<b>Καμία αναιμία</b>	$88.82 \pm 0.68$

**Πίνακας 1:** MCV και μητρική αναιμία 3<sup>ου</sup> τριμήνου (Dallman et al., 1980)

† Στατιστικά σημαντικό στην ομάδα χωρίς αναιμία

<i><b>Δοκιμασίες εκτίμησης σιδηροπενικής αναιμίας</b></i>	<i><b>Εναισθησία (%)</b></i>	<i><b>Ειδικότητα (%)</b></i>	<i><b>Θετική προγνωστική αξία (%)</b></i>
<i><b>Φερριτίνη ορού</b></i>	16	<b>90.7</b>	<b>57.1</b>
<i><b>Υποδοχείς τρανσφερρίνης ορού</b></i>	<b>84.6</b>	<b>95.1</b>	<b>57.9</b>

**Πίνακας 2:** Εναισθησία, ειδικότητα και θετική προγνωστική αξία διαγνωστικών δοκιμασιών κατά το 3<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης. (Scholl, 2011)

## Επίπτωση της σιδηροπενικής αναιμίας στην κύηση

Η σιδηροπενική αναιμία κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές τόσο στη μητέρα όσο και στο έμβρυο. Οι σημαντικότερες επιπλοκές για τη μητέρα λόγω της σιδηροπενικής αναιμίας είναι η μειωμένη φυσική και πνευματική δραστηριότητα, η εύκολη κόπωση και καρδιαγγειακά συμπτώματα, λόγω της υπερδυναμικής κυκλοφορίας της κύησης. Επίσης, υπάρχουν μειωμένα αποθέματα αίματος κατά την περιγεννητική περίοδο, με αποτέλεσμα αυξημένο κίνδυνο μετάγγισης μετά τον τοκετό (Breyman 2002; Baker et al., 2000). Ουσιαστικά, το γεγονός αυτό εγείρει την ανησυχία ότι η σιδηροπενική αναιμία μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη περιγεννητική θνησιμότητα (Allen, 2000). Σύμφωνα με τη WHO (2005), η μητρική θνησιμότητα κυμαίνεται από 27 μητρικούς θανάτους ανά 100.000 γεννήσεις στις αναπτυσσόμενες χώρες, έως 194 θανάτους στο Πακιστάν. Υπάρχουν στοιχεία, τα οποία συσχετίζουν τον κίνδυνο μητρικής θνησιμότητας με τη βαρύτητα της αναιμίας, αν και επειδή βασίζονται κυρίως σε αναδρομικές μελέτες δεν έχουν αποδειχθεί πλήρως. Λόγω απουσίας προοπτικών μελετών, που να δείχνουν την άμεση συσχέτιση της αναιμίας με τον κίνδυνο μητρικής θνησιμότητας και δεδομένου ότι δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες, οι οποίες να πιστοποιούν την τιμή της αιμοσφαιρίνης πέρα από την οποία αυξάνεται η μητρική θνησιμότητα, έχει προταθεί ως οριακή η τιμή των 8.9 g/dl, κάτω από την οποία η μητρική θνησιμότητα στη Μ. Βρετανία αυξανόταν στο διπλάσιο (Butler et al., 1963).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, οι σιδηροπενικές γυναίκες παρουσιάζουν

αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών κατά την κύηση, όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και πυελονεφρίτιδα, κυρίως λόγω ανοσοκαταστολής ( Kitay et al.,1975). Επίσης, αυξάνεται και ο κίνδυνος για προεκλαμψία, υπέρταση και σακχαρώδη διαβήτη της κύησης (Pena-Rosas et al., 2009) .

Η σιδηροπενική αναιμία οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού. Οι Murphy et al.(1986), εξέτασαν τον κίνδυνο εμφάνισης πρόωρου τοκετού, σε έδαφος σιδηροπενικής αναιμίας, μετά την έναρξη φαρμακευτικής αγωγής σε διαφορετικές ηλικίες κύησης. Έτσι, όταν η έναρξη της φαρμακευτικής αγωγής γινόταν στις πρώτες εβδομάδες κύησης, ο κίνδυνος για πρόωρο τοκετό και γέννηση νεογνών χαμηλού βάρους ήταν 2,7% (Scholl, 2005; Skikne et al., 1990). Αντιθέτως, όταν η έναρξη της αγωγής υποκατάστασης της έλλειψης σιδήρου γινόταν μετά τη 13<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, ο κίνδυνος ανερχόταν σε 3.9%. Αξίζει να αναφέρουμε ότι στη μελέτη αυτή, διεπιστώθη και μια συσχέτιση της σιδηροπενικής αναιμίας με το κάπνισμα. Στη μελέτη Camden, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις της αναιμίας ανάλογα με το χρόνο έναρξης (1ο και 3ο τρίμηνο της κύησης) και την αιτιολογία (σιδηροπενική αναιμία και από άλλα αίτια). Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι σε γυναίκες με σιδηροπενική αναιμία, η οποία υπήρχε από το πρώτο τρίμηνο της κύησης υπήρχε υπερδιπλάσιος κίνδυνος πρόωρου τοκετού και χαμηλού βάρους κατά τη γέννηση, σε σχέση με τις γυναίκες οι οποίες παρουσίασαν σιδηροπενική αναιμία στο 3ο τρίμηνο ή έπασχαν από άλλη μορφή αναιμίας (Scholl et al., 1992, 2011). Η Allen (2001), πρότεινε 3 πιθανούς μηχανισμούς, μέσω των οποίων η σιδηροπενική αναιμία της μητέρας μπορεί να προκαλέσει πρόωρο τοκετό: την υποξία, το οξειδωτικό stress και τη φλεγμονή.

Η χρόνια υποξία μπορεί να προκαλέσει μια αντίδραση stress με απελευθέρωση CRH και νορεπινεφρίνης από τον πλακούντα και αυξημένη παραγωγή κορτιζόλης και ACTH από το έμβρυο. Οι ορμόνες αυτές προάγουν τη μυομητρική δραστηριότητα μέσω των οιστρογόνων και της κοννεξίνης και αναστολή του IGF (Insulin-like Growth Factor), ο οποίος αποτελεί σημαντικό αναβολικό παράγοντα της εμβρυικής ανάπτυξης (Allen ,1997).

Οι Murphy et al.(1986), μελέτησαν τη σχέση μεταξύ χαμηλής τιμής αιμοσφαιρίνης με το χαμηλό βάρος γέννησης και την περιγεννητική θνησιμότητα και διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση της αναιμίας της μητέρας με τα παραπάνω. Επιπλέον, η εκδήλωση χαμηλών συγκεντρώσεων οιστρογόνων και η εμφάνιση πλακουντιακής υπερτροφίας αποτελούν συχνό εύρημα (Fleming et al.,1974). Πιο συγκεκριμένα, η αναιμία και η συνεπακόλουθη υποξία προκαλούν ανώμαλη τροφοβλαστική διείσδυση και απελευθέρωση του παράγοντα HIF-1α. Οι διαταραχές αυτές στην ανάπτυξη του πλακούντα και του εμβρύου αποτελούν το υποκείμενο αίτιο πολλών προβλημάτων, που παρουσιάζονται είτε στη νεογνική ηλικία ή πολύ αργότερα στην ενήλικη ζωή (Hercberg et al., 2000). Πιο ειδικά, το αυξημένο βάρος του πλακούντα και αυξημένη αναλογία του βάρους του πλακούντα προς το βάρος γέννησης συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αρτηριακής πίεσης και σακχαρώδη διαβήτη στην ενήλικη ζωή (Murphy et al., 1986).

### **Αντιμετώπιση της σιδηροπενικής αναιμίας**

Η χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου είναι η πιο συνήθης αντιμετώπιση της σιδηροπενικής αναιμίας. Στις περισσότερες μελέτες, τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης

αυξάνουν μετά από χορήγηση σκευασμάτων σιδήρου, αλλά όχι νωρίτερα από την 28<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. Στη διεθνή βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η αιμοσφαιρίνη αποκτά φυσιολογικές τιμές την 35<sup>η</sup> – 40<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης, αλλά δυστυχώς μέχρι τότε έχουν λάβει χώρα οι περισσότεροι πρόωροι τοκετοί. Τέλος, στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι από τις γυναίκες, που παραμένουν “αναιμικές” καθ’ όλη τη διάρκεια της κύησης, το 33.3% θα εξακολουθήσουν να είναι “αναιμικές” και μετά τον τοκετό (Scoll,1994; Skikne et al.,1990).

## ΕΤΕΡΟΖΥΓΟΣ β- ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ

### *Η δομή του μορίου της αιμοσφαιρίνης*

Η αιμοσφαιρίνη είναι ένα μόριο με πολύ εξειδικευμένη δομή. Αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που διαπλέκονται στο χώρο και σχηματίζουν ένα σχεδόν σφαιρικό μόριο (εικ. 8).

**Εικόνα 8.** Σχηματική απεικόνιση του μορίου της αιμοσφαιρίνης.



Κάθε μία αλυσίδα αποτελείται από 145 αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ

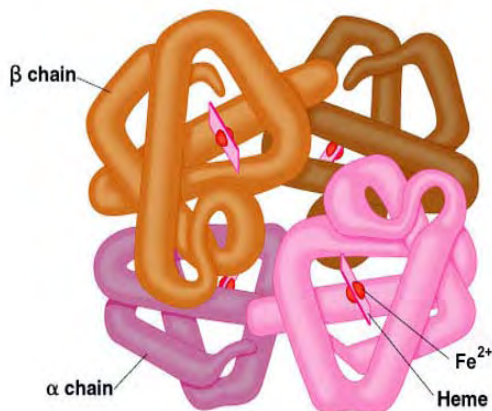
τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Η πρωτοταγής δομή της αλυσίδας (η ακολουθία των αμινοξέων) είναι πάντα σταθερή και παραμένει αναλλοίωτη. Ανάμεσα στις πλευρικές

αλυσίδες των αμινοξέων, αναπτύσσονται δεσμοί χαμηλής ενέργειας, οι οποίοι δίνουν σε πολλά τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μια δομή α-έλικας (δευτεροταγής δομή), με αποτέλεσμα το τελικό μόριο να αποκτά μια τρισδιάστατη δομή στο χώρο και εν τέλει να αποκτά τη χαρακτηριστική στερεοδομή της (Bianco et al.,2000). Η διαπλοκή τεσσάρων τέτοιων αλυσίδων στο χώρο, σχηματίζει το μόριο της σφαιρίνης (τεταρτοταγής δομή). Σε κάθε αλυσίδα, προστίθεται και ένα μόριο αίμης, η οποία είναι ένα επίπεδο μόριο που συντίθεται χωριστά και αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους (πρωτοπορφυρίνη IX).

Αξίζει να αναφέρουμε ότι οι αλυσίδες της σφαιρίνης δεν είναι όλες ίδιες και τροποποιούνται στις διάφορες φάσεις της ζωής του ανθρώπου, με βασικό σκοπό να εξυπηρετείται με τον καλύτερο τρόπο η μεταφορά του οξυγόνου (Hegde, 1975). Σε γενικές γραμμές, κάθε μόριο αιμοσφαιρίνης αποτελείται από δύο ζεύγη αλυσίδων που ονομάζονται με μικρά γράμματα (α, β, γ, δ, ε). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ενήλικα ανθρώπου αποτελούνται κατά 98% από HbA (A=adult) και η οποία αποτελείται από δύο α και δύο β αλυσίδες (εικόνα 9). Αντίθετα, στο έμβρυο η βασική αιμοσφαιρίνη είναι η HbF (F=fetus), η οποία μετά από τους πρώτους μήνες της ζωής αντικαθίσταται από την A. Ο λόγος ύπαρξης της HbF είναι το γεγονός ότι έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το οξυγόνο το οποίο δεσμεύει πολύ περισσότερο από ό,τι η HbA (Bianco et al.,2000; White et al,1985). Ο βασικός ρόλος της αιμοσφαιρίνης είναι να συνδέεται άμεσα με το οξυγόνο και βαθμιαία να αποδεσμεύεται κατά την κυκλοφορία του αίματος στους ιστούς. Η σωστή, λοιπόν, μεταφορά του οξυγόνου



είναι μια σύνθετη διαδικασία, η οποία προϋποθέτει την ύπαρξη ισάριθμων  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδων, οι οποίες έχουν αυστηρά σχεδιασμένη στερεοδομή. Οποιαδήποτε διαταραχή αυτών των στοιχείων οδηγεί σε διαταραχές, που χαρακτηρίζονται ως «αιμοσφαιρινοπάθειες».



**Εικόνα 9** Σχηματική παράσταση των  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδων στο μόριο της Αιμοσφαιρίνης Α.

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες κληρονομούνται με αυτοσωματικό συνεπικρατούντα τρόπο και έτσι υπάρχουν ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες.

Ανάλογα με τον εντοπισμό της βλάβης ( $\alpha$  ή  $\beta$  αλυσίδα), χαρακτηρίζονται αντίστοιχα ως  $\alpha$  και  $\beta$  αιμοσφαιρινοπάθεια.

### Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία

Το βασικό χαρακτηριστικό της β-θαλασσαιμίας ή β-μεσογειακής αναιμίας, είναι η μείωση της σύνθεσης των  $\beta$  αλυσίδων, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη παραγωγή και άθροιση  $\alpha$  αλυσίδων. Στην ετερόζυγη μορφή, η βλάβη οφείλεται σε έλλειψη του β-γονιδίου ή σε μετάλλαξη αυτού, που προκαλεί αναστολή ή υπολειτουργία του (Cao et al.,2011; Weatherall et al.,2001). Η β-θαλασσαιμία εκδηλώνεται κλινικά με τη μορφή τριών συνδρόμων: α)τη μείζονα β-θαλασσαιμία, η οποία αποτελεί μια σοβαρή διαταραχή και τα άτομα που πάσχουν έχουν ανάγκη μεταγγίσεων, προκειμένου να επιβιώσουν, β) ενδιάμεση β- θαλασσαιμία, η οποία χαρακτηρίζεται

από αναιμία και σπληνομεγαλία, χωρίς όμως να απαιτεί μετάγγιση υπό κανονικές συνθήκες και γ) ελάσσων ή ετερόζυγος β-θαλασσαιμία ή “στίγμα” ( Weatherall et al.,2001; Rappaport et al.,2004). Η κύηση σε ασθενείς με ομόζυγο β-θαλασσαιμία αναφέρεται σπάνια πλέον στη διεθνή βιβλιογραφία καθώς από τη μια οι περιπτώσεις ομόζυγης β-θαλασσαιμίας έχουν μειωθεί και από την άλλη τα άτομα με ομόζυγη β-θαλασσαιμία έχουν μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης και υπογονιμότητα (Savona-Ventura et al., 1994). Σε γενικές γραμμές, οι πάσχοντες από ετερόζυγο β-θαλασσαιμία δεν παρουσιάζουν συμπτώματα, εκτός από τις περιόδους έντονου στρες, όπως κατά τη διάρκεια της κύησης οπότε και εμφανίζουν εντονότερη αναιμία (Weatherall et al.,2001). Οι τιμές της αιμοσφαιρίνης στα άτομα με “στίγμα” είναι κατά μέσο όρο 1 ή 2 g/dl χαμηλότερες σε σχέση με άτομα του ίδιου φύλου και ηλικίας στο γενικό πληθυσμό (μέση τιμή αιμοσφαιρίνης 12.9g/dl για τους άνδρες και 10.9g/dl για τις γυναίκες). Κατά την εξέταση του περιφερικού αίματος, διαπιστώνεται υπόχρωμη, μικροκυτταρική αναιμία με πολύ χαμηλές τιμές MCV και MCH, ανισοποικιλοκυττάρωση και βασεόφιλη στίξη. Ωστόσο, ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι αυξημένος, παρατηρείται φυσιολογικός ή αυξημένος αριθμός δικτυοερυθροκυττάρων, ενώ η εξέταση του μυελού των οστών δείχνει μια ήπια υπερπλασία της ερυθράς σειράς (Rund et al., 1992). Η διάγνωση της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας τίθεται από το χαρακτηριστικό εύρημα της αυξημένης Hb2A (ποσοστά 3.5-7%), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις η συνυπάρχουσα σιδηροπενία μπορεί να δυσχεράνει τη διάγνωση. Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί μια ήπια αύξηση της HbF κατά 1-3% στο 50% των περιπτώσεων με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία (Weatherall et

al., 2001).

### **Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και κύηση**

Η κύηση αλλάζει ριζικά την αιματολογική κατάσταση της γυναίκας. Η κύηση σε μία γυναίκα χωρίς παθολογία αποτελεί μια κατάσταση επιταχυνόμενης ερυθροποίησης με συνοδό αύξηση του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η αύξηση της μάζας των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι αποτέλεσμα της διαρκώς αυξανόμενης παραγωγής τους. Παρά την αυξημένη ερυθροποίηση, κατά τη διάρκεια της κύησης, ο συνολικός αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης και ο αιματοκρίτης μειώνονται καθώς παρατηρείται αύξηση και του όγκου του πλάσματος, πολύ μεγαλύτερη από την αύξηση του όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο όγκος του πλάσματος αυξάνει προοδευτικά κατά τη διάρκεια της κύησης, με αποκορύφωμα τις τελευταίες 8 εβδομάδες, όπου η αύξηση είναι μέχρι 120-125% (Wheatherall et al., 2001; Thein et al., 2008). Στις γυναίκες με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, η “φυσιολογική” αναιμία της κύησης προστίθεται στην προϋπάρχουσα υπόχρωμη, μικροκυτταρική αναιμία. Ο συνδυασμός αυτός καταλήγει σε πιο έντονη αναιμία σε σχέση με την αναμενόμενη και μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να οδηγήσει και σε άσκοπες θεραπευτικές παρεμβάσεις (Tsatalas et al., 2009). Εξαιτίας των αιματολογικών αλλαγών, που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της κύησης, οι κλινικές εκδηλώσεις των συνυπαρχουσών διαταραχών στις μορφές θαλασσαιμίας τροποποιούν ακόμη περισσότερο το αιματολογικό προφίλ των ασθενών. Οι αλλαγές αυτές δεν μπορούσαν να εκτιμηθούν μέχρι που ανευρέθησαν δύο σημαντικοί

παράγοντες, η ερυθροποιητίνη (Epo) και ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης στον ορό (sTfR), οι οποίοι αντανακλούν την ερυθροποιητική δραστηριότητα στο μυελό των οστών (Thein et al.,2008; Cao et al.,1994).

Η αναιμία και η υποξία παρατηρήθηκε ότι είναι οι παράγοντες, που διεγείρουν τη σύνθεση της ερυθροποιητίνης, μιας γλυκοπρωτεΐνης που παράγεται στους νεφρούς κατά την ενήλικη ζωή και στο ήπαρ κατά την εμβρυική. Μια αλυσίδα σημάτων καταλήγει στην αύξηση της ερυθροποιητίνης και αυτή με τη σειρά της διεγείρει την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η Τρανσφερρίνη είναι η πρωτεΐνη στον ορό της μητέρας, η οποία μεταφέρει το σίδηρο στα ερυθροκύτταρα, μέσω ειδικών διαμεμβρανικών πρωτεϊνών. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ειδικά μονομερή των μεμβρανικών υποδοχέων της τρανσφερρίνης (sTfR) εμφανίζονται στον ορό και τα επίπεδά τους σχετίζονται άμεσα με τη διαδικασία της ερυθροποίησης. Οι δύο μείζονες παράγοντες, που καθορίζουν τα επίπεδα του sTfR, είναι ο συνολικός σίδηρος και η ενεργοποίηση του μυελού για ερυθροποίηση. Στις ασθενείς με σιδηροπενική αναιμία τα επίπεδα του sTfR αυξάνουν άμεσα (Bianco et al.,2000; White et al.,1975; Cao et al.,2000; Akeson et al.,1998). Σε μία έρευνα, που έγινε από τους Bianco et al.(2000), στην Ιταλία, μελετήθηκαν τα επίπεδα του sTfR σε έγκυες γυναίκες χωρίς β-θαλασσαιμία, σε γυναίκες με ομόζυγο β-θαλασσαιμία και σε γυναίκες με ετερόζυγο β-θαλασσαιμία.

Στην ομάδα των εγκύων χωρίς β-θαλασσαιμία, τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη μειώνονταν σταδιακά κατά τη διάρκεια της κύησης. Τα επίπεδα του

σιδήρου στον ορό της μητέρας παρέμεναν σταθερά κατά τη διάρκεια της κύησης, ενώ τα επίπεδα της φερριτίνης, κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου, εμφάνισαν μια σταδιακή μείωση. Η ερυθροποιητίνη αυξήθηκε κατά το πρώτο τρίμηνο, παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου και διπλασιάστηκε κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου.

Ο sTfR, σε αντίθεση με την ερυθροποιητίνη, μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου, παρέμεινε σταθερός κατά τη διάρκεια του δευτέρου τριμήνου και αυξήθηκε κατά το τρίτο τρίμηνο.

Στην ομάδα των εγκύων με ετερόζυγο β-θαλασσαιμία, παρατηρήθηκε ότι ο αιματοκρίτης και η αιμοσφαιρίνη ήταν πιο χαμηλά από τις τιμές που είχε η ομάδα των μη εγκύων με β-θαλασσαιμία, αλλά και από την ομάδα των εγκύων χωρίς β-θαλασσαιμία. Ο σίδηρος στον ορό των μητέρων ήταν αυξημένος, ενώ η φερριτίνη μειωμένη. Η ερυθροποιητίνη στην αρχή της κύησης ήταν σημαντικά πιο υψηλή από την ομάδα χωρίς θαλασσαιμία, ενώ σταδιακά αύξανε μέχρι το τέλος του δευτέρου τριμήνου, όπου άγγιζε τη μέγιστη τιμή. Ο sTfR στην αρχή της κύησης είχε ήδη μεγαλύτερη τιμή στην ομάδα της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας και κατά τη διάρκεια της κύησης σταδιακά αύξανε. Προς το τέλος της κύησης η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ήταν ιδιαίτερα μεγάλη.

Συμπερασματικά, σύμφωνα πάντα με την ίδια μελέτη, στις γυναίκες με ετερόζυγο β-θαλασσαιμία, ο sTfR είναι αρκετά αυξημένος από την αρχή της κύησης, και συνεχίζει να παραμένει σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης. Ο αιματοκρίτης μειώνεται σε ποσοστό 12.2% σε σχέση με την ομάδα χωρίς β-

θαλασσαιμία. Το φαινόμενο αυτό δεν συνδέεται με τη σιδηροπενία, καθώς η φερριτίνη παρέμενε εντός των φυσιολογικών ορίων. Το εύρημα αυτό πιθανότατα, συνδυάζεται με την αύξηση της ερυθροποίησης (White et al.,1975; Cao et al.,2000; Akesson et al.,1998; Rusia et al.,1999). Η υποξία και η αναιμία στην ομάδα της β-θαλασσαιμίας κινητοποιούν την αύξηση της ερυθροποίησης, με σκοπό να αυξηθεί η παραγωγή του sTfR και να ανταποκριθεί καλύτερα στην αναιμία. Η μέτρηση των επιπέδων του sTfR στις γυναίκες με ετερόζυγο β-θαλασσαιμία μπορεί να δώσει πληροφορίες για ένδειξη ενεργοποίησης της ερυθροποίησης και να αποτελέσει σημάδι για έναρξη αγωγής ή παρέμβασης (Akesson et al.,1998;Hegde 1975; White et al.,1985).

Η πορεία της κύησης σε γυναίκες με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία είναι ευνοϊκή (Sheiner et al.,2004; ACOG 2007). Τα ποσοστά περιγεννητικής θνησιμότητας και συγγενών ανωμαλιών καθώς και τα Apgar Scores ήταν παρόμοια σε ασθενείς με ή χωρίς β-θαλασσαιμία (Alger et al., 1979; Rappaport et al., 2004). Μόνο σε μια μελέτη των Sheiner et al.(2004), αναφέρθηκαν υψηλότερα ποσοστά IUGR. Ουσιαστικά ο σημαντικότερος κίνδυνος για το έμβρυο είναι η μετάδοση της β-θαλασσαιμίας ή της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητος ο προγεννητικός έλεγχος (Tsatalas et al., 2009).

### **Θεραπευτική αντιμετώπιση**

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, επειδή οι γυναίκες με ετερόζυγο β-θαλασσαιμία ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στις αιμοδυναμικές μεταβολές της κύησης και η έκβασή της είναι ευνοϊκή στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν δικαιολογούνται

βεβιασμένες ενέργειες, όπως μεταγγίσεις ή χορήγηση ερυθροποιητίνης, αν και υπάρχουν κάποιες μελέτες που την υποστηρίζουν (Breymann et al., 1999; Bencaiova et al., 2006).

Αν τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης κατά τη διάρκεια της κύησης είναι χαμηλότερα των 8 g/dl, συνιστούν ένδειξη για μετάγγιση (Kaltsoya-Tassiopoulou et al., 1983), αν και θα πρέπει να λαμβάνεται επίσης υπόψη η παρουσία ή όχι συμπτωμάτων (κόπωση, δύσπνοια, ζάλη), όπως και κλινικών σημείων (οίδημα, ταχυκαρδία). Η περιγεννητική θνησιμότητα αυξάνεται όταν τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης μειωθούν κάτω από 8 g/dl (Ratten et al., 1972). Ωστόσο, ένα ελάχιστο ποσοστό γυναικών (3%) θα φτάσει σε τέτοιες τιμές αιμοσφαιρίνης κατά την κύηση, ενώ ακόμη μικρότερο θα είναι το ποσοστό των γυναικών που θα τις υπερβεί (2%) (Chalkia et al., 2002).

Η σιδηροπενία αποτελεί συχνό εύρημα σε γυναίκες με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και συνεπώς κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης θα πρέπει να τους χορηγείται θεραπεία υποκατάστασης με σίδηρο ακόμη και σε δόσεις πάνω από τα συνηθισμένα πλαίσια (Rappaport et al., 2004; Hedge et al., 1975). Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στις γυναίκες με “στίγμα” μπορεί να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα στα έμβρυα εξαιτίας της σχετικής ανεπάρκειας του φυλλικού οξέος λόγω αυξημένης ερυθροποίησης (Ibba et al., 2003). Με βάση τις ευεργετικές δράσεις της χορήγησης φυλλικού οξέος σε άλλους πληθυσμούς με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα, συνιστάται η προφυλακτική χορήγηση 4 mg φυλλικού οξέος σε γυναίκες με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία πριν τη σύλληψη και κατά το πρώτο τρίμηνο (Locksmith et al., 1998).





## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αγγειογένεση στον πλακούντα αποτελεί μια εξαιρετικά σύνθετη διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την εξ αρχής δημιουργία αιμοφόρων αγγείων και ακολούθως την επέκταση του προϋπάρχοντος δικτύου με τη δημιουργία νέων αγγειακών κλάδων καθώς και την κατά μήκος επέκταση των αγγείων. Κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, η ανάπτυξη της συγκυτιοτροφοβλάστης λαμβάνει χώρα υπό συνθήκες έντονες υποξίας, η οποία κατευθύνει την έκφραση του VEGF. Ο VEGF αποτελεί τον παράγοντα “κλειδί” για τη ρύθμιση της αγγειογένεσης, η οποία σε αυτή τη φάση περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός διακλαδιζόμενου αγγειακού δικτύου μέσα στο σύστημα των λαχνών (διακλαδιζόμενη αγγειογένεση). Η ρύθμιση της έκφρασης του VEGF γίνεται μέσω του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α. Ωστόσο, μετά την παρέλευση του πρώτου τριμήνου παύουν να επικρατούν συνθήκες υποξίας και συνεπώς η έκφραση του VEGF προοδευτικά ελαττώνεται προς όφελος ενός άλλου αγγειογενετικού παράγοντα, του PlGF. Ο παράγοντας αυτός είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση μη διακλαδιζόμενων αγγείων στο δίκτυο των ώριμων πια λαχνών και σε αντίθεση με τον VEGF, η έκφρασή του ενισχύεται όσο αυξάνεται η μερική τάση του οξυγόνου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να δοθεί απάντηση στα παρακάτω ερωτήματα:

**α) Ποιος είναι ο ρόλος της υποξίας στην ποσοτική σχέση μεταξύ VEGF και PlGF σε πλακούντες γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία καθώς και σε πλακούντες γυναικών με σιδηροπενική αναιμία; Στις καταστάσεις αυτές παρατείνεται η**

### **έκφραση του VEGF σε βάρος του PlGF;**

Η έρευνα στηρίχθηκε στην υπόθεση ότι η σχετική υποξία που προκαλεί η αναιμία της μητέρας προκαλεί και αντίστοιχη πτώση της μερικής τάσης του οξυγόνου στις λάχνες, με αποτέλεσμα μεταβολή στην έκφραση των αυξητικών παραγόντων και αλλαγές στην αγγειογένεση και στη διαμόρφωση των τελικών λαχνών.

**β) Πώς επηρεάζεται η έκφρασή του HIF-1α στους πλακούντες των δύο ανωτέρω κατηγοριών; Υπάρχει αυξημένη έκφρασή του λόγω της υποξίας;**

**γ) Η αυξημένη έκφραση του VEGF (μέσω του HIF-1α), μπορεί να αποδοθεί στην αναιμία αυτή καθαυτή ή στη σιδηροπενία.;**

Στην περίπτωση της σιδηροπενικής αναιμίας, θεωρείται ότι η έλλειψη σιδήρου είναι η γενεσιουργός αιτία της υποξίας, η οποία δίνει το ερέθισμα για την ενεργοποίηση του HIF-1α και ακολούθως του VEGF. Ωστόσο, αναφορικά με την ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, υπάρχει αναιμία χωρίς απαραίτητα σιδηροπενία και όλες οι μέχρι τώρα μελέτες αφορούσαν αποκλειστικά σιδηροπενικές μητέρες.

Επιπρόσθετα στη μελέτη γίνεται συσχετισμός των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων με διάφορες παραμέτρους, που αφορούν στην έκβαση της κύησης (όπως : βάρος πλακούντα, βάρος νεογνού, οι οποίες αναφέρθηκαν παραπάνω), προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι μεταβολές της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων αντανακλούν και στο περιγεννητικό αποτέλεσμα.

Με βάση τα όσα είναι διαθέσιμα από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ελάχιστα στοιχεία υπάρχουν για όλα τα παραπάνω ζητήματα, ενώ δεν έχει αναφερθεί παρόμοια μελέτη.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν τελειόμηνες έγκυες γυναίκες με μονήρεις κύσεις, οι οποίες παρακολουθούνταν στα τακτικά Εξωτερικά Ιατρεία της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας καθώς και επίτοκες, οι οποίες προσήλθαν να γεννήσουν στο εν λόγω Μαιευτήριο. Σε όλες αυτές τις γυναίκες, έγινε λήψη αρτηριακού αίματος για τον προσδιορισμό των ακόλουθων παραμέτρων:

- Αιματοκρίτη (Ht) και αιμοσφαιρίνης (Hb)
- MCV
- Fe και φερριτίνης ορού
- Τρανσφερρίνης και υποδοχέων τρανσφερρίνης (sTfR) ορού.

Οι έγκυες που συμπεριλήφθηκαν τελικώς στη μελέτη χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες:

- **Ομάδα Α:** Έγκυες γυναίκες με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία.
- **Ομάδα Β:** Έγκυες γυναίκες με σιδηροπενική αναιμία, οι οποίες πληρούσαν τις ακόλουθες προϋποθέσεις :  $Ht < 31\%$ ,  $Hb < 10 \text{ g/dL}$ ,  $Fe \text{ ορού} < 50 \text{ mg/dL}$ , φερριτίνη  $< 13 \text{ ng/dL}$ , Τρανσφερρίνη  $> 300 \text{ mg/dL}$ ,  $sTfR > 1.76 \text{ mg/L}$ .
- **Ομάδα Γ :** Έγκυες γυναίκες χωρίς “στίγμα” ή σιδηροπενική αναιμία, οι οποίες δεν είχαν παρουσιάσει κανένα πρόβλημα κατά τη διάρκεια της κύησης και οι οποίες παρουσίαζαν φυσιολογικές τιμές σε όλες τις παραπάνω αιματολογικές και βιοχημικές παραμέτρους.

Ο προσδιορισμός των αιματολογικών παραμέτρων , του σιδήρου και της φερριτίνης του ορού πραγματοποιήθηκε στα Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας , ενώ ο προσδιορισμός της τρανσφερρίνης και των υποδοχέων της έγινε με τη μέθοδο ELISA στο Εργαστήριο Ανοσολογίας του εν λόγω Νοσοκομείου.

Οι έγκυες, οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στην ομάδα της ετερόζυγης β-Μεσογειακής αναιμίας είχαν προσκομίσει αποτελέσματα εργαστηριακού ελέγχου τα οποία πιστοποιούσαν ότι ήταν όντως ετεροζυγώτες.

Τα στοιχεία, που καταγράφηκαν και ελήφθησαν υπόψη ήταν: η ηλικία της μητέρας, ο τόκος και η ηλικία της κύησης. Μετά τον τοκετό καταγράφηκαν επίσης το βάρος γέννησης του νεογνού, το Apgar Score αυτού στο 1' και 5' μετά τον τοκετό, καθώς και το αν χρειάστηκε και πόσο νοσηλεία στη ΜΕΝΝ (Μονάδα Εντατικής Νοσηλείας Νεογνών).

Όσον αφορά στον πλακούντα, αμέσως μετά την έξοδο του εμβρύου γινόταν απολίνωση των ομφαλικών αγγείων σε απόσταση περίπου 15-20 εκ. από το σημείο έκφυσής τους στο κοιλιακό τοίχωμα του νεογνού. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλιζόταν ένας ομοιόμορφος τρόπος απολίνωσης του πλακούντα, ενώ ελαχιστοποιείτο και η απώλεια μητρικού/εμβρυικού αίματος, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τις διαστάσεις και το βάρος του (Bowe et al., 1976). Ακολούθως, ο πλακούντας ζυγιζόταν, γινόταν καταγραφή του βάρους του και ακολουθούσε η αποστολή του στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής. Εκεί οι ιστοί υφίσταντο συγκεκριμένη επεξεργασία: Διατήρηση σε διάλυμα Φορμαλδεΰδης επί 24 ώρες και ακολούθως ένα

μικρό ιστοτεμάχιο εμβάπτιζόταν σε παραφίνη. Ύστερα από αυτή τη διαδικασία, ένας αριθμός τεμαχίων τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και γινόταν χρώση αιματοξυλίνης-ιωσίνης. Στη συνέχεια, όπως περιγράφεται παρακάτω, γινόταν ποσοτικός προσδιορισμός των VEGF, PlGF και HIF-1α με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων .

### **Ανοσοϊστοχημεία του VEGF**

Για την ανοσοϊστοχημεία του VEGF σε τομές παραφίνης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα VEGF PHARMIGEN (monoclonal mouse). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από Karosi.

1. Αποπαραφίνωση των τομών σε κλίβανο ( 60 min ή επί 12ωρο στους 60°C).
2. Αποπαραφίνωση των τομών με εμβάπτιση σε ξυλόλη 2φορές από 15 λεπτά.
3. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοόλ
  - 100% αιθανόλη για 10 λεπτά
  - 100% αιθανόλη για 2 λεπτά
  - 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
  - 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
4. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
5. Αποκάλυψη αντιγόνων : Οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα κιτρικού οξέος και στη συνέχεια επωάζονται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 850 watt για 20 λεπτά.
6. Οι τομές αφήνονται να κρυώσουν για 20 λεπτά.
7. Γίνεται έκπλυση των τομών με νερό βρύσης για 5 λεπτά.

8. Επώαση των τομών με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% για την κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης για 10 λεπτά.
9. Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο για 5 λεπτά.
10. Τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα TBST για 5 λεπτά.
11. Το διάλυμα σκουπίζεται με προσοχή γύρω από τον ιστό και μαρκάρεται με PAP-pen η περιοχή γύρω από αυτόν.
12. Οι τομές τοποθετούνται σε 200μL από το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος αραίωσης 1:75 και επωάζονται επί 12ωρο στους 4°C.
13. Έκπλυση των τομών επί 5 min με διάλυμα TBST 3 φορές.
14. Έγχυση 200μL από το αντιδραστήριο Envision (DAKO) , το οποίο είναι ένα πολυμερές συζευγμένο με υπεροξειδάση που φέρει επίσης αντισώματα έναντι των ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικιού. Οι τομές επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBST 3 φορές.
16. Οι τομές εμβαπτίζονται σε 200μL από το διάλυμα χρωμογόνου DAB (3.3 τετραϋδροχλωρική διαμινοβενζίνη)για 5 λεπτά. (Στα 5 ml substrate buffer που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου προσθέτονται 100μL DAB).
17. Έκπλυση με νερό βρύσης για 1 λεπτό.
18. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
19. Εναντιοχρωμασία με αιματοξυλίνη Harris 10% για 2 λεπτά.
20. Έκπλυση με νερό βρύσης .
21. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 96% 1λεπτό, 96% 1 λεπτό,



100%1 λεπτό, 100% 1 λεπτό.

22. Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη 2 φορές από 1 λεπτό.

23. Επικόλληση των καλυπτρίδων.

### **Ανοσοϊστοχημεία του PIGF**

Για την ανοσοϊστοχημεία του PIGF σε τομές παραφίνης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα PIGF Santa Cruz (polyclonal goat). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από πλακούντα.

1. Αποπαραφίνωση των τομών σε κλίβανο ( 60 λεπτά ή επί 12ωρο στους 60°C).
2. Αποπαραφίνωση των τομών με εμβάπτιση σε ξυλόλη 2X15 λεπτά.
3. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοόλ
  - 100% αιθανόλη για 10 λεπτά
  - 100% αιθανόλη για 2 λεπτά
  - 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
  - 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
4. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
5. Αποκάλυψη αντιγόνων : Οι τομές τοποθετούνται σε Tris-EDTA(pH 9|) και στη συνέχεια επωάζονται σε υδατόλουτρο PT στους 98°C για 25 λεπτά . Αφήνουμε να κρυώσουν για 20 λεπτά.
6. Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης για 5 λεπτά.
7. Επώαση των τομών με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% για την κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης για 10 λεπτά.
8. Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο για 5 λεπτά.

9. Τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα TBST για 5 λεπτά.
10. Το διάλυμα σκουπίζεται με προσοχή γύρω από τον ιστό και μαρκάρεται με PAP-pen η περιοχή γύρω από αυτόν.
11. Οι τομές τοποθετούνται σε 200μL από το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος αραίωσης 1:50 και επωάζονται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Έκπλυση των τομών επί 5 λεπτά με διάλυμα TBST επί 3 φορές.
13. Γίνεται χρήση του kit LSAB (DAKO). Τοποθετούνται 200μL από το αντιδραστήριο LINK (κίτρινο) και οι τομές επωάζονται για 15 λεπτά.
14. Έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBST επί 3 φορές.
15. Οι τομές εμβαπτίζονται σε 200μL από το διάλυμα STREPTAVIDIN (κόκκινο) και επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
16. Έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBST επί 3 φορές.
17. εμβάπτιση των τομών σε 200μL από το διάλυμα χρωμογόνου DAB (3.3 τετραϋδροχλωρική διαμινοβενζίνη ) για 5 λεπτά .(Στα 5 ml substrate buffer περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου προσθέτονται 100μL DAB).
18. Έκπλυση με νερό βρύσης για 1 λεπτό.
19. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
20. Εναντιοχρωμασία με αιματοξυλίνη Harris 10% για 2 λεπτά.
21. Έκπλυση με νερό βρύσης .
22. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 96% 1 λεπτό, 96% 1 λεπτό 100% 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό.

23. Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη 2 φορές από 1 λεπτό.

24. Επικόλληση των καλυπτρίδων.

### **Ανοσοϊστοχημεία του HIF-1α**

Για την ανοσοϊστοχημεία του HIF-1α σε τομές παραφίνης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα HIF-1α SANTA CRUZ (polyclonal rabbit). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από Ca νεφρού.

1. Αποπαραφίνωση των τομών σε κλίβανο ( 60 λεπτά ή επί 12ωρο στους 60°C).
2. Αποπαραφίνωση των τομών με εμβάπτιση σε ξυλόλη 2φορές από 15 λεπτά.
3. Ενυδάτωση των τομών σε κατιούσα αλκοόλ
  - 100% αιθανόλη για 10 λεπτά
  - 100% αιθανόλη για 2 λεπτά
  - 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
  - 96% αιθανόλη για 1 λεπτό
4. Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
5. Αποκάλυψη αντιγόνων : Οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα κιτρικού οξέως και στη συνέχεια επωάζονται σε φούρνο μικροκυμάτων στα 850 watt για 20 λεπτά.
6. Οι τομές αφήνονται να κρυώσουν για 20 λεπτά.
7. Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης για 5 λεπτά
8. Επώαση των τομών με διάλυμα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% για την κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης για 10 λεπτά.
9. Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης και απεσταγμένο για 5 λεπτά.

10. Τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα TBST για 5 λεπτά.
11. Το διάλυμα γύρω από τον ιστό σκουπίζεται με προσοχή και μαρκάρεται με PAP-pen η περιοχή γύρω από αυτόν.
12. Οι τομές τοποθετούνται σε 200  $\mu$ L από το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος αραίωσης 1:200 και επωάζονται επί 12ωρο στους 4°C.
13. Έκπλυση των τομών επί 5 min με διάλυμα TBST επί 3 φορές.
14. Γίνεται έγχυση 200 $\mu$ L από το αντιδραστήριο Envision (DAKO), το οποίο είναι ένα πολυμερές συζευγμένο με υπεροξειδάση που φέρει επίσης αντισώματα έναντι των ανοσοσφαιρινών κουνελιού και ποντικιού. Οι τομές επωάζονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Έκπλυση των τομών σε διάλυμα TBST επί 3 φορές.
16. Οι τομές τοποθετούνται σε 200 $\mu$ L από το διάλυμα χρωμογόνου DAB (3.3 τετραϋδροχλωρική διαμινοβενζίνη) για 5 λεπτά. (Στα 5 ml substrate buffer που περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου προσθέτονται 100 $\mu$ L DAB).
17. Έκπλυση με νερό βρύσης για 1 λεπτό
18. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.
19. Εναντιοχρωμασία με αιματοξυλίνη Harris 10% για 2 λεπτά.
20. Έκπλυση με νερό βρύσης .
21. Αφυδάτωση των τομών σε ανιούσα αλκοολών: 96% 1 λεπτό, 96% 1 λεπτό, 100 1 λεπτό, 100% 1 λεπτό.
22. Εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη 2 φορές από 1 λεπτό.
23. Επικόλληση των καλυπτρίδων.

Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας, τα πλακίδια αξιολογήθηκαν τυφλά από τον παθολογοανατόμο. Η βαθμολόγηση της ανοσοδραστικότητας των VEGF και HIF-1α αξιολογήθηκε με βάση το **επί τοις εκατό ποσοστό** των κυττάρων τα οποία εμφάνισαν τη χρώση (θετικά κύτταρα) VEGF ή HIF-1α και την **ένταση** της χρώσης σε όλη την έκταση του δείγματος. Στην περίπτωση του VEGF, η θετική χρώση εντοπιζόταν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ στο HIF-1α στον πυρήνα του κυττάρου.

Το επί τοις εκατό ποσοστό των θετικών κυττάρων βαθμολογήθηκε ως εξής :

1 βαθμός :  $\leq 10\%$  θετικά κύτταρα

2 βαθμοί : 11-50% θετικά κύτταρα

3 βαθμοί : 50-80% θετικά κύτταρα

4 βαθμοί :  $\geq 81\%$  θετικά κύτταρα

Η ένταση της χρώσης βαθμολογήθηκε ως εξής :

1 βαθμός : ασθενής χρώση

2 βαθμοί : μέτρια ένταση της χρώσης

3 βαθμοί : ισχυρή χρώση.

Οι βαθμοί από τις δύο κατηγορίες (ποσοστό και ένταση της χρώσης) αθροίστηκαν και τα δείγματα ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με το συνολικό άθροισμα .

$\leq 10\%$  θετικά κύτταρα ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης και ασθενής χρώση:

3 βαθμοί. Μέτρια χρώση : 4-5 βαθμοί και έντονη χρώση : 6-7 βαθμοί

(Ioannou et al., 2009).

Στην περίπτωση της ανοσοϊστοχημείας του PIGF η ελήφθησαν υπόψιν η έκταση και η ένταση της χρώσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η έκταση της χρώσης βαθμολογήθηκε ως εξής :

1 βαθμός :  $\leq 10\%$  θετικά κύτταρα

2 βαθμοί : 10-50% θετικά κύτταρα

3 βαθμοί :  $> 50\%$  θετικά κύτταρα

Η ένταση της χρώσης βαθμολογήθηκε ως εξής :

1 βαθμός : ασθενής χρώση

2 βαθμοί : μέτρια ένταση της χρώσης

3 βαθμοί : ισχυρή χρώση.

Η τελική βαθμολόγηση προέκυψε από το άθροισμα της έκτασης της χρώσης επί την ένταση δίνοντας μια βαθμολογία από 4 έως 6. Η έκφραση του PIGF χαρακτηρίστηκε ως εξής :

Ασθενής χρώση : 4 , μέτρια χρώση : 5 και ισχυρή χρώση : 6.

(Tsens et al., 2006).

# ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Η πρώτη φάση επεξεργασίας των δεδομένων αφορούσε στον έλεγχο κανονικότητας των κατανομών. Στην περίπτωση των ποσοτικών μεταβλητών απαιτείται καταρχήν η διεξαγωγή ελέγχου κανονικότητας της κατανομής των δεδομένων. Ο έλεγχος κανονικότητας έγινε μέσω της απλής επισκόπησης των ιστογραμμάτων και των διαγραμμάτων πιθανότητας (P-P plots). Για την ανάλυση των δεδομένων, την διατύπωση ποσοτικών δηλώσεων και τον χαρακτηρισμό μιας κατανομής, χρησιμοποιήθηκαν αριθμητικά περιληπτικά μέτρα:

1. Μέτρα Κεντρικής Τάσης (μέση τιμή)
2. Μέτρα Διασποράς (εύρος και τυπική απόκλιση).

Στην περίπτωση των ποσοτικών μεταβλητών, απαιτείται καταρχήν η διεξαγωγή ελέγχου κανονικότητας της κατανομής των δεδομένων. Ο έλεγχος κανονικότητας έγινε μέσω της απλής επισκόπησης των ιστογραμμάτων και των διαγραμμάτων πιθανότητας (P-P plots). Έγινε επίσης έλεγχος της συμμετρίας της κατανομής. Η κανονική κατανομή είναι τελείως συμμετρική όταν η τιμή της ασυμμετρίας είναι 0. Οι ασύμμετρες κατανομές μπορεί να εμφανίζουν ένα μικρό βαθμό ασυμμετρίας, οπότε χαρακτηρίζονται λοξές. Η λοξότητα μπορεί να είναι θετική ή δεξιόστροφη (οπότε η κατανομή επεκτείνεται δυσανάλογα προς τις μεγάλες τιμές) και αρνητική ή αριστερόστροφη (οπότε η κατανομή επεκτείνεται δυνανάλογα προς τις μικρές τιμές). Σχετικά με την “ασυμμετρία”, όταν οι τιμές είναι μεγαλύτερες του +1 και μικρότερες

του -1, τότε υπάρχει έντονη ασυμμετρία, όταν είναι από +0.5-1 μέχρι -0.5-1, τότε υπάρχει μέτρια ασυμμετρία και όταν είναι μεταξύ +0.5 και - 0.5, τότε δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου ασυμμετρία (Field, 2009).

Για τον έλεγχο ανεξαρτησίας κατηγορικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό τεστ Chi-square ( $\chi^2$ ). Με τον έλεγχο  $\chi^2$ , συγκρίνονται οι συχνότητες (ή τα ποσοστά) στις διάφορες κατηγορίες των ονομαστικών μεταβλητών. Οι παραδοχές για τη χρήση του είναι σε τυχαίο δείγμα, το 20% των κελιών στους πίνακες να έχουν αναμενόμενη συχνότητα πάνω από 5 και ο αριθμός των παρατηρήσεων να είναι 25-250. Για την σύγκριση μέσων τιμών περισσότερων από δύο πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς με ένα παράγοντα (One-way-ANOVA). Στο στατιστικό αυτό έλεγχο, υπολογίστηκε η τιμή F. Η μηδενική υπόθεση, που ελέγχθηκε, είναι ότι οι μέσες τιμές της συνεχόμενης μεταβλητής των τριών ή περισσότερων πληθυσμών, από τους οποίους προήλθαν τα μελετώμενα δείγματα, ήταν ίσες. Η ανάλυση διασποράς μπορεί να ελέγξει αυτή τη μηδενική υπόθεση, αλλά για την πραγματοποίηση ανά δύο συγκρίσεων μεταξύ των μέσων χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή μιας μεθόδου πολλαπλής σύγκρισης (Post hoc Tukey).

Το μέγεθος της γραμμικής σχέσης μεταξύ δύο συνεχόμενων μεταβλητών εκτιμήθηκε με τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson (r), μέσω της ανάλυσης συσχέτισης. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης κυμαίνεται από -1 έως +1. Οι τιμές -1 και +1 προκύπτουν όταν υπάρχει μία τέλεια (αρνητική ή θετική, αντίστοιχα) γραμμική σχέση μεταξύ δύο μεταβλητών. Θετική συσχέτιση υπάρχει όταν και οι δύο μεταβλητές τείνουν σε μεγάλες ή χαμηλές τιμές μαζί και όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή



του  $r$  τόσο πιο μεγάλη είναι και η συσχέτισή τους. Στο στατιστικό αυτό έλεγχο, η μηδενική υπόθεση, που ελέγχθηκε, είναι ότι η τιμή της γραμμικής σχέσης μεταξύ των δύο μεταβλητών είναι ίση με 0, δηλαδή ότι δεν υπάρχει. Όταν ο συντελεστής συσχέτισης λαμβάνει τιμή 0, αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει γραμμική σχέση, αλλά δεν αποκλείεται μια άλλη μη γραμμική σχέση μεταξύ των μεταβλητών. Κατόπιν ελέγχου της κύρτωσης και λοξότητας των κατανομών των μεταβλητών, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές έδειχναν μικρό βαθμό λοξότητας. Ωστόσο, ο βαθμός λοξότητας δεν ήταν τέτοιος, ώστε να εφαρμοσθούν μη παραμετρικές στατιστικές μέθοδοι.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Ι** **ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΤΑΝΟΜΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ**

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 126 έγκυες γυναίκες, οι οποίες κατανεμήθηκαν ως εξής:

- **Ομάδα ελέγχου** : 34 άτομα
- **Ομάδα σιδηροπενικής αναιμίας** : 39 άτομα
- **Ομάδα ετερόζυγων στη β-θαλασσαιμία** : 53 άτομα.

Στους παρακάτω Πίνακες, παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των μεταβλητών που εξετάστηκαν και η σταθερή τους απόκλιση σε καθεμία από τις τρεις κατηγορίες και ακολούθως στο σύνολο των ομάδων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ήταν οι: ηλικία μητέρας, ηλικία κύησης, το βάρος γέννησης του νεογνού και το βάρος του πλακούντα, ο αιματοκρίτης, η αιμοσφαιρίνη και ο MCV της μητέρας, ο σίδηρος, η φερριτίνη, η τρανσφερρίνη και οι υποδοχείς της και το Apgar Score του νεογνού στο 1' και 5' μετά τον τοκετό. Επίσης, μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση των VEGF, PlGF και HIF-1α στους πλακούντες και καταγράφηκε ποσοτικά η έκφρασή τους.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1.: Περιγραφικά Αποτελέσματα στην Ομάδα Ελέγχου**

<b>Μορφομετρικές μεταβλητές</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση (SD)</b>
Ηλικία (έτη)	27.8	4.77
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	39.4	1.1
Βάρος Γέννησης (gr)	3372	372.2
Βάρος Πλακούντα (gr)	593.6	127.4
Αιματοκρίτης (%)	39.8	1.6
Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)	13.4	0.53
MCV(%)	90.3	5.4
Σίδηρος Ορού (mg/dL)	85.8	30.3
Φερριτίνη Ορού (ng/dL)	49.1	40.7
Τρανσφερίνη(TRF)(mg/dL)	249.8	55.6
Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF)(mg/dL)	1.2	0.35
APGAR 1'	8.2	0.68
APGAR 5'	9	0.62
VEGF	3.6	1.12
PIGF	5.8	0.39
HIF-1α	3.6	1.47

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2.: Περιγραφικά Αποτελέσματα στην Ομάδα των Σιδηροπενικών Γυναικών**

<b>Μορφομετρικές μεταβλητές</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση (SD)</b>
Ηλικία (έτη)	26.6	6.25
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	39	1.28
Βάρος Γέννησης (gr)	3426	484.7
Βάρος Πλακούντα (gr)	633.2	136.2
Αιματοκρίτης (%)	29.1	1.58
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	9.45	0.66
MCV (%)	74.3	5.2
Σίδηρος Ορού (mg/dL)	29.7	9.8
Φερριτίνη Ορού (ng/dL)	10.3	3.46
Τρανσφερίνη(TRF)(mg/dL)	401.5	83.4
Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF) (mg/dL)	2.95	1.8
APGAR 1'	7.58	0.96
APGAR 5'	8.5	1.09
VEGF	5.71	0.88
PlGF	4.4	0.49
HIF-1α	5.23	1.45

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3.: Περιγραφικά Αποτελέσματα στην Ομάδα των Γυναικών με Ετερόζυγη Β-Μεσογειακή Αναιμία**

<b>Μορφομετρικές μεταβλητές</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση (SD)</b>
Ηλικία (έτη)	28.9	4.26
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	38.8	1.14
Βάρος Γέννησης (gr)	3148	492.7
Βάρος Πλακούντα (gr)	556.7	97
Αιματοκρίτης (%)	31	1.98
Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)	9.95	0.71
MCV (%)	68.2	5.99
Σίδηρος Ορού (mg/dL)	96	56.8
Φερριτίνη Ορού (ng/dL)	38	33.4
Τρανσφερίνη(TRF)(mg/dL)	333.9	92.9
Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF) (mg/dL)	2.2	0.99
APGAR 1'	7.9	1.03
APGAR 5'	8.9	0.77
VEGF	5.77	0.93
PIGF	4.33	0.47
HIF-1α	5.6	1,06

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4.: Περιγραφικά Αποτελέσματα στο Σύνολο των Ομάδων**

<b>Μορφομετρικές μεταβλητές</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>Τυπική απόκλιση (SD)</b>
Ηλικία (έτη)	27.9	5.14
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	39	1.2
Βάρος Γέννησης (gr)	3295	474.5
Βάρος Πλακούντα (gr)	590	122.1
Αιματοκρίτης (%)	32.8	4.7
Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)	10.7	1.78
MCV (%)	76	10.6
Σίδηρος Ορού)(mg/dL)	72,7	49.7
Φερριτίνη Ορού)(ng/dL)	32.4	33.9
Τρανσφερίνη(TRF)(mg/dL)	332.2	99.36
Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF) (mg/dL)	2.18	1.13
APGAR 1'	7.9	0.95
APGAR 5'	8.86	0.87
VEGF	5.17	1.35
PlGF	4.76	0.79
HIF-1α	4.96	1.53

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ II**  
**ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΤΑΝΟΜΩΝ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ**  
**ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.1.: Αναλυτικά Αποτελέσματα στην Ομάδα Ελέγχου**

	N (αριθμός Γυναικών)	%
<b><u>Αριθμός Τέκνων:</u></b>		
1	17	50
2	16	47.1
3	1	2.9
Σύνολο	34	100
<b><u>Τύπος Τοκετού:</u></b>		
Φυσιολογικός	21	61.8
Καισαρική τομή (Κ.Τ.)	13	38.2
Σύνολο	34	100
<b><u>Σίδηρος (mg/dL):</u></b>		
Αυξημένος (> 152)	0	0
Φυσιολογικός	32	94.1
Ελαττωμένος (< 49)	2	5.9
Σύνολο	34	100
<b><u>Φερριτίνη (ng/dL):</u></b>		
Φυσιολογική (> 29)	26	76.5
Μη Φυσιολογική (< 29)	8	23.5
Σύνολο	34	100
<b><u>Παραμονή στη Μ.Ε.Ν.Ν.:</u></b>		
OXI	30	88.2
NAI	4	11.8
Σύνολο	34	100
<b><u>Ημέρες παραμονής στη Μ.Ε.Ν.Ν.:</u></b>		
0	30	88.2
1	1	2.9
2	2	5.9
3	1	2.9
Σύνολο	34	100
<b><u>VEGF:</u></b>		
Ασθενής χρώση	19	55.9
Μέτρια χρώση	12	35.3
Ισχυρή χρώση	3	8.8
Σύνολο	34	100
<b><u>VEGF (Αναλυτικά):</u></b>		

2	4	11.8
3	15	44.1
4	8	23.5
5	4	11.8
6	3	8.8
Σύνολο	34	100
<b><u>PIGF:</u></b>		
Ασθενής χρώση	0	0
Μέτρια χρώση	6	17.6
Ισχυρή χρώση	28	82.4
Σύνολο	34	100
<b><u>HIF-1α:</u></b>		
Ασθενής χρώση	19	55.9
Μέτρια χρώση	10	29.4
Ισχυρή χρώση	5	14.7
Σύνολο	34	100
<b><u>HIF-1α(Αναλυτικά):</u></b>		
2	9	26.5
3	10	29.4
4	5	14.7
5	5	14.7
6	4	11.8
7	1	2.9
Σύνολο	34	100

Όπως παρατηρούμε στην Ομάδα ελέγχου, το 50% των γυναικών ήταν πρωτοτόκοι και το 47.1% δευτεροτόκοι. Όσον αφορά στον τρόπο τοκετού, η πλειοψηφία αυτών γέννησε με φυσιολογικό τοκετό (61.8%). Το 94.1% των γυναικών είχε φυσιολογικά επίπεδα σιδήρου στον ορρό και το 76.5% φυσιολογική φερρίτινη. Το 88.2% των νεογνών δεν χρειάστηκε νοσηλεία στη MENN, ενώ στην περίπτωση που χρειάστηκε να γίνει, η παραμονή διήρκεσε το πολύ 3 εικοσιτετράωρα.

Η έκφραση του VEGF και του HIF-1α ήταν ασθενής στην ομάδα ελέγχου (55.9% και στις 2 περιπτώσεις), ενώ η έκφραση του PIGF αντιθέτως, ήταν ισχυρή το 82.4% των περιπτώσεων και μέτρια στο υπόλοιπο 17.6%



**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.2.: Αναλυτικά Αποτελέσματα στην Ομάδα των Σιδηροπενικών Γυναικών**

	N (αριθμός Γυναικών)	%
<b><u>Αριθμός Τέκνων:</u></b>		
1	10	25.6
2	19	48.7
3	5	12.8
4	2	5.1
≥ 5	3	7.7
Σύνολο	39	100
<b><u>Τύπος Τοκετού:</u></b>		
Φυσιολογικός	26	66.7
Καισαρική τομή (Κ.Τ.)	13	33.3
Σύνολο	39	100
<b><u>Σίδηρος (mg/dL):</u></b>		
Αυξημένος (> 152)	0	0
Φυσιολογικός	2	5.1
Ελαττωμένος (< 49)	37	94.9
Σύνολο	39	100
<b><u>Φερριτίνη (ng/dL):</u></b>		
Φυσιολογική (> 13)	0	0
Μη Φυσιολογική (<13)	39	100
Σύνολο	39	100
<b><u>Παραμονή στη Μ.Ε.Ν.Ν.:</u></b>		
ΟΧΙ	33	84.6
ΝΑΙ	6	15.4
Σύνολο	39	100
<b><u>Ημέρες παραμονής στη Μ.Ε.Ν.Ν.:</u></b>		
0	33	84.6
5	1	2.55
6	1	2.55
7	1	2.55
8	1	2.55
12	2	5.2
Σύνολο	39	100
<b><u>VEGF:</u></b>		
Ασθενής χρώση	0	0
Μέτρια χρώση	18	46.2
Ισχυρή χρώση	21	53.8

Σύνολο	39	100
<b><u>VEGF (Αναλυτικά):</u></b>		
2	0	0
3	0	0
4	2	5.1
5	16	41
6	12	30.8
7	9	23.1
Σύνολο	39	100
<b><u>PIGF:</u></b>		
Ασθενής χρώση (4)	23	59
Μέτρια χρώση (5)	16	41
Ισχυρή χρώση (6)	0	0
Σύνολο	39	100
<b><u>HIF-1α:</u></b>		
Ασθενής χρώση	6	15.4
Μέτρια χρώση	13	33.3
Ισχυρή χρώση	20	51.3
Σύνολο	39	100
<b><u>HIF-1α (Αναλυτικά):</u></b>		
2	1	2.6
3	5	12.8
4	7	17.9
5	6	15.4
6	11	28.2
7	9	23.1
Σύνολο	39	100

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.: Αναλυτικά Αποτελέσματα στην Ομάδα των Γυναικών με Ετερόζυγη β-Μεσογειακή Αναιμία**

	N (αριθμός Γυναικών)	%
<b><u>Αριθμός Τέκνων:</u></b>		
1	31	58.5
2	17	32.1
3	4	7.5
4	1	1.9
Σύνολο	53	100
<b><u>Τύπος Τοκετού:</u></b>		
Φυσιολογικός	30	56.6

Καισαρική τομή (Κ.Τ.)	23	43.4
Σύνολο	53	100
<b><u>Σίδηρος (mg/dL):</u></b>		
Αυξημένος (> 152)	11	20.8
Φυσιολογικός	27	50.9
Ελαττωμένος (< 49)	15	28.3
Σύνολο	53	100
<b><u>Φερριτίνη(ng/dL):</u></b>		
Φυσιολογική (> 13)	22	41.5
Μη Φυσιολογική (< 13)	31	58.5
Σύνολο	53	100
<b><u>Παραμονή στη Μ.Ε.Ν.Ν.:</u></b>		
OXI	49	92.5
NAI	4	7.5
Σύνολο	53	100
<b><u>Ημέρες παραμονής στη Μ.Ε.Ν.Ν.:</u></b>		
0	49	92.5
2	1	1.9
3	1	1.9
15	2	3.8
Σύνολο	53	100
<b><u>VEGF:</u></b>		
Ασθενής χρώση	0	0
Μέτρια χρώση	16	30.2
Ισχυρή χρώση	37	69.8
Σύνολο	53	100
<b><u>VEGF (Αναλυτικά):</u></b>		
2	0	0
3	0	0
4	7	13.2
5	9	17
6	26	49
7	11	20.8
Σύνολο	53	100
<b><u>PIGF:</u></b>		
Ασθενής χρώση (4)	35	66
Μέτρια χρώση (5)	18	34
Ισχυρή χρώση (6)	0	0
Σύνολο	53	100
<b><u>HIF-1α:</u></b>		
Ασθενής χρώση	2	3.8
Μέτρια χρώση	18	34

Ισχυρή χρώση	33	62.2
Σύνολο	53	100
<b><u>HIF-1α (Αναλυτικά):</u></b>		
2	0	0
3	2	3.8
4	7	13.2
5	11	20.8
6	23	43.4
7	10	18.9
Σύνολο	53	100

Στην ομάδα της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας, το 58.5% των γυναικών ήταν πρωτοτόκοι και το 32.1% δευτεροτόκοι. Ο φυσιολογικός τοκετός ήταν η συχνότερη μέθοδος τοκετού στο 56.6% των περιπτώσεων. Το 50.8% παρουσίαζε φυσιολογικά επίπεδα σιδήρου (50.9%), ενώ στο 20.8% των περιπτώσεων τα επίπεδά του ήταν πολύ υψηλά. Αντιθέτως, η φερριτίνη ήταν ελαττωμένη στο 58.3% των περιπτώσεων και αυξημένη στο υπόλοιπο 41.5%. Στην ομάδα αυτή, μόλις το 7.5% των νεογνών χρειάστηκε νοσηλεία στη ΜΕΝΝ αλλά το 50% αυτών παρέμεινε για 15 ημέρες λόγω αναπνευστικής δυσχέρειας.

Η έκφραση των VEGF και HIF-1α στην ομάδα των ετεροζυγών ήταν έντονη (69.8% και 62.2% αντίστοιχα) και μέτρια (30.2% και 34% αντίστοιχα). Αντίθετα, ο PlGF παρουσίαζε ασθενή χρώση στο 66% των δειγμάτων και μέτρια χρώση στο υπόλοιπο 34%, ενώ σε κανένα δείγμα δεν διαπιστώθηκε ισχυρή χρώση.

Πιο αναλυτικά, διαπιστώνεται ότι σε 11 περιπτώσεις η χρώση του VEGF ήταν πολύ έντονη, οπότε βαθμολογήθηκε με 7, ενώ σε 26 περιπτώσεις ήταν ελαφρώς ασθενέστερη και βαθμολογήθηκε με 6. Σε 9 περιπτώσεις, η χρώση ήταν ενδιάμεση

και βαθμολογήθηκε με 5 και στις υπόλοιπες 7 ήταν πιο ασθενής και η βαθμολογία ήταν 4. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί, ότι δεν διαπιστώθηκε ασθενής χρώση στο VEGF στην ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας.

Ομοίως, στην περίπτωση του HIF-1α, έντονη χρώση (7) παρατηρήθηκε σε 10 περιπτώσεις και ελαφρώς ασθενέστερη σε 23 περιπτώσεις. Ενδιάμεση χρώση, η οποία βαθμολογήθηκε με 5 βαθμούς, παρατηρήθηκε σε 11 περιπτώσεις, ενώ σε 7 περιπτώσεις βαθμολογήθηκε με 4 .

**Στην ομάδα των σιδηροπενικών εγκύων**, η πλειοψηφία ήταν πολυτόκοι (48.7%), ενώ το 7.7% αυτών είχαν από 5 παιδιά και άνω. Και σε αυτή την ομάδα, ο φυσιολογικός τοκετός ήταν ο συχνότερος τρόπος τοκετού (66.7%), ενώ το 15.4% των παιδιών που γεννήθηκαν χρειάστηκαν νοσηλεία στη MENN , σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και για 12 ημέρες (5.2%). Η συντριπτική πλειοψηφία αυτής της ομάδας ήταν σιδηροπενική (94.9%), με χαμηλά επίπεδα φερριτίνης (100%).

Οι VEGF και HIF-1α εκφραζόταν ισχυρά (53.8% και 51.3% αντίστοιχα) και μέτρια (46.2% και 33.3% αντίστοιχα), ενώ ο PlGF εκφραζόταν ασθενώς στο 59% των περιπτώσεων.

Πιο αναλυτικά, διαπιστώνεται ότι σε 9 περιπτώσεις η χρώση του VEGF ήταν πολύ έντονη, οπότε βαθμολογήθηκε με 7, ενώ σε 12 περιπτώσεις ήταν ελαφρώς ασθενέστερη και βαθμολογήθηκε με 6. Σε 16 περιπτώσεις η χρώση ήταν ενδιάμεση και βαθμολογήθηκε με 5 και στις υπόλοιπες 2 ήταν πιο ασθενής και η βαθμολογία ήταν 4. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί, ότι δεν διαπιστώθηκε ασθενής χρώση στον

παράγοντα VEGF και στην ομάδα των σιδηροπενικών εγκύων .

Ομοίως, στην περίπτωση του HIF-1α, έντονη χρώση (7) παρατηρήθηκε σε 11 περιπτώσεις και ελαφρώς ασθενέστερη σε 9 περιπτώσεις. Ενδιάμεση χρώση, η οποία βαθμολογήθηκε με 5 βαθμούς, παρατηρήθηκε σε 6 περιπτώσεις ενώ σε 7 περιπτώσεις βαθμολογήθηκε με 4 .Υπήρχαν όμως και 5 πλακούντες με ασθενή χρώση οι οποίοι βαθμολογήθηκαν με 2 βαθμούς.

#### **ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4.: Αναλυτικά Αποτελέσματα στο Σύνολο των Ομάδων**

	<b>N (αριθμός Γυναικών)</b>	<b>%</b>
<b><u>Αριθμός Τέκνων:</u></b>		
1	58	46
2	52	41,3
3	10	7.9
4	3	2.4
6	1	0.8
9	1	0.8
11	1	0.8
Σύνολο	126	100
<b><u>Τύπος Τοκετού:</u></b>		
Φυσιολογικός	77	61.1
Καισαρική τομή (Κ.Τ.)	49	38.9
Σύνολο	126	100
<b><u>Σίδηρος (mg/dL):</u></b>		
Αυξημένος (> 152)	11	8.7
Φυσιολογικός	61	48.4
Ελαττωμένος (< 49)	54	42.9
Σύνολο	126	100
<b><u>Φερριτίνη (ng/dL):</u></b>		
Φυσιολογική (> 13)	48	38.1
Μη Φυσιολογική (< 13)	78	61.9
Σύνολο	126	100
<b><u>Παραμονή στη Μ.Ε.Ν.Ν.:</u></b>		
ΟΧΙ	112	88.9
ΝΑΙ	14	11.1
Σύνολο	126	100

**Ημέρες παραμονής στη Μ.Ε.Ν.Ν.:**

0	112	88.9
1	1	0.79
2	3	2.4
3	2	1.6
5	1	0.79
6	1	0.79
7	1	0.79
8	1	0.79
12	2	1.6
15	2	1.6
Σύνολο	126	100

**VEGF:**

Ασθενής χρώση	19	15.1
Μέτρια χρώση	46	36.5
Ισχυρή χρώση	61	48.4
Σύνολο	126	100

**PIGF:**

Ασθενής χρώση (4)	58	46
Μέτρια χρώση (5)	40	31.7
Ισχυρή χρώση (6)	28	22.3
Σύνολο	126	100

**HIF-1α:**

Ασθενής χρώση	27	21.6
Μέτρια χρώση	41	32.8
Ισχυρή χρώση	58	45.6
Σύνολο	126	100

Στο σύνολο τώρα του πληθυσμού, το 46% των γυναικών ήταν πρωτοτόκοι και το 41.3% δευτεροτόκοι και το 61.1 % των γυναικών γέννησε με φυσιολογικό τοκετό.

Οι VEGF και HIF-1α είχαν ισχυρή έκφραση (48.4% και 45.6% αντίστοιχα), μέτρια έκφραση (36.5% και 32.8%) και τέλος, ασθενή στο 15.1% και 21.6% αντίστοιχα.

Ο PIGF στο 46% των περιπτώσεων είχε ασθενή χρώση, στο 31.7% μέτρια και στο 22.3% ισχυρή.

Στο 48.4% των περιπτώσεων τα επίπεδα σιδήρου ήταν φυσιολογικά, στο 42.9%

ελαττωμένα και στο 8.7% αυξημένα.

Ωστόσο, τα επίπεδα φερριτίνης ήταν ελαττωμένα στο 61.9% των περιπτώσεων. Από τα νεογνά που γεννήθηκαν από τις γυναίκες αυτές, το 88.9% δε χρειάστηκε νοσηλεία στη ΜΕΝΝ, ενώ στο υπόλοιπο 11,1% ο χρόνος νοσηλείας δεν ξεπέρασε τις 15 ημέρες.



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΙΙΙ

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ $\chi^2$

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1.: Χρώση του VEGF στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b>VEGF:</b>	%	%	%	
Ασθενής χρώση	55.9	0	0	p<0.001 ( $\chi^2 = 69.257$ )
Μέτρια χρώση	35.3	46.2	30.2	
Ισχυρή χρώση	8.8	53.8	69.8	
Σύνολο	100	100	100	

Όπως προκύπτει από τον **Πίνακα 3.1**, η πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία εμφάνιζε έντονη χρώση στον παράγοντα VEGF, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας ελέγχου που εμφάνιζε ασθενή χρώση. Ισχυρή χρώση στον παράγοντα VEGF παρουσίαζε επίσης και το 53.8% των γυναικών με σιδηροπενική αναιμία. Επιπρόσθετα, τόσο στην ομάδα σιδηροπενικών γυναικών όσο και στην ομάδα ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας, το ποσοστό της ασθενούς χρώσης ήταν μηδενικό. Το εύρημα αυτό ήταν στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο  $p < 0.001$ . Αντίθετα, η διαφορά στην έκφραση του VEGF ανάμεσα στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα με β-θαλασσαιμία δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2.: Αναλυτική περιγραφή της χρώσης του VEGF στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b><u>VEGF (Αναλυτικά):</u></b>				
	%	%	%	
2	11.8	0	0	p<0.001 ( $\chi^2 = 82.006$ )
3	44.1	0	0	
4	23.5	5.1	13.2	
5	11.8	41	17	
6	8.8	30.8	49	
7	0	23.1	20	
Σύνολο	100	100	100	

Στον **Πίνακα 3.2** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ευρήματα σχετικά με την χρώση του παράγοντα VEGF. Πιο συγκεκριμένα, το 49% των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία βαθμολογήθηκαν με 6 βαθμούς ως προς τον VEGF (ισχυρή χρώση) , ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις σιδηροπενικές ήταν 30.8%. Στην ομάδα ελέγχου, το 44.1 % βαθμολογήθηκε με 3 βαθμούς (ασθενής χρώση). Τα ευρήματα αυτά ήταν στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο  $p < 0.001$ .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3: Χρώση του HIF-1α στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b>HIF-1α:</b>	%	%	%	
Ασθενής χρώση	55.9	15.8	3.8	p<0.001 ( $\chi^2 = 37.560$ )
Μέτρια χρώση	29.4	34.2	34	
Ισχυρή χρώση	14.7	50	62.3	
Σύνολο	100	100	100	

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 3.3** φαίνεται ότι η ασθενής χρώση του HIF-1α αφορούσε στην πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας ελέγχου και μόνο σχεδόν το 16% της ομάδας σιδηροπενικών γυναικών και το 4% της ομάδας γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Αντίθετα, ισχυρή χρώση του HIF-1α παρουσίασε η πλειοψηφία των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και το 50% των γυναικών με σιδηροπενική αναιμία. Το εύρημα ήταν στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο  $p < 0.001$ .

Αντίθετα, η διαφορά στην έκφραση του HIF-1α ανάμεσα στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα με β-θαλασσαιμία δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4: Αναλυτική περιγραφή της χρώσης του HIF-1α στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b><u>HIF-1α</u></b>				
<b><u>(Αναλυτικά):</u></b>	%	%	%	
2	26.5	2.6	0	p<0.001 ( $\chi^2 = 43.463$ )
3	29,4	12.8	3.8	
4	14.7	17.9	13.2	
5	14.7	15.4	20.8	
6	11.8	28.2	43.4	
7	2.9	23.1	18.9	
Σύνολο	100	100	100	

Στον **Πίνακα 3.4** παρουσιάζονται αναλυτικά τα ευρήματα σχετικά με την χρώση του παράγοντα HIF-1α. Πιο συγκεκριμένα, το 43.4 % των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία βαθμολογήθηκε με 6 βαθμούς ως προς τον HIF-1α (ισχυρή χρώση). Στην ομάδα ελέγχου, το 29.4 % βαθμολογήθηκε με 3 βαθμούς (ασθενής χρώση). Το εύρημα ήταν στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο  $p < 0.001$ .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5: Χρώση του PIGF στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b><u>PIGF:</u></b>	%	%	%	
Ασθενής χρώση (4)	0	59	66	p<0.001 ( $\chi^2 = 100.712$ )
Μέτρια χρώση (5)	17.6	41	34	
Ισχυρή χρώση (6)	82.4	0	0	
Σύνολο	100	100	100	

Όπως παρατηρείται στον **Πίνακα 3.5**, η συντριπτική πλειοψηφία των γυναικών στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε ισχυρή χρώση στον παράγοντα PlGF. Αντιθέτως, το 66% των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και το 59% των σιδηροπενικών γυναικών παρουσίαζαν ασθενή χρώση ως προς τον ίδιο παράγοντα. Το εύρημα αυτό ήταν στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο  $p < 0.001$ .

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6: Παραμονή στη M.E.N.N. των νεογνών στις 3 της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b><u>Παραμονή στη M.E.N.N.:</u></b>	%	%	%	( P=0.492)
OXI	88,2	84,6	92,5	(X <sup>2</sup> = 1,417)
NAI	11,8	15,4	7,5	
Σύνολο	100	100	100	

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς το ποσοστό των νεογνών, που νοσηλεύτηκαν στη M.E.N.N. ανάμεσα στις 3 ομάδες.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7: Επίπεδα σιδήρου στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b><u>Σίδηρος (mg/dL):</u></b>	%	%	%	
Αυξημένος (> 152)	0	0	20.8	p<0.001 (χ <sup>2</sup> = 83.071)
Φυσιολογικός	94.1	5.1	50.9	
Ελαττωμένος (< 49)	5.9	94.9	28.3	
Σύνολο	100	100	100	

Το 94.1% των γυναικών της ομάδας ελέγχου είχαν φυσιολογικές τιμές σιδήρου στον ορρό, ενώ το 94.9% των γυναικών με σιδηροπενική αναιμία είχαν ελαττωμένα

επίπεδα σιδήρου. Η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο  $p < 0.001$ .

Αξίζει ωστόσο να παρατηρήσει κανείς, ότι στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία το 51% είχε φυσιολογικά επίπεδα σιδήρου, το 20.8% αυξημένα και μόλις το 28.3% ελαττωμένα.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8: Επίπεδα φερριτίνης στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b>Φερριτίνη (ng/dL):</b>	%	%	%	
Φυσιολογική (>13)	76.5	0	44	$p < 0.001$ ( $\chi^2 = 45.516$ )
Ελαττωμένη (< 13)	23.5	100	56	
Σύνολο	100	100	100	

Ανάλογα ευρήματα με τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνονται στην περίπτωση της φερριτίνης, όπου το 100% των σιδηροπενικών γυναικών είχε χαμηλές τιμές, ενώ η πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας ελέγχου είχε φυσιολογικά επίπεδα. Το εύρημα ήταν στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο  $p < 0.001$ . Στην ομάδα των ετεροζυγωτών, το 56 % είχε χαμηλά επίπεδα φερριτίνης και το υπόλοιπο 44% φυσιολογικά.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.9: Τρόπος τοκετού στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b>Τρόπος Τοκετού:</b>	%	%	%	( $p = 0.617$ )
Φυσιολογικός	61.8	66.7	56.6	$(\chi^2 = 0.966)$
Καισαρική τομή (Κ.Τ.)	38.2	33.3	43.4	
Σύνολο	100	100	100	

Από τον παραπάνω Πίνακα, διαπιστώνεται ότι δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς τον τρόπο τοκετού ανάμεσα στις 3 ομάδες.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.10: Αριθμός των τέκνων στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία	p-value
<b><u>Αριθμός Τέκνων:</u></b>	%	%	%	
1	50	25.6	58.5	( p=0.019 > 0.001 ) ( $\chi^2 = 18.356$ )
2	47.1	48.7	32.1	
3	2.9	12.8	7.5	
4	0	5.1	1.9	
≥ 5	0	7.7	0	
Σύνολο	100	100	100	

Από τον παραπάνω Πίνακα διαπιστώνεται ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό των τέκνων ανάμεσα στις 3 ομάδες γυναικών.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ IV**  
**ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**  
**ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΑΝΟΒΑ**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1.: Μεταβολές των μεταβλητών στις 3 ομάδες της μελέτης**

Μεταβλητές	Control Group (N=34)	Ομάδα Σιδηροπενικών γυναικών (N=39)	Ομάδα γυναικών με Ετερόζυγη β-θαλασσαιμία (N=53)	p-value F-value	Post-Hoc Tukey test
<b><u>Ηλικία (έτη):</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	27.82 (4.8)	26.6 (6.3)	28.9 (4.2)	p=0.102 F = 2.321	
<b><u>Ηλικία κύησης (εβδομάδες)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	39.4 (1.1)	39.0 (1.28)	38.8 (1.1)	p=0.043 F = 3.233	C<A,B
<b><u>Βάρος Γέννησης (gr)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	3372 (372.2)	3426 (484.7)	3148 (492.8)	p=0.010 F = 4.492	C<A,B
<b><u>Βάρος Πλακούντα (gr)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	593.6 (127.5)	633.2 7 (136.2)	556.0 (97.02)	p=0.011 F = 4.683	B>A,C
<b><u>Αιματοκρίτης (%)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	39.8 (1.6)	29.1 (1.6)	31.0 (1.98)	p=0.000 F = 377.081	B<A,C
<b><u>Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	13.4 (0.52)	9.45 (0.66)	9.95 (0.71)	p=0.000 F = 404.761	B<A,C



<b><u>MCV(%)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	90.3 (5.43)	68.2 (6.08)	74.3 (5.23)	<b>p=0.000</b>	<b>B&lt;A,C</b>
				F = 163.526	
<b><u>Σίδηρος Ορού (mg/dL)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	85.8 (30.32)	29.7 (9.82)	96.0 (56.84)	<b>p=0.000</b>	<b>B&lt;A,C</b>
				F = 32,472	
<b><u>Φερριτίνη Ορού (ng/dL)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	49.0 (40.73)	10.3 (3.5)	38.0 (33.46)	<b>p=0.000</b>	<b>B&lt;A,C</b>
				F = 16.321	
<b><u>Τρανσφερίνη (TRF) (mg/dL)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	249.8 (55.6)	401.5 (83.4)	333.9 (93)	<b>p=0.000</b>	<b>A&lt;B,C</b>
				F = 31.527	
<b><u>Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF) (mg/dL)</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	1.23 (0.35)	2.96 (1.18)	2.22 (0.99)	<b>p=0.000</b>	<b>A&lt;B,C</b>
				F = 30.828	
<b><u>APGAR 1'</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	7.59 (0.96)	7.92 (1.03)	7.89 (0.95)	<b>p=0.020</b>	<b>A&lt;B,C</b>
				F = 4.015	
<b><u>APGAR 5'</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	9.0 (0.62)	8.5 (1.1)	8.98 (0.77)	<b>p=0.008</b>	<b>B&lt;A,C</b>
				F = 4.982	
<b><u>VEGF</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	3.61 (1.12)	5.72 (0.88)	5.77 (0.93)	<b>p=0.000</b>	<b>A&lt;B,C</b>
				F = 59.264	

<b><u>PIGF</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	5.82 (0.38)	4.41 (0.49)	4.33 (0.47)	<b>p=0.000</b>	<b>C&lt;A,B</b>
				F = 123.153	
<b><u>HIF-1a</u></b>					
Μέση τιμή (SD)	3.64 (1,47)	5.23 (1,46)	5.6 (1.06)	<b>p=0.000</b>	<b>A&lt;B,C</b>
				F = 24.276	

Από τη μελέτη του **Πίνακα 4.1.** διαπιστώνεται ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία της μητέρας ανάμεσα στις 3 ομάδες. Οι γυναίκες με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία γέννησαν σε στατιστικώς σημαντικά μικρότερη ηλικία κύησης ( $p < 0.05$ ), παιδιά των οποίων το βάρος γέννησης ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Το βάρος του πλακούντα ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο ( $p < 0,05$ ), στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών. Ο αιματοκρίτης, η αιμοσφαιρίνη, ο σίδηρος και η φερριτίνη του ορού ήταν χαμηλότερα στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό ( $p < 0,05$ ), ενώ η τρανσφερίνη και οι υποδοχείς της παρουσίαζαν υψηλότερες τιμές στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό ( $p < 0,05$ ). Το Apgar Score στο 1' ήταν υψηλότερο στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών ενώ στο 5' ήταν υψηλότερο στην ομάδα ελέγχου. Και τα δυο αυτά αποτελέσματα ήταν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ).

Ο VEGF παρουσίασε αυξημένη έκφραση στην ομάδα της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας και στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών, ενώ είχε ελαττωμένη έκφραση στην ομάδα ελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν στατιστικά σημαντικό

( $p < 0,05$ ).

Ομοίως, ο HIF-1 $\alpha$  παρουσίασε αυξημένη έκφραση στην ομάδα της ετερόζυγης  $\beta$ -θαλασσαιμίας και στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών, ενώ είχε ελαττωμένη έκφραση στην ομάδα ελέγχου. Η διαφορά ως προς το αποτέλεσμα αυτό ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό ( $p < 0,05$ ).

Αντίστροφα, στην περίπτωση του PlGF, διαπιστώθηκε ισχυρότερη χρώση του σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο στην ομάδα των φυσιολογικών πλακούντων, σε σχέση με τις υπόλοιπες 2 ομάδες.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ V**  
**ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**  
**ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ TUKEY, POST HOC, ANOVA**  
**(ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ VEGF, PlGF, HIF-1α ΜΕ ΟΛΕΣ ΤΙΣ**  
**ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ)**

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.1.: Συσχέτιση του PlGF με όλες τις υπόλοιπες μεταβλητές**

Μεταβλητές	Ασθενής χρώση (A)	Μέτρια χρώση (B)	Ισχυρή χρώση (C)	p-value	Post Hoc
	μέση τιμή, (SD)	μέση τιμή, (SD)	μέση τιμή, (SD)		
Ηλικία (έτη)	28.36 (5.3)	27.1 (5.2)	28.14 (4.74)	0.48	
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	38.8 (1.19)	39 (1.18)	39.5 (1.12)	<b>0.04</b>	C > A,B
Βάρος Γέννησης (gr)	3254 (582.2)	3323 (367.2)	3339.3 (354)	0.67	
Βάρος Πλακούντα (gr)	589.3 (125.7)	599.3 (118.9)	579.6 (122.3)	0.81	
Αιματοκρίτης (%)	29.5 (1.9)	32.6 (3.3)	39.9 (1.7)	<b>0.00</b>	A > B,C
Αιμοσφαιρίνη (gr/dl)	9.39 (0.62)	10.7 (1.15)	13.4 (0.53)	<b>0.00</b>	A > B,C
MCV (%)	69.2 (5.8)	75.9 (8.35)	90.5 (5.73)	<b>0.00</b>	A > B,C
Σίδηρος Ορού (mg/dL)	63.9 (51.6)	77.9 (55.9)	83.7 (30.8)	0.16	
Φερριτίνη Ορού (ng/dL)	24.25 (26.2)	36.8 (45.8)	43.2 (23.5)	<b>0.03</b>	C > A,B
Τρανσφερίνη (TRF) (mg/dL)	377.2 (104.7)	328.1 (69.7)	244.7 (56.7)	<b>0.00</b>	A > B,C
Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF) (mg/dL)	2.61 (1.24)	2.21 (0.95)	1.25 (0.34)	<b>0.00</b>	A > B,C
APGAR 1'	7.8 (0.78)	7.8 (1.25)	8.2 (0.72)	0.208	
APGAR 5'	8.75 (0.92)	8.85 (0.94)	9.1 (0.62)	0.227	

Η μελέτη του **Πίνακα 5.1** δείχνει ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων χρώσης του παράγοντα PlGF ως προς την ηλικία της μητέρας, το βάρος γέννησης του νεογνού, το βάρος γέννησης του πλακούντα, τα επίπεδα σιδήρου στον ορρό και το APGAR Score στο 1' και 5' λεπτό ζωής.

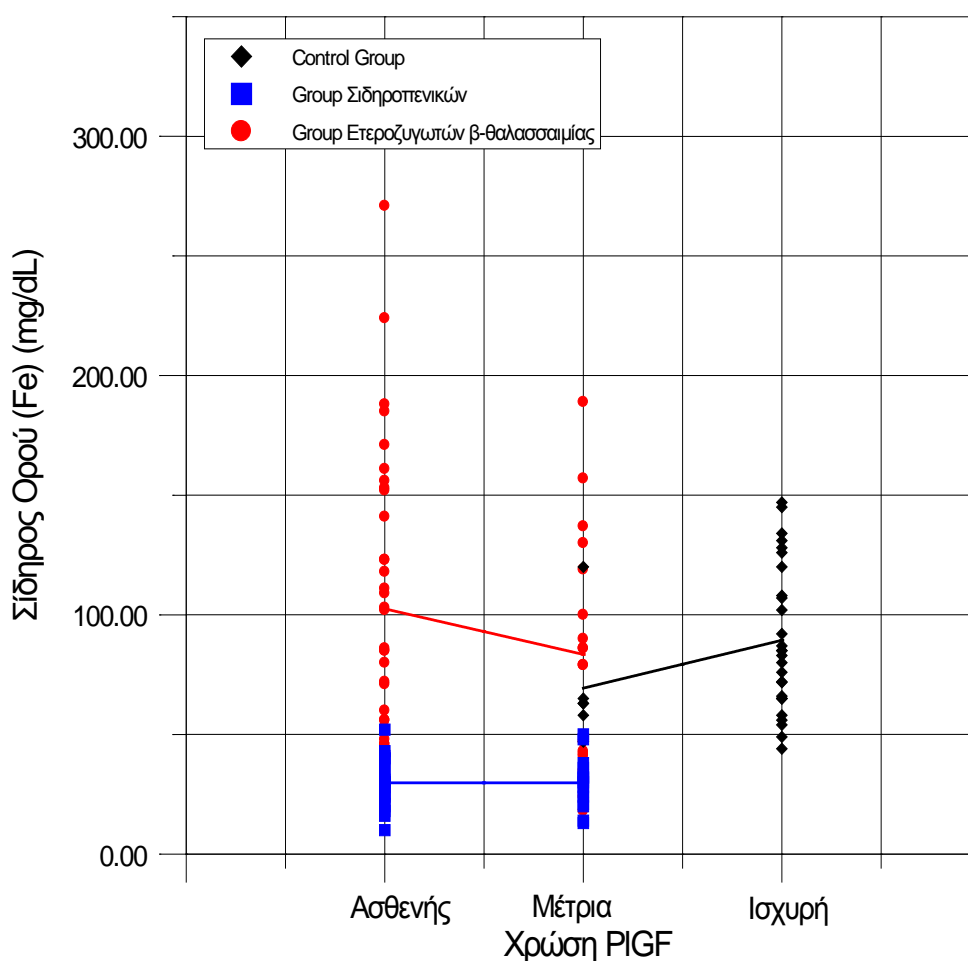
Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι η ομάδα των πλακούντων, στους οποίους ο PlGF είχε ασθενή χρώση, προέρχονταν από γυναίκες με στατιστικώς σημαντικά μικρότερη ηλικία κύησης, στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα φερριτίνης στον ορρό και στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες τιμές τρανσφερίνης και υποδοχέων TRF σε σχέση με τις ομάδες των πλακούντων, που εμφάνιζαν μέτρια ή ισχυρή χρώση.

Επίσης, φαίνεται ότι η ομάδα των πλακούντων, στους οποίους ο PlGF είχε ισχυρή χρώση, προέρχονταν από γυναίκες με στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης και MCV.

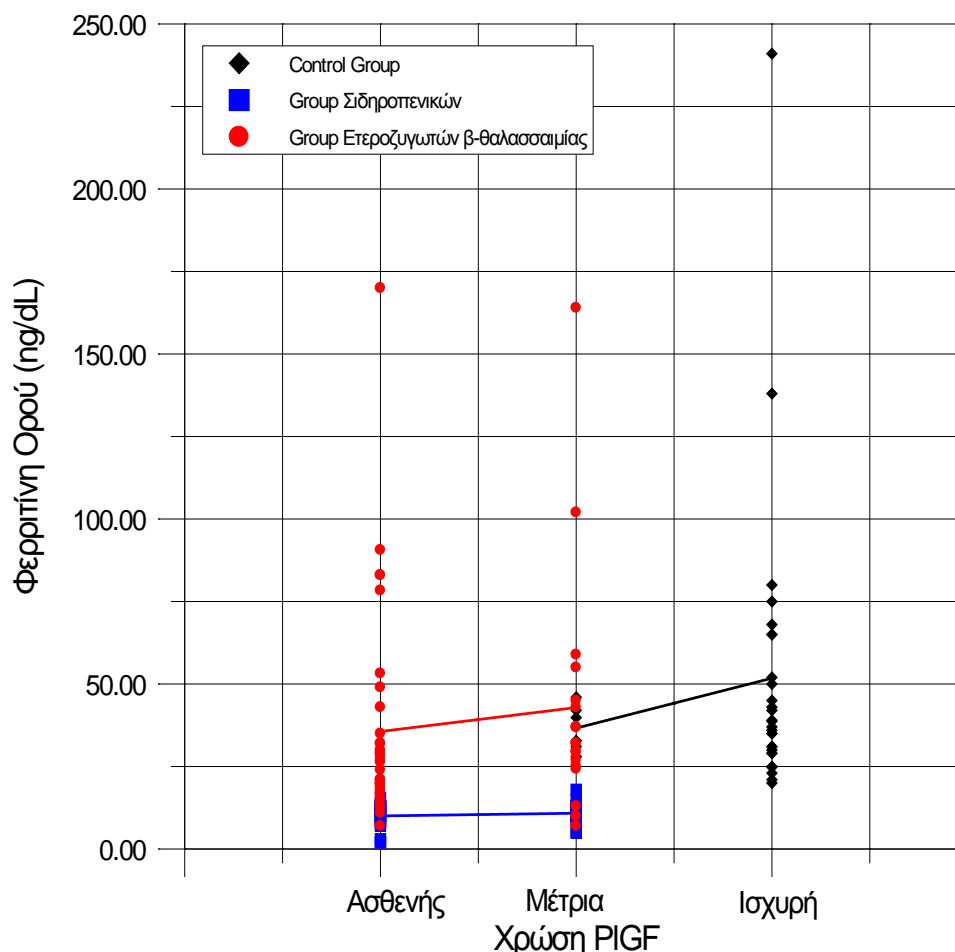
### **Διαγράμματα (1)**

Στα παρακάτω διαγράμματα, παρουσιάζονται οι μεταβολές στην έκφραση του PlGF σε σχέση με τα επίπεδα σιδήρου και φερριτίνης στον ορρό και τις τιμές του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης της μητέρας .

**Διάγραμμα 1α.** Μεταβολές του PlGF σε σχέση με τα επίπεδα σιδήρου του ορού στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Από τη μελέτη του διαγράμματος προκύπτει ότι στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών, τα χαμηλά επίπεδα σιδήρου συνοδεύονται από ασθενή ή μετρίου βαθμού έκφραση του παράγοντα PlGF. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Όσον αφορά στις υπόλοιπες δύο ομάδες, δεν προκύπτει καμμία συσχέτιση ανάμεσα στις δύο παραμέτρους, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

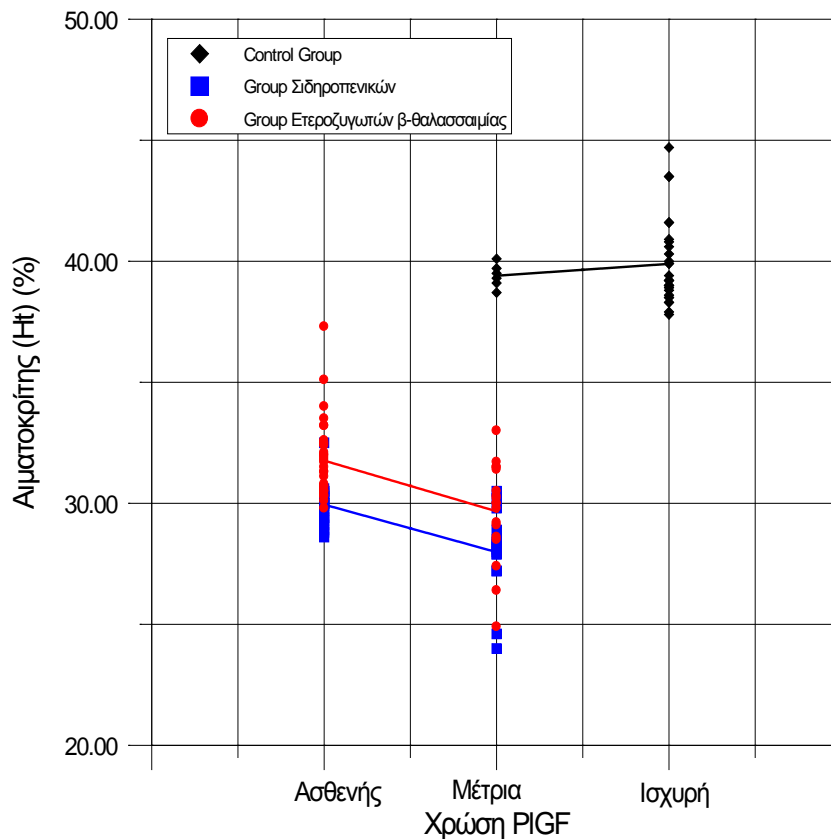


**Διάγραμμα 1β.** Μεταβολές του PlGF σε σχέση με τα επίπεδα φερριτίνης του ορού στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Όπως προκύπτει από τη μελέτη του παρακάτω πίνακα, διαπιστώνεται ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στις δύο αυτές παραμέτρους, καθώς σε χαμηλές τιμές φερριτίνης παρατηρείται ασθενής ή έντονη χρώση του PlGF και αντίστροφα. Το γεγονός αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, που ήδη αναφέρθηκαν.



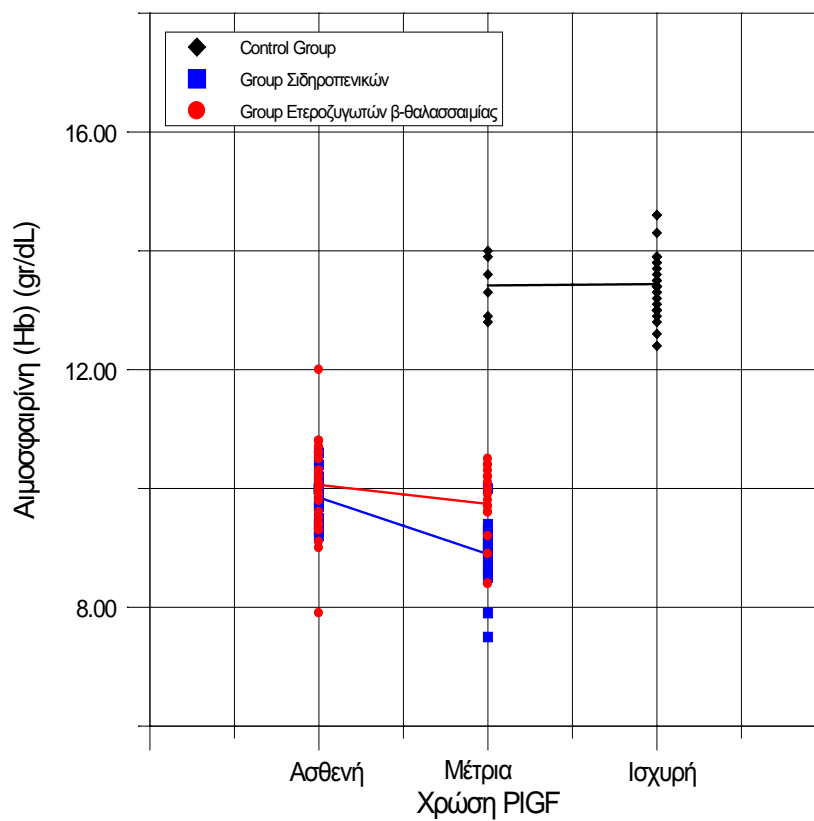
### Διάγραμμα 1γ.

Μεταβολή του PIGF σε σχέση με τον αιματοκρίτη στις 3 ομάδες της μελέτης.



### Διάγραμμα 1δ.

Μεταβολή του PIGF σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη στις 3 ομάδες της μελέτης.





Στα Διαγράμματα 1γ και 1δ παρουσιάζονται οι μεταβολές του PIGF σε σχέση με τον αιματοκρίτη και την αιμοσφαιρίνη στην ομάδα ελέγχου, την ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και την ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας. Και στα δύο διαγράμματα, είναι προφανής η συσχέτιση ανάμεσα στις δύο παραμέτρους (PIGF και Ht) και (PIGF και Hb), η οποία έρχεται σε συμφωνία με τα στατιστικά αποτελέσματα, που ήδη αναφέρθηκαν. Πιο αναλυτικά, στο Διάγραμμα 1γ διαπιστώνεται ότι στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών παρατηρείται ασθενής και μέτρια χρώση για τον PIGF, ενώ σε καμιά περίπτωση δεν υπάρχει ισχυρή χρώση. Το πιο σημαντικό όμως συμπέρασμα είναι ότι όσο πιο χαμηλές είναι οι τιμές του αιματοκρίτη τόσο πιο ασθενής είναι η χρώση για τον παράγοντα PIGF. Στην ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας, παρατηρείται επίσης μέτρια και ασθενής χρώση για το PIGF και εδώ εξάγεται το ίδιο συμπέρασμα με παραπάνω καθώς και στην ομάδα αυτή οι χαμηλότερες τιμές του αιματοκρίτη συνοδεύονται από ασθενέστερη χρώση για τον παράγοντα PIGF. Αντίστροφα, στην ομάδα ελέγχου, στην οποία οι τιμές του αιματοκρίτη είναι φυσιολογικές, παρατηρείται ισχυρή και σε κάποιες ελάχιστες περιπτώσεις, μέτρια χρώση του PIGF.

Στο διάγραμμα 1δ, είναι προφανής η αντιστοιχία των αποτελεσμάτων με το διάγραμμα 1γ και επιβεβαιώνεται η συσχέτιση των τιμών της αιμοσφαιρίνης με την ένταση της χρώσης του PIGF και στις 3 ομάδες, που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.2.: Συσχέτιση του VEGF με όλες τις υπολοιπες μεταβλητές**

Μεταβλητές	Ασθενής χρώση (A)	Μέτρια χρώση (B)	Ισχυρή χρώση (C)	p-value	Post Hoc
	μέση τιμή, (SD)	μέση τιμή, (SD)	μέση τιμή, (SD)		
Ηλικία (έτη)	28.42 (5.06)	27.00 (5.13)	28.37 (5.2)	0.4	
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	39.32 (1.02)	39.15 (1.21)	38.86 (1.22)	0.24	
Βάρος Γέννησης (gr)	3319 (492.3)	3316 (314.0)	3270 (587.8)	0.86	
Βάρος Πλακούντα (gr)	538.6 (88.9)	612.9 (135.5)	589.4 (116.8)	0.08	
Αιματοκρίτης (%)	39.9 (1.48)	33.3 (4.2)	30.2 (2.9)	<b>0.00</b>	A>B,C
Αιμοσφαιρίνη (gr/dl)	13.53 (0.45)	11.00 (1.50)	9.64 (1.06)	<b>0.00</b>	A>B,C
MCV (%)	78.2 (9.8)	69.8 (6.9)	76.0 (10.6)	<b>0.00</b>	A>B,C
Σίδηρος Ορού (mg/dL)	83.3 (35.1)	73.5 (52.0)	68.9 (58.0)	0.542	
Φερριτίνη Ορού (ng/dL)	38.5 (12.7)	36.5 (45.8)	27.5 (26.8)	0.275	
Τρανσφερίνη (TRF) (mg/dL)	251.8 (48.7)	322.8 (83.8)	364.2 (106.9)	0.161	
Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF) (mg/dL)	1.28 (0.34)	2.13 (1.02)	2.5 (1.2)	<b>0.00</b>	C > A,B
APGAR 1'	8.26 (0.65)	7.86 (1.18)	7.8 (0.81)	0.181	
APGAR 5'	9.21 (0.53)	8.84 (0.86)	8.77 (0.95)	0.161	
<b>PIGF</b>	<b>6.00</b> <b>(0.00)</b>	<b>5.08</b> <b>(0.55)</b>	<b>4.13</b> <b>(0.34)</b>	<b>0.00</b>	<b><u>A &gt; B,C</u></b>

Από τη μελέτη του **Πίνακα 5.2** διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων χρώσης του παράγοντα VEGF ως προς την ηλικία της μητέρας, το βάρος γέννησης του νεογνού, το βάρος γέννησης του

πλακούντα, τα επίπεδα σιδήρου, φερριτίνης και τρανσφερίνης στον ορρό και το APGAR Score στο 1' και 5' λεπτό ζωής. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι η ομάδα των πλακούντων, στους οποίους ο VEGF είχε έντονη χρώση, προέρχονταν από γυναίκες με στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης και MCV και στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα υποδοχέων τρανσφερίνης ( $p<0,05$ ).

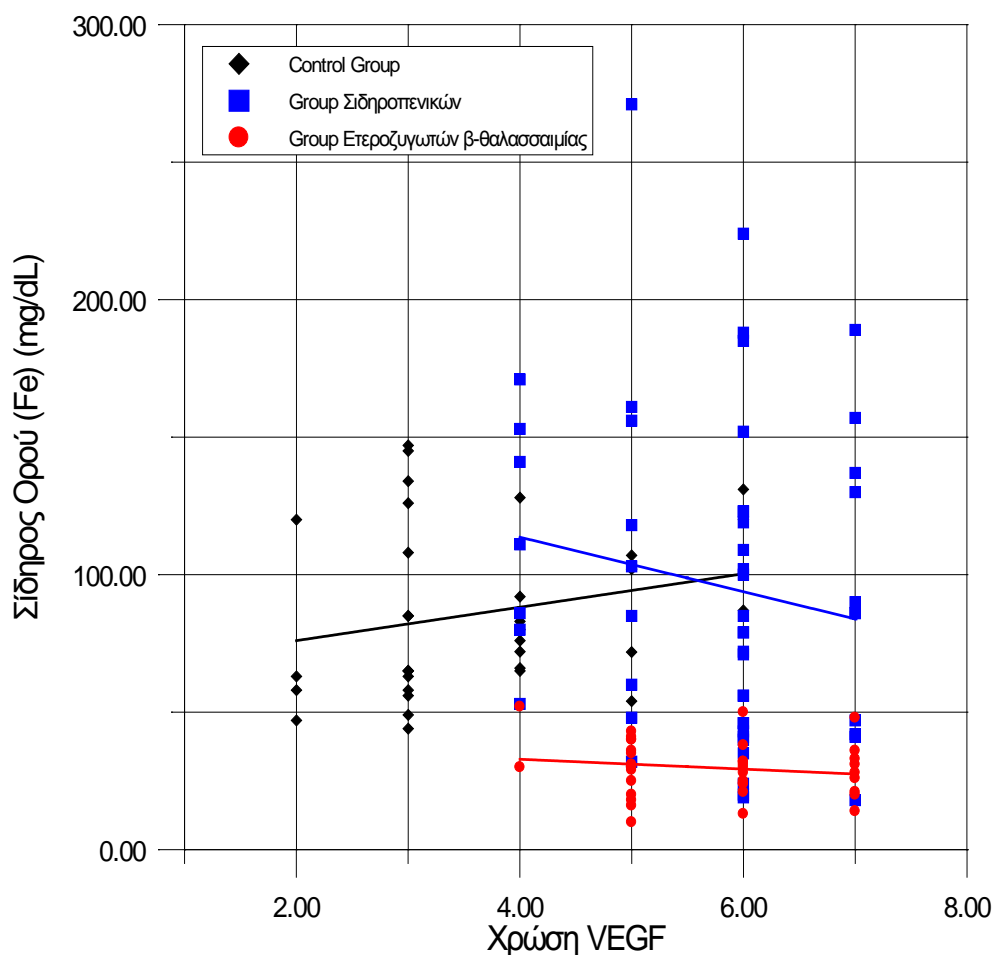
Τέλος, ασθενής χρώση του VEGF παρατηρήθηκε στην ομάδα των πλακούντων στους οποίους ο PlGF παρουσίαζε έντονη χρώση και αντίστροφα. Το εύρημα αυτό ήταν επίσης στατιστικώς σημαντικό.

## **Διαγράμματα (2)**

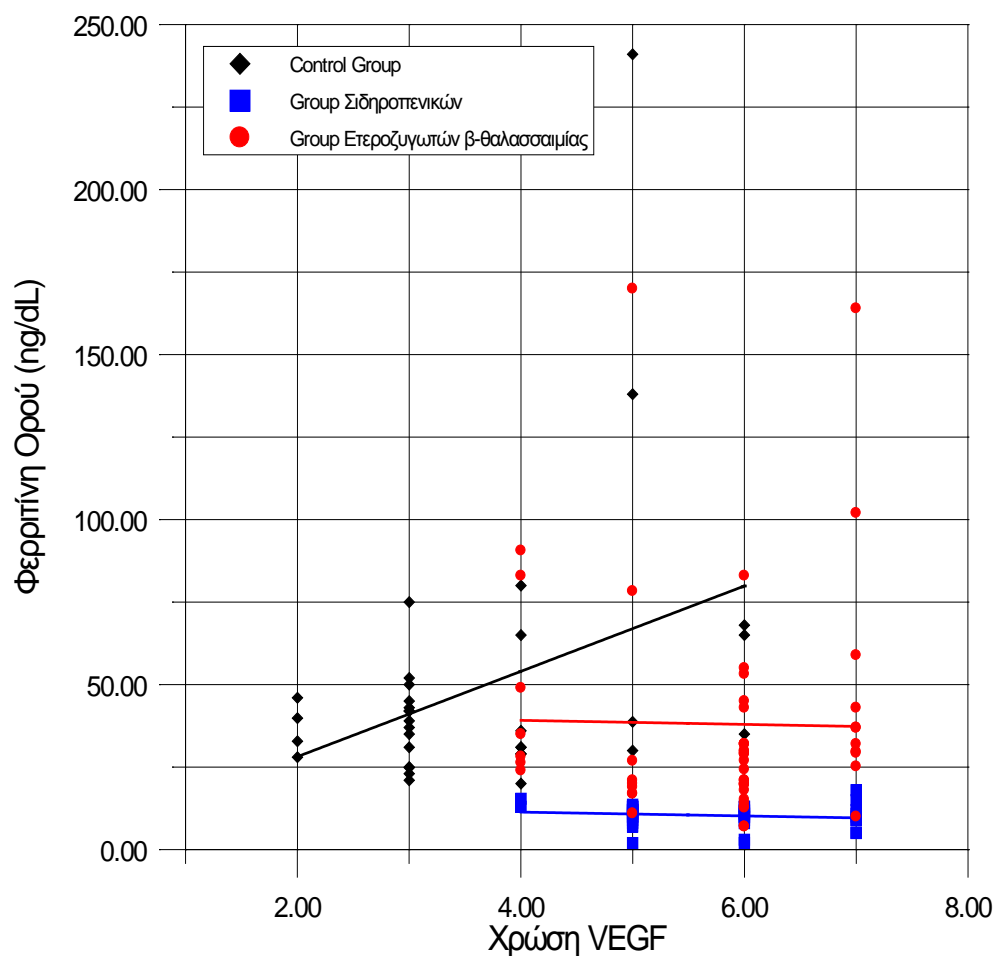
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι μεταβολές του PlGF, σε σχέση με τα επίπεδα σιδήρου και φερριτίνης στον ορρό και τις τιμές του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης της μητέρας .

**Διάγραμμα 2α .** Μεταβολές του VEGF σε σχέση με τα επίπεδα σιδήρου του ορρού στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία.

Όπως προκύπτει από τη μελέτη του παρακάτω πίνακα, δεν διαπιστώνεται καμμία συσχέτιση ανάμεσα στις δύο αυτές παραμέτρους, γεγονός που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων που ήδη αναφέρθηκαν.

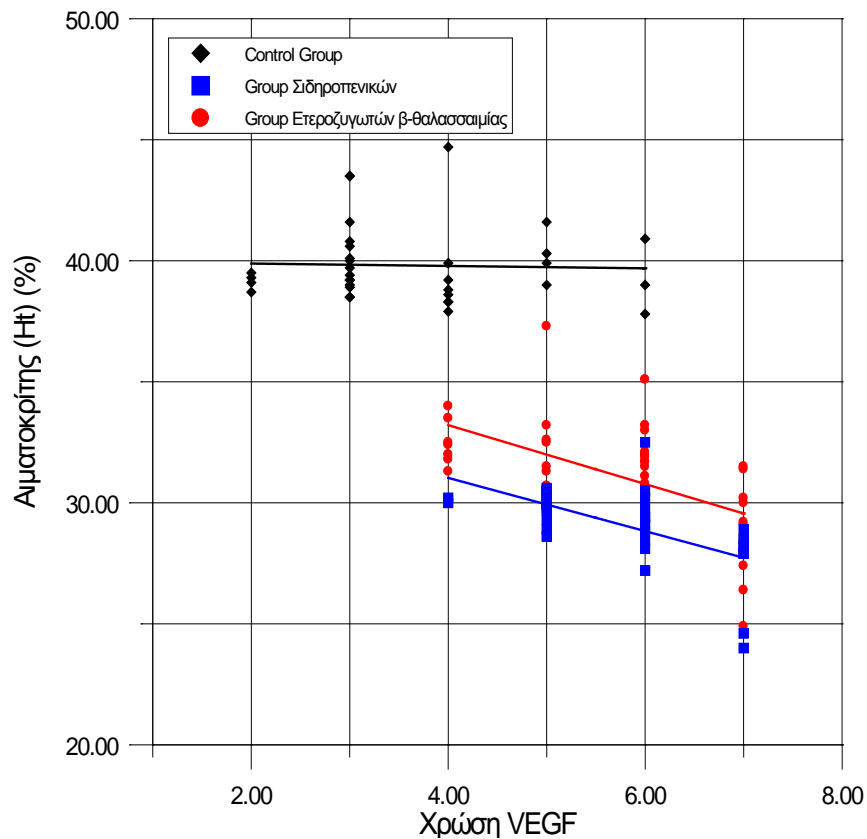


**Διάγραμμα 2β.** Μεταβολές του VEGF σε σχέση με τα επίπεδα φερριτίνης ορού στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Όπως προκύπτει από τη μελέτη του παρακάτω διαγράμματος, δεν διαπιστώνεται καμμία συσχέτιση ανάμεσα στις δύο αυτές παραμέτρους, γεγονός που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα της αναφερθείσας στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.



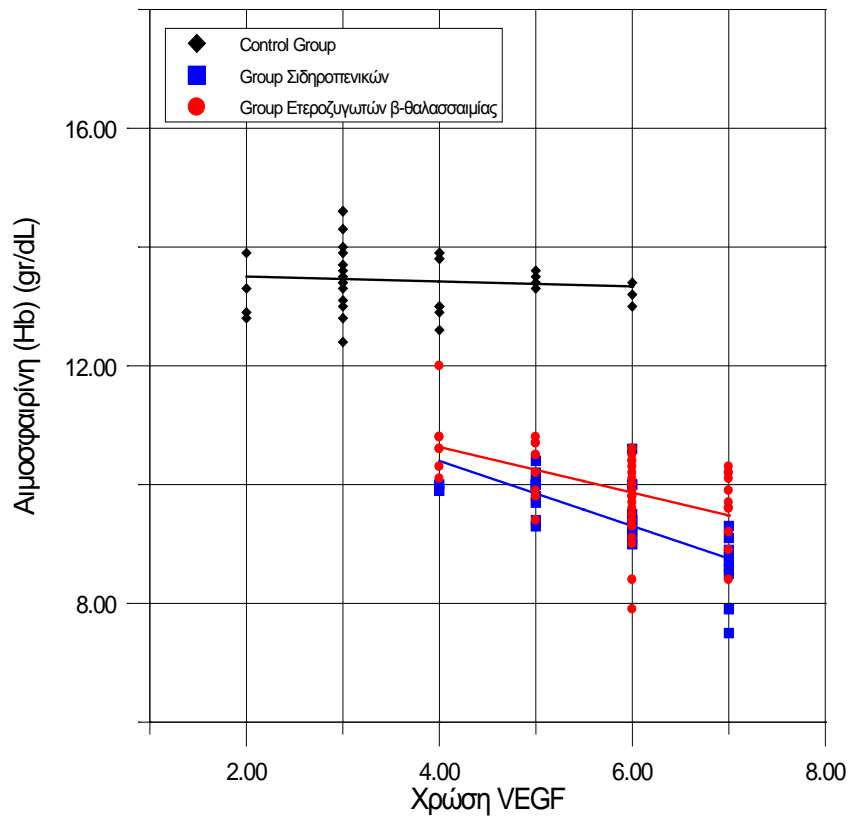
### Διάγραμμα 2γ.

Μεταβολή του VEGF σε σχέση με τον αιματοκρίτη στις 3 ομάδες της μελέτης.



### Διάγραμμα 2δ.

Μεταβολή του VEGF σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη στις 3 ομάδες της μελέτης.



Στα Διαγράμματα 2γ και 2δ, παρουσιάζονται οι μεταβολές του VEGF σε σχέση με τον αιματοκρίτη και την αιμοσφαιρίνη στην ομάδα ελέγχου, την ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και την ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας. Και στα δύο διαγράμματα είναι προφανής η συσχέτιση ανάμεσα στις δύο παραμέτρους (VEGF και Ht) και (VEGF και Hb), η οποία έρχεται σε συμφωνία με τα αναφερθέντα στατιστικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 2γ διαπιστώνεται ότι στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών δεν παρατηρείται ασθενής χρώση για τον VEGF, ενώ στην πλειοψηφία των δειγμάτων η βαθμολόγηση της έντασης της χρώσης είναι  $\geq 5$ . Το πιο σημαντικό όμως συμπέρασμα είναι ότι όσο πιο χαμηλές είναι οι τιμές του αιματοκρίτη τόσο πιο έντονη είναι η χρώση για τον παράγοντα VEGF. Στην ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας, παρατηρείται επίσης μέτρια και ισχυρή χρώση για το VEGF με την πλειονότητα των δειγμάτων να βαθμολογείται με 5 και 6 ως προς την ένταση της χρώσης. Επίσης και εδώ εξάγεται το ίδιο συμπέρασμα με παραπάνω καθώς και στην ομάδα αυτή οι χαμηλότερες τιμές του αιματοκρίτη συνοδεύονται από εντονότερη χρώση για τον παραγοντα VEGF. Στο διάγραμμα 2δ, είναι προφανής η αντιστοιχία των αποτελεσμάτων με το διάγραμμα 2γ και επιβεβαιώνεται η συσχέτιση των τιμών της αιμοσφαιρίνης με την ένταση της χρώσης του VEGF και στις 3 ομάδες που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.3.: Συσχέτιση του HIF-1α με όλες τις υπολοιπες μεταβλητές**

Μεταβλητές	Ασθενής χρώση (A)	Μέτρια χρώση (B)	Ισχυρή χρώση (C)	p-value	Post Hoc
	μέση τιμή, (SD)	μέση τιμή, (SD)	μέση τιμή, (SD)		
Ηλικία (έτη)	28.6 (4.97)	27.4 (5.2)	28.1 (5.2)	0.636	
Ηλικία κύησης (εβδομάδες)	39.4 (1.27)	39.1 (1.14)	38.8 (1.15)	0.107	
Βάρος Γέννησης (gr)	3380.4 (408.8)	3278.5 (337.25)	3287.2 (561.6)	0.633	
Βάρος Πλακούντα (gr)	585.9 (115.0)	598.7 (111.7)	586.8 (134.6)	0.87	
Αιματοκρίτης (%)	37.4 (4.71)	33.2 (3.8)	30.45 (3.4)	<b>0.00</b>	A > B,C
Αιμοσφαιρίνη (gr/dl)	12.5 (1.66)	10.9 (1.51)	9.78 (1.30)	<b>0.00</b>	A > B,C
MCV (%)	85.2 (9.5)	77.3 (9.67)	70.94 (8.6)	<b>0.00</b>	A > B,C
Σίδηρος Ορού (mg/dL)	74.6 (37.28)	82.5 (59.00)	65.8 (46.77)	0.255	
Φερριτίνη Ορού (ng/dL)	35.9 (26.6)	38.2 (44.4)	27.0 (27.4)	0.232	
Τρανσφερίνη (TRF) (mg/dL)	272.6 (76.07)	319.2 (79.36)	369.45 (107.7)	<b>0.00</b>	C > A,B
Υποδοχείς Τρανσφερίνης (r-TRF) (mg/dL)	1.59 (0.68)	2.10 (1.08)	2.47 (1.24)	<b>0.04</b>	C > A,B
APGAR 1'	8.18 (0.78)	7.78 (1.20)	7.85 (0.78)	0.207	
APGAR 5'	9.07 (0.82)	8.82 (0.83)	8.80 (0.93)	0.403	
<b>PIGF</b>	<b>5.70</b> <b>(0.46)</b>	<b>4.95</b> <b>(0.58)</b>	<b>4.19</b> <b>(0.51)</b>	<b>0.00</b>	<b>A &gt; B,C</b>
<b>VEGF</b>	<b>3.85</b> <b>(1.13)</b>	<b>4.82</b> <b>(0.89)</b>	<b>6.03</b> <b>(1.36)</b>	<b>0.00</b>	<b>C &gt; A,B</b>

Από τη μελέτη του Πίνακα 5.3, διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε στατιστικώς

σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων χρώσης του παράγοντα HIF-1α, ως προς την ηλικία της μητέρας, το βάρος γέννησης του νεογνού, το βάρος γέννησης



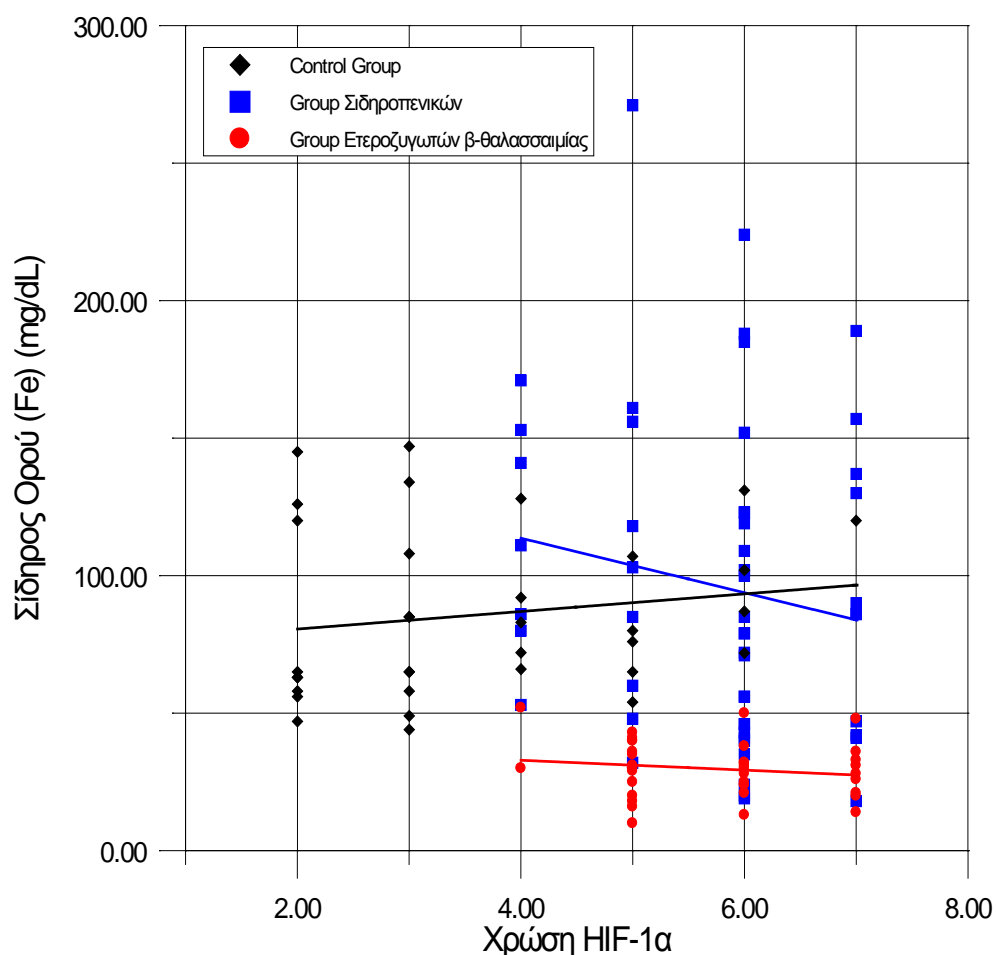
του πλακούντα, τα επίπεδα σιδήρου και φερριτίνης στον ορρό και το APGAR Score στο 1' και 5' λεπτό ζωής. Επιπλέον, φαίνεται ότι η ομάδα των πλακούντων στους οποίους ο HIF-1α είχε έντονη χρώση, προέρχονταν από γυναίκες με στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης και MCV και στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τρανσφερίνης και υποδοχέων τρανσφερίνης ( $p < 0,05$ ).

Ασθενής χρώση του HIF-1α παρατηρήθηκε στην ομάδα των πλακούντων στους οποίους ο PlGF παρουσίαζε έντονη χρώση και αντίστροφα. Αντιθέτως, η έντονη χρώση του HIF-1α συνδυαζόταν με έντονη χρώση για τον παράγοντα VEGF. Και τα δύο παραπάνω ευρήματα ήταν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ).

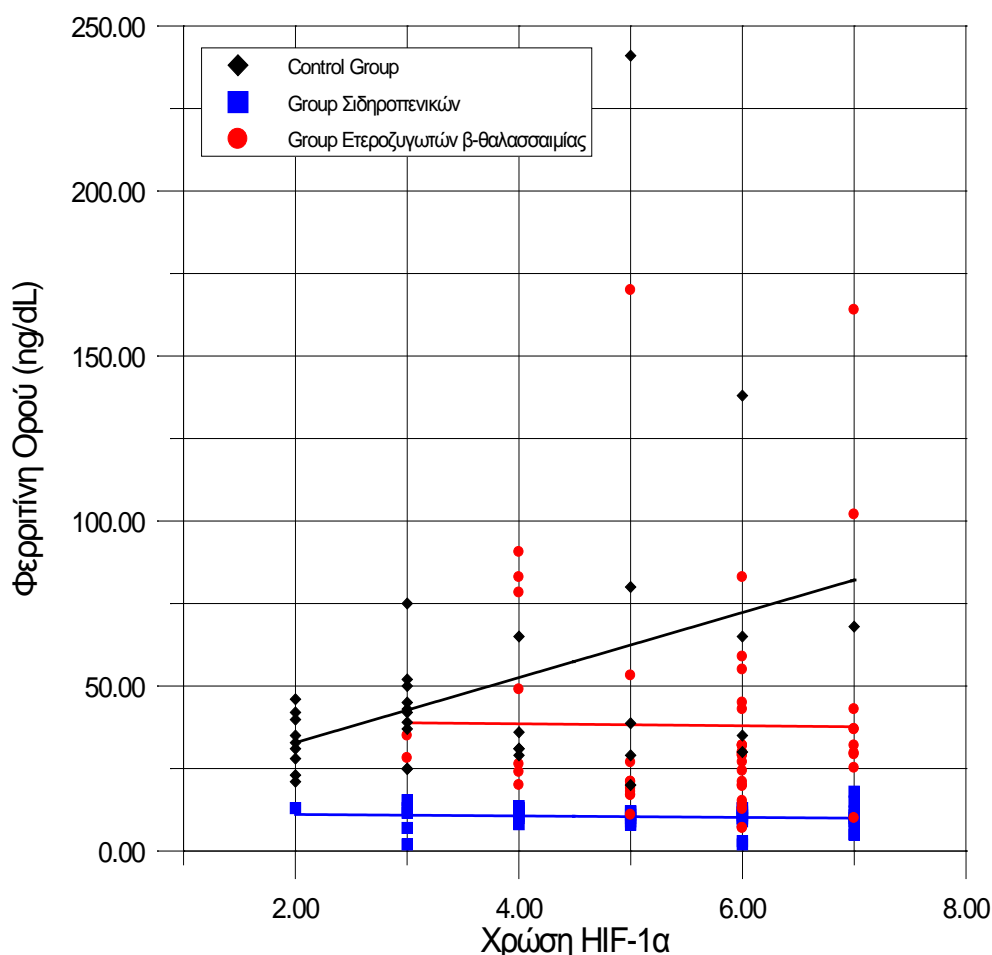
### **Διαγράμματα (3)**

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι μεταβολές του HIF-1α σε σχέση με τα επίπεδα σιδήρου και φερριτίνης στον ορρό και τις τιμές του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης της μητέρας.

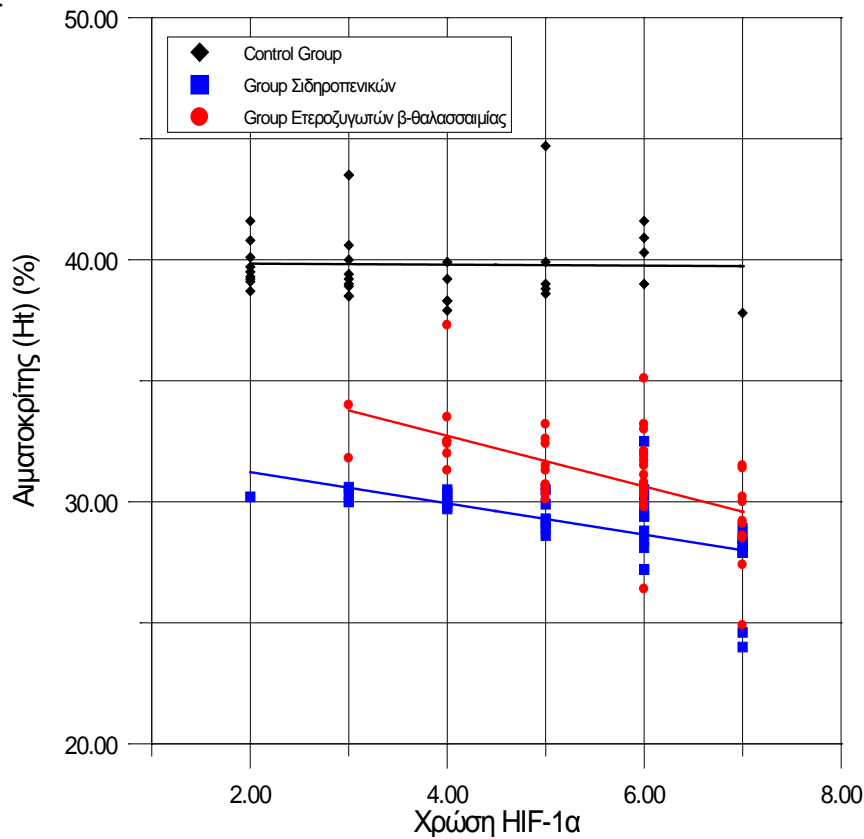
**Διάγραμμα 3α.** Μεταβολές του HIF-1α σε σχέση με τα επίπεδα σιδήρου του ορού στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Όπως προκύπτει από τη μελέτη του παρακάτω πίνακα, δεν διαπιστώνεται καμμία συσχέτιση ανάμεσα στις δύο αυτές παραμέτρους, γεγονός που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.



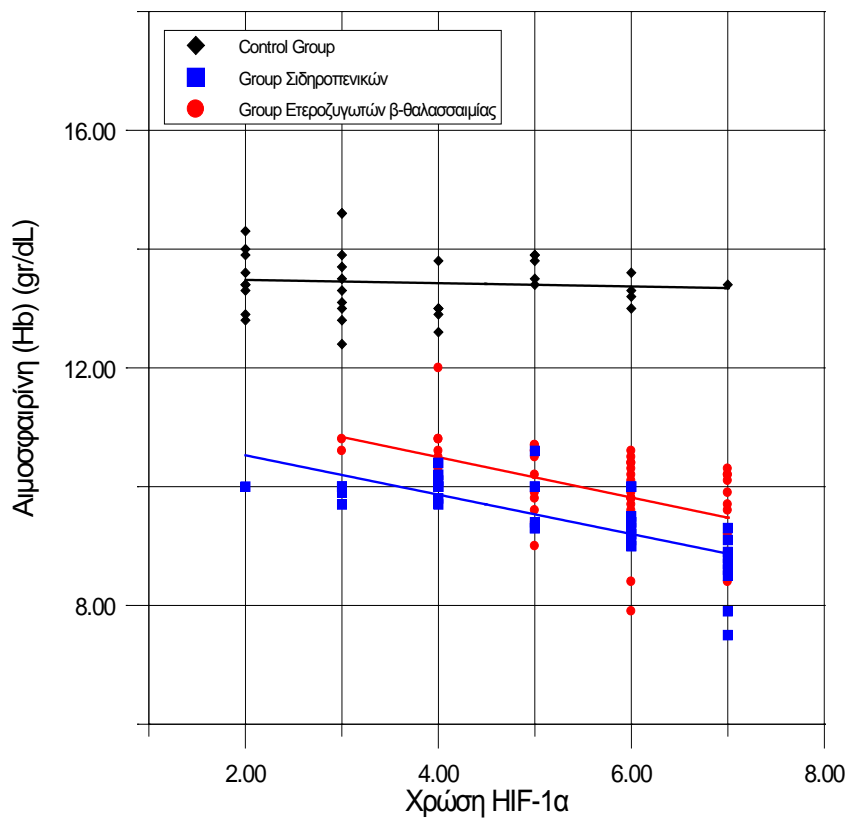
**Διάγραμμα 3β.** Μεταβολές του HIF-1α σε σχέση με τα επίπεδα φερριτίνης ορού στην ομάδα ελέγχου, στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Όπως προκύπτει από τη μελέτη του παρακάτω διαγράμματος, δεν διαπιστώνεται καμμία συσχέτιση ανάμεσα στις δύο αυτές παραμέτρους, γεγονός που έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.



**Διάγραμμα 3γ.** Μεταβολή του HIF-1α σε σχέση με τον αιματοκρίτη στις 3 ομάδες της μελέτης.



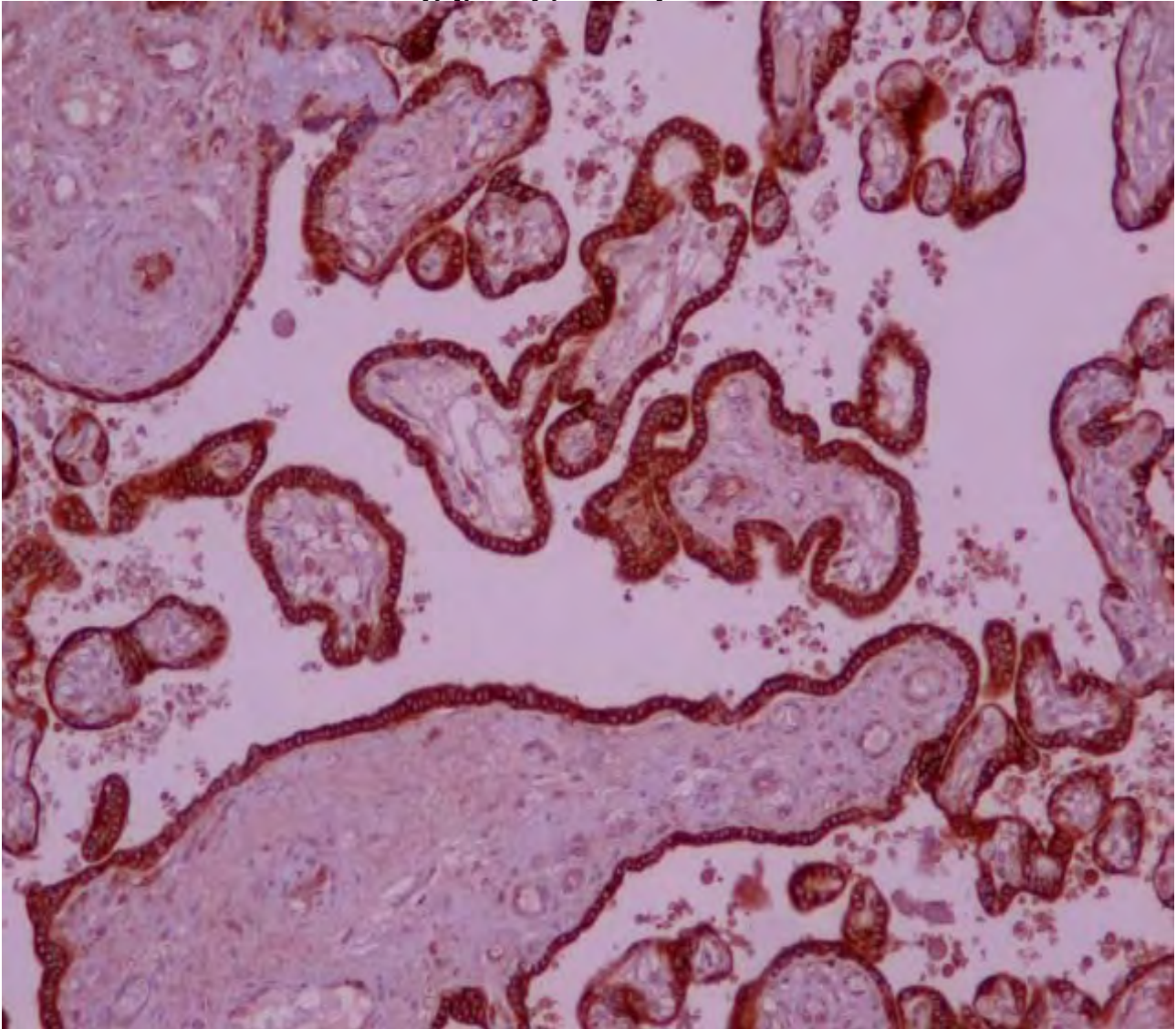
**Διάγραμμα 3δ.** Μεταβολή του HIF-1α σε σχέση με την αιμοσφαιρίνη στις 3 ομάδες της μελέτης.



Στα Διαγράμματα 3γ και 3δ παρουσιάζονται οι μεταβολές του HIF-1α σε σχέση με τον αιματοκρίτη και την αιμοσφαιρίνη στην ομάδα ελέγχου, την ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και την ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας. Και στα δύο διαγράμματα είναι προφανής η συσχέτιση ανάμεσα στις δύο παραμέτρους (HIF-1α- Ht) και (HIF-1α-Hb) , η οποία έρχεται σε συμφωνία με τα στατιστικά αποτελέσματα .Πιο αναλυτικά, στο Διάγραμμα 2γ διαπιστώνεται ότι στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών παρατηρείται ασθενής χρώση για τον HIF-1α σε ελάχιστες περιπτώσεις, ενώ στην πλειοψηφία των δειγμάτων η βαθμολόγηση της έντασης της χρώσης είναι  $\geq 4$ . Το πιο σημαντικό όμως συμπέρασμα είναι ότι όσο πιο χαμηλές είναι οι τιμές του αιματοκρίτη τόσο πιο έντονη είναι η χρώση για τον παράγοντα HIF-1α. Στην ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας παρατηρείται επίσης μέτρια και ισχυρή χρώση για το HIF-1α με την πλειονότητα των δειγμάτων να βαθμολογείται με 4 και 7 ως προς την ένταση της χρώσης. Επίσης, και εδώ εξάγεται το ίδιο συμπέρασμα με παραπάνω, καθώς και στην ομάδα αυτή οι χαμηλότερες τιμές του αιματοκρίτη συνοδεύονται από εντονότερη χρώση για τον παραγοντα HIF-1α. Στο διάγραμμα 2δ, είναι προφανής η αντιστοιχία των αποτελεσμάτων με το διάγραμμα 2γ ως προς την κατανομή των τιμών του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης. Επίσης, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση των τιμών της αιμοσφαιρίνης με την ένταση της χρώσης του HIF-1α και στις 3 ομάδες του συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ VI ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΕΣ

### **A. Ανοσοϊστοχημική μελέτη του VEGF**

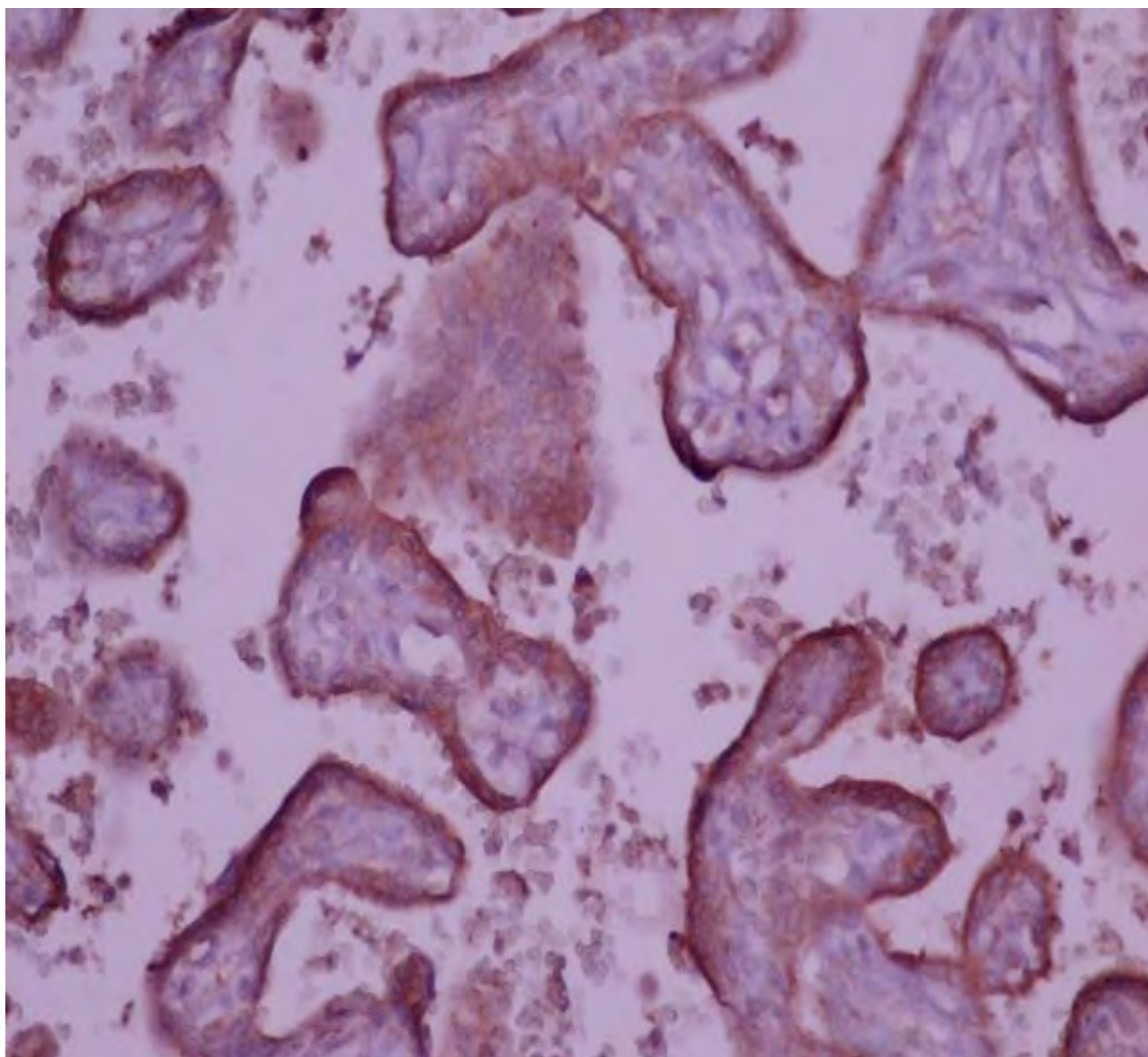


#### **Εικόνα Α.1. Ισχυρή χρώση του VEGF**

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του VEGF σε κυτταροτροφοβλάστη από πλακούντα γυναίκας με σιδηροπενική αναιμία. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος VEGF PHARMIGEN (αρχική μεγέθυνση X 400). Παρατηρείται ισχυρή ανοσοθετική κυτταροπλασματική χρώση του VEGF, η οποία παρατηρείται σε όλη την έκταση του πλακιδίου (> 80%)





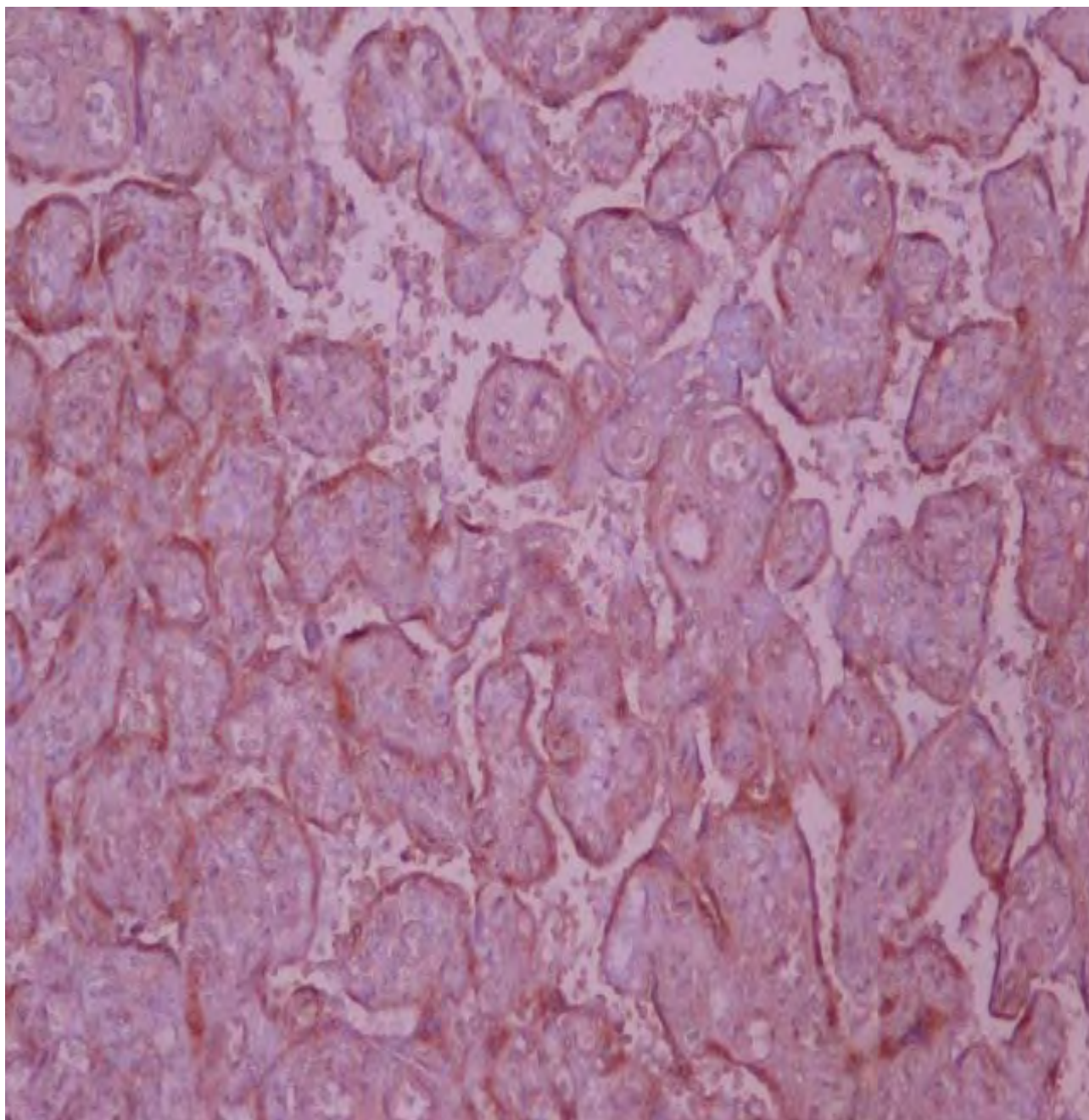


### **Εικόνα Α.2. Μετρίου βαθμού χρώση του VEGF**

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του VEGF σε κυτταροτροφοβλάστη από πλακούντα γυναίκας με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος VEGF PHARMIGEN (αρχική μεγέθυνση X 400). Παρατηρείται μέτρια κυτταροπλασματική χρώση του VEGF, η οποία παρατηρείται περίπου στο 50% του πλακιδίου.





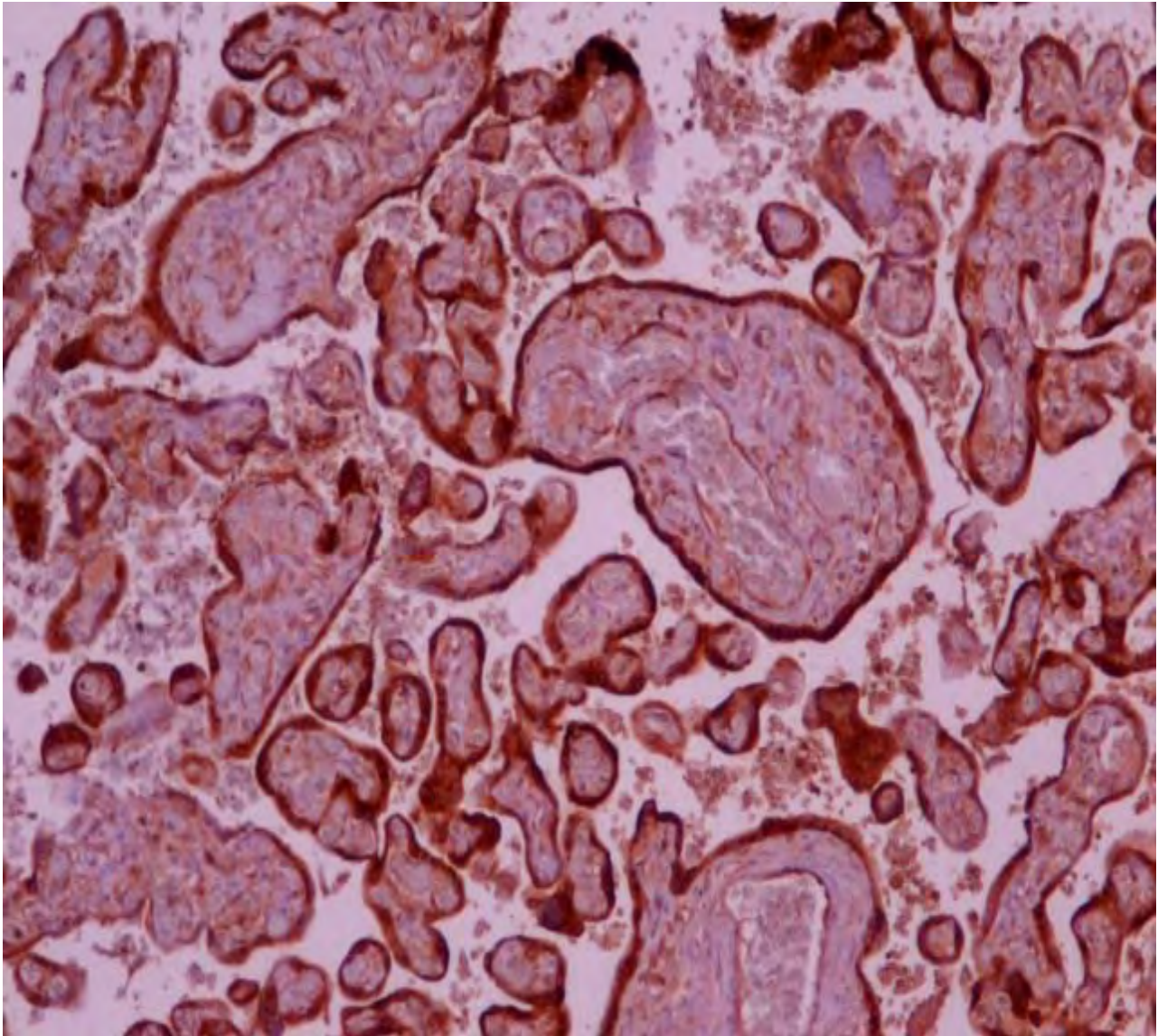


### **Εικόνα Α.3 . Ασθενής χρώση του VEGF**

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του VEGF σε κυτταροτροφοβλάστη από φυσιολογικό πλακούντα. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος VEGF PHARMIGEN (αρχική μεγέθυνση X 400). Παρατηρείται ασθενής κυτταροπλασματική χρώση του VEGF, η οποία παρατηρείται περίπου στο 40% του πλακιδίου.



## **B. Ανοσοϊστοχημική μελέτη του HIF-1α**

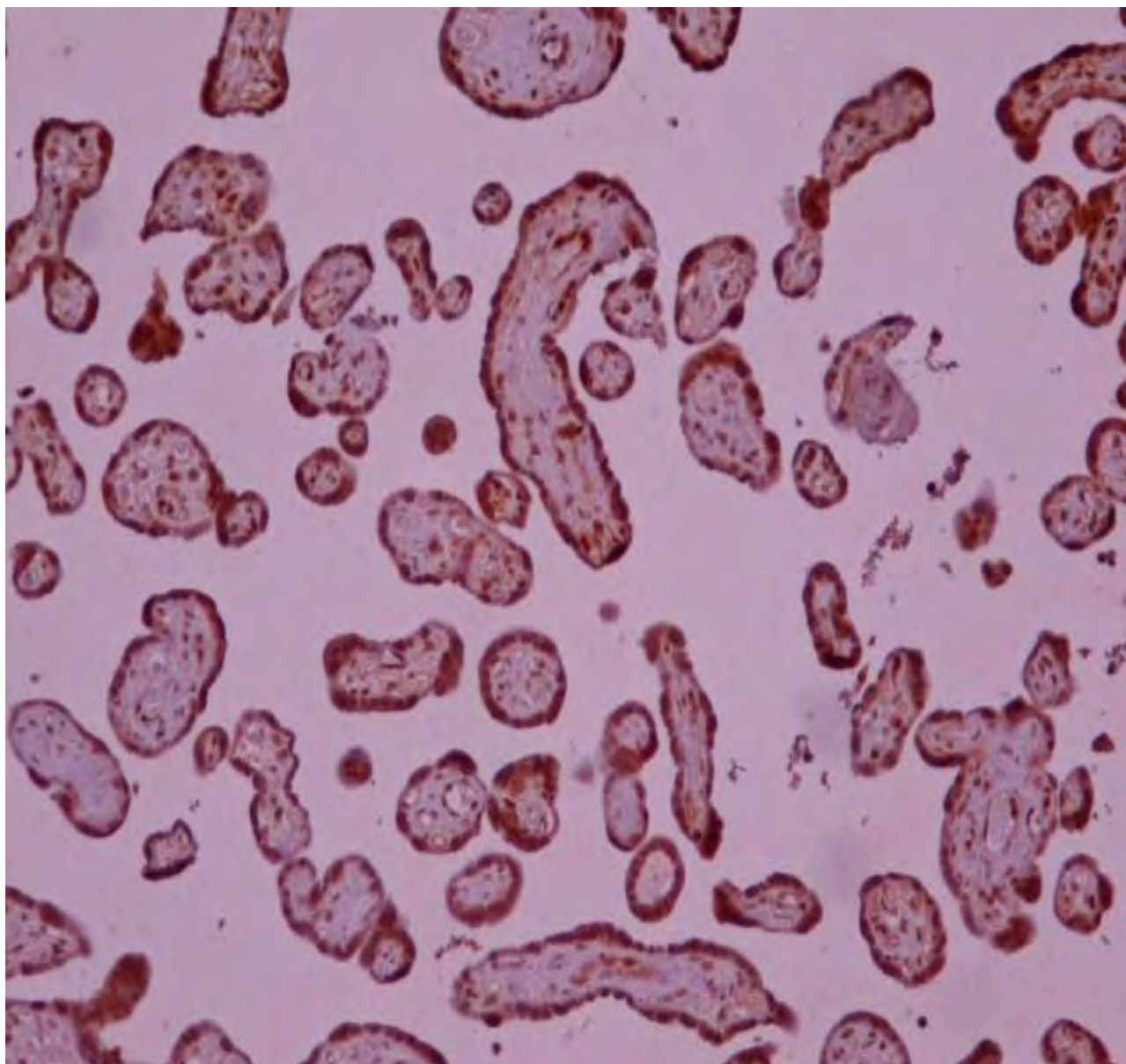


### **Εικόνα Β.1. Ισχυρή χρώση του HIF-1α.**

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του HIF-1α σε κυτταροτροφοβλάστη από πλακούντα γυναίκας με σιδηροπενική αναιμία. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος HIF 1α SANTA CRUZ (αρχική μεγέθυνση X 400). Παρατηρείται ισχυρή πυρηνική χρώση του HIF-1α , η οποία παρατηρείται σε όλη την έκταση του πλακιδίου (> 80% ).



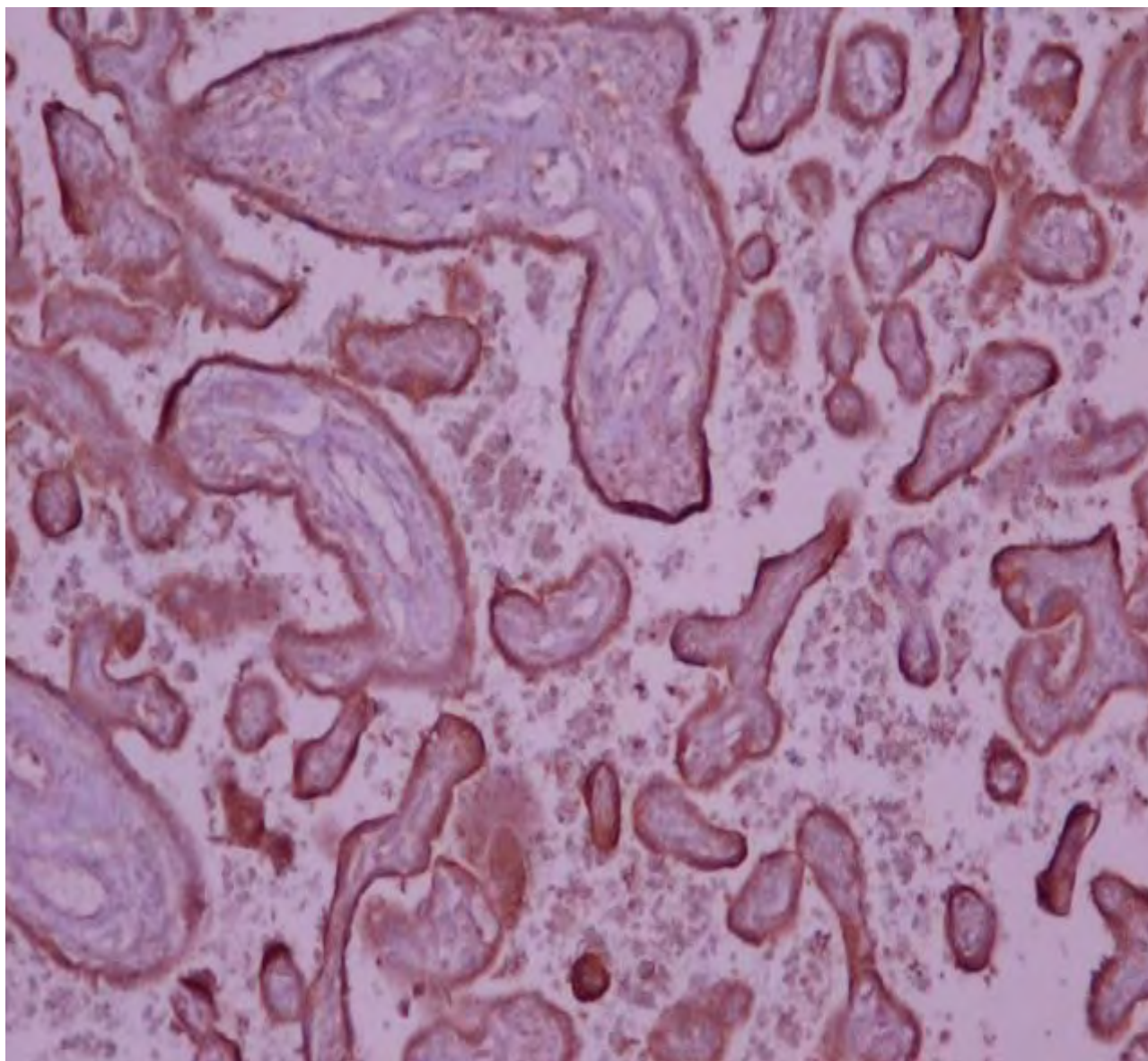




### **Εικόνα Β.2. Μετρίου βαθμού χρώση του HIF-1α.**

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του HIF-1α σε κυτταροτροφοβλάστη από πλακούντα γυναίκας με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος HIF-1α SANTA CRUZ (αρχική μεγέθυνση X 400). Παρατηρείται ισχυρή πυρηνική χρώση του HIF-1α, η οποία παρατηρείται στο 50% της έκτασης του πλακιδίου .





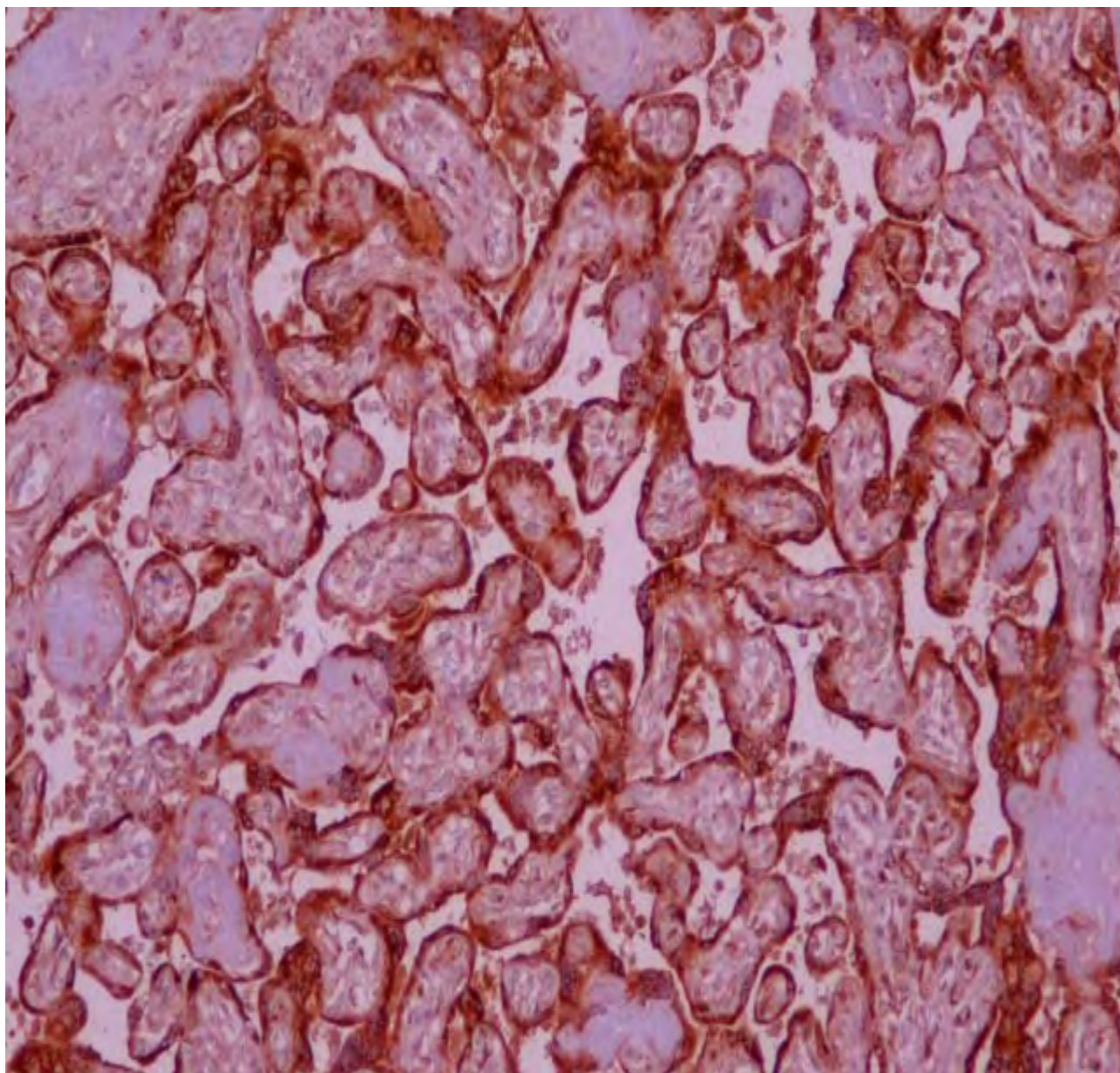
**Εικόνα Β.3. Ασθενής χρώση του HIF-1α.**

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του HIF-1α σε κυτταροτροφοβλάστη από φυσιολογικό πλακούντα. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος HIF-1α SANTA CRUZ (αρχική μεγέθυνση X 400). Παρατηρείται ασθενής πυρηνική χρώση του HIF-1α, η οποία παρατηρείται στο 30% της έκτασης του πλακιδίου.





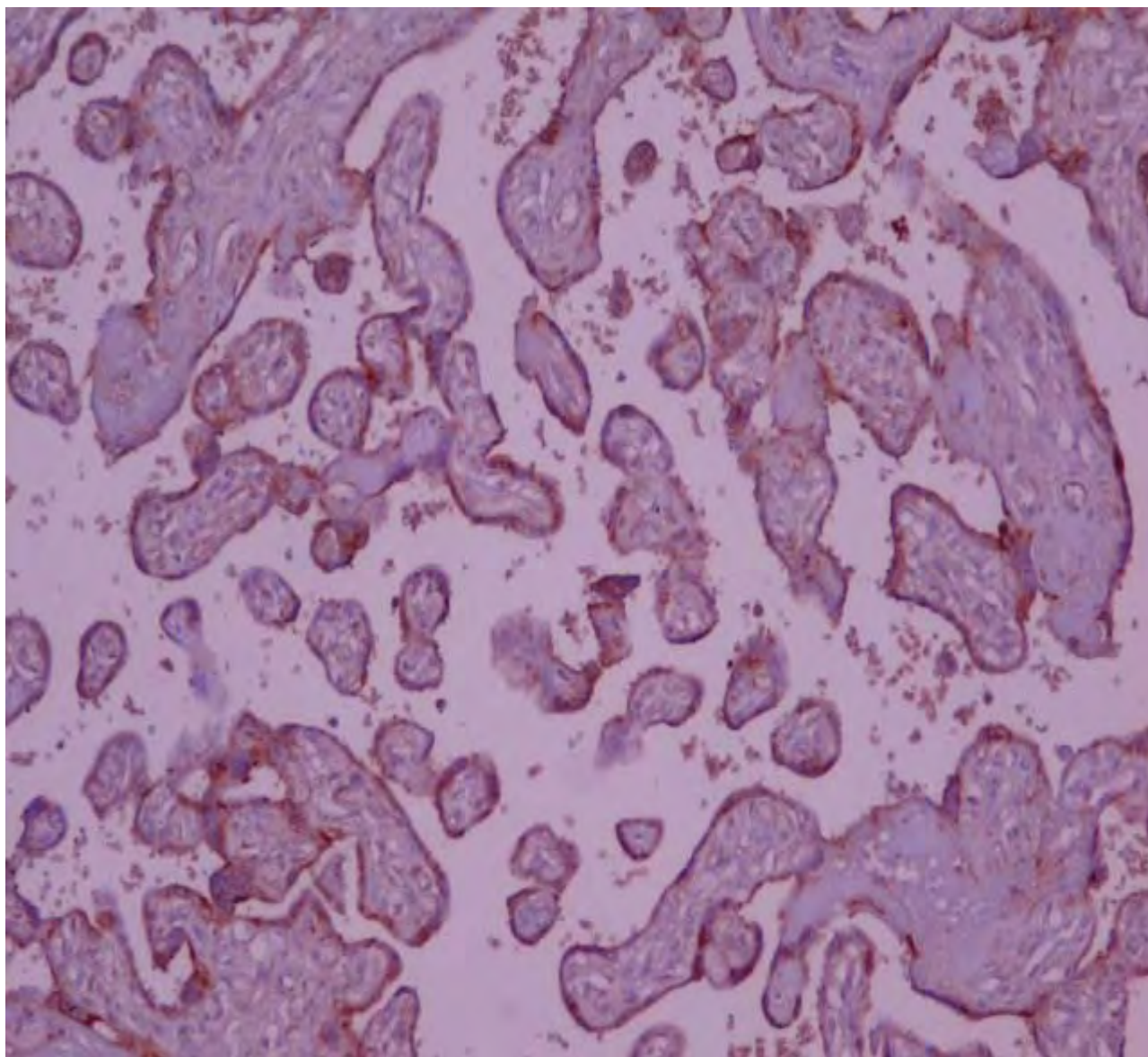
## Γ. Ανοσοϊστοχημική μελέτη του PlGF



### Εικόνα Γ.1. Ισχυρή χρώση του PlGF

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του PlGF σε κυτταροτροφοβλάστη από φυσιολογικό πλακούντα. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος PlGF SANTA CRUZ (αρχική μεγέθυνση X 400). Παρατηρείται ισχυρή ανοσοθετική κυτταροπλασματική χρώση του PlGF, η οποία παρατηρείται σε όλη την έκταση του πλακιδίου.





### **Εικόνα Γ.2. Ασθενής χρώση του PIGF**

Ανοσοϊστοχημική μελέτη του PIGF σε κυτταροτροφοβλάστη από πλακούντα γυναίκας με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος PIGF SANTA CRUZ (αρχική μεγέθυνση X 400).

Παρατηρείται ασθενής κυτταροπλασματική χρώση του PIGF, η οποία παρατηρείται στο 60% της συνολικής έκτασης του πλακιδίου .



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο πλακούντας και το αγγειακό του δίκτυο αποτελούν τον ιδανικό ιστό για τη μελέτη της αγγειογένεσης, της de novo δηλαδή δημιουργίας αγγείων και των διακλαδώσεών τους. Η διαδικασία αυτή ξεκινά ήδη από το τέλος της τρίτης εβδομάδας και εξελίσσεται διαρκώς μέχρι και το τέλος της κύησης με τη συνεισφορά μιας μεγάλης ομάδας αυξητικών αγγειακών παραγόντων, μεταξύ των οποίων η ομάδα των VEGF και των PlGF μαζί με τους υποδοχείς τους παίζουν ρυθμιστικό ρόλο.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η μελέτη των διαφορών που τυχόν προκύπτουν στην έκφραση των VEGF, PlGF και HIF-1α σε πλακούντες γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και σιδηροπενική αναιμία, καταστάσεις ως γνωστόν υποξικές. Το πρώτο συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι και στην περίπτωση της σιδηροπενικής αναιμίας όπως και στην περίπτωση της ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας διαπιστώθηκε σημαντική απόκλιση των ευρημάτων από τα φυσιολογικά. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των VEGF και HIF-1α ήταν αυξημένη στις δύο παραπάνω ομάδες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, όπου διαπιστώθηκε ασθενής έκφραση των VEGF και HIF-1α. Αντίθετα, η έκφραση του PlGF ήταν σημαντικά ελαττωμένη στις ομάδες των σιδηροπενικών και των ετεροζυγωτών και αυξημένη στην ομάδα ελέγχου, των φυσιολογικών δηλαδή πλακούντων. Παρατηρήθηκε συνεπώς λόγω των συνθηκών υποξίας, μια αναστροφή της ποσοτικής σχέσης προς όφελος των VEGF και HIF-1α και σε βάρος του PlGF. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται αυτή η δράση, είναι μέσω των υποδοχέων του VEGF, VEGFR-1 και 2. Η μεταγραφή



του VEGFR-1 ενισχύεται από την υποξία, ενώ η παραγωγή του VEGFR-2 αυξάνεται επίσης σε συνθήκες υποξίας, ωστόσο ο μηχανισμός που την προκαλεί φαίνεται ότι δρα μετά τη μεταγραφή. Ο PlGF φαίνεται ότι συνδέεται μόνο με τον VEGFR-1, απομακρύνοντάς τον από τον VEGF και σχηματίζοντας μαζί του ετεροδιμερή τα οποία μπορούν να ενεργοποιήσουν τον VEGFR-2, ενισχύοντας έτσι την αγγειογενετική δράση του VEGF ( Zhao et al., 2004). Επιπλέον, η όλη διαδικασία υποβοηθείται σημαντικά από τον HIF-1α (Seligman et al., 1997), ο οποίος σε συνθήκες υποξίας συνδέεται με την υποομάδα HIF-1β, σχηματίζοντας έτσι ένα διμερές, το οποίο ενεργοποιεί τον παράγοντα-σύμπλεγμα HIF-1. Αυτός στη συνέχεια μπορεί να προσδεθεί στο cis-τμήμα του ενεργοποιητή ενός οξυγό-εξαρτώμενου γονιδίου, διεγείροντας τη μεταγραφή του (Wang et al., 1985). Με τον τρόπο αυτό ο HIF-1 έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει την έκφραση πάνω από 60 γονιδίων σε ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων (Semenza, 2000), μεταξύ αυτών και του VEGF, κατευθύνοντας τη μετανάστευση ώριμων ενδοθηλιακών κυττάρων προς ένα υποξικό περιβάλλον (Gebacef et al., 1997; Carmeliet et al., 1998). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συνεισφέρουν στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων εξασφαλίζοντας έτσι στην υποξική περιοχή επαρκή ποσότητα οξυγονωμένου αίματος ( Dery et al., 2004; Hewitson et al., 2004; Vaupel et al., 2004).

Εξίσου ενδιαφέρον ήταν και το ερώτημα, που προέκυψε σχετικά με το αν η έλλειψη σιδήρου, η οποία παρατηρείται στην περίπτωση της σιδηροπενικής αναιμίας, αποτελεί τη γενεσιουργό αιτία της υποξίας μέσω της ενεργοποίησης του HIF-1α και ακολούθως του VEGF. Η συμμετοχή στη μελέτη των γυναικών με ετερόζυγη β-

θαλασσαιμία μπόρεσε να βοηθήσει σημαντικά καθότι όπως είναι γνωστό, στην ετερόζυγη β-θαλασσαιμία υπάρχει αναιμία χωρίς απαραίτητα σιδηροπενία.

Όλες οι μέχρι τώρα μελέτες αφορούσαν αποκλειστικά σιδηροπενικές μητέρες, οπότε δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί εάν η αυξημένη έκφραση του VEGF (μέσω του HIF-1α) μπορεί να αποδοθεί στην αναιμία αυτή καθαυτή ή στη σιδηροπενία.

Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι τελικώς η ποσοτική έκφραση των VEGF, PlGF και HIF-1α είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα σιδήρου στον ορρό της μητέρας, οπότε και η σιδηροπενία δεν μπορεί να αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα και δεν υποστηρίζεται η υπόθεση ότι τα επίπεδα σιδήρου μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση του HIF-1α και κατ'επέκταση ολόκληρης της αγγειογενετικής διαδικασίας.

Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, προκύπτει η διαπίστωση ότι η ποσοτική έκφραση των VEGF, PlGF και HIF-1α εξαρτάται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τα επίπεδα του αιματοκρίτη, της αιμοσφαιρίνης, του MCV, της τρανσφερρίνης αλλά και των υποδοχέων αυτής. Το εύρημα αυτό έρχεται να δώσει απάντηση σε ένα άλλο ερώτημα που έθεσαν σε μια μελέτη τη τους το 2004 οι Mayhew et al., σχετικά με το αν το υποξικό stress στην αναιμία οφείλεται μόνο στην πτώση της μερικής τάσεως του οξυγόνου στους μεσολάχνιους χώρους ή και στις ελαττωμένες τιμές της αιμοσφαιρίνης. Η εξάρτηση της έκφρασης των αγγειογενετικών παραγόντων από άλλες παραμέτρους πλην του σιδήρου επιβεβαιώνει τη σημασία τους για τη σωστή διάγνωση της σιδηροπενικής αναιμίας.

Το βάρος του πλακούντα ήταν μεγαλύτερο στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό, δεν συνέβαινε όμως το ίδιο και με το βάρος



γέννησης, το οποίο δεν παρουσίαζε διαφορά σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά στο εύρημα του αυξημένου βάρους των πλακούντα στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών, υπάρχει συμφωνία με παλαιότερη μελέτη των Huang et al.,(2001), οι οποίοι ύστερα από την εξέταση 26 πλακούντων προερχόμενων από ισάριθμες τελειόμηνες κύησεις, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο όγκος και το βάρος του πλακούντα ήταν αυξημένο στην ομάδα της αναιμίας (αιμοσφαιρίνη  $< 10\text{g/dl}$ ) σε σχέση με τις ομάδες με τιμές αιμοσφαιρίνης  $>10\text{g/dl}$ . Επίσης, ο απόλυτος όγκος των μεσολάχιων χώρων ή των χοριακών λαχνών ανά πλακούντα ήταν σημαντικά αυξημένος στην ομάδα της αναιμίας. Υπήρχε επίσης ισχυρή αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα αιμοσφαιρίνης της μητέρας και τον απόλυτο όγκο ή το εμβαδόν της επιφάνειας των μεσολάχιων χώρων ή των λαχνών. Τελικώς, διατυπώθηκε το συμπέρασμα ότι η πλακουντιακή υπερτροφία που παρατηρείται σε πλακούντες προερχόμενους από γυναίκες με μέτρια ή και ήπια σιδηροπενική αναιμία και συνοδεύεται από διόγκωση του πλακούντα μπορεί να αποδοθεί σε έναν ομοιόμορφο, φυσιολογικό, αντιρροπιστικό μηχανισμό, ο οποίος επιδιώκει να εξασφαλίσει επαρκή παροχή οξυγόνου στο έμβρυο.

Σε παρόμοια και εξίσου ενδιαφέροντα αποτελέσματα κατέληξε και μια μελέτη των Pietro et al. (2010), οι οποίοι ξεκινώντας από τη διαπίστωση ότι η ήπια υπεργλυκαιμία κατά την κύηση συνοδεύεται από αυξημένο κίνδυνο μακροσωμίας και περιγεννητικής θνησιμότητας, μελέτησαν τους πλακούντες, που προέρχονταν από τέτοιες κύησεις και διαπίστωσαν αύξηση του αριθμού των τελικών λαχνών και των αγγείων τους πιθανώς μέσα στα πλαίσια κάποιου μηχανισμού ομοιόστασης, ο οποίος

όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, εξασφαλίζει την ομαλή εμβρυομητρική επικοινωνία. Σε μια παλαιότερη εργασία από το 1995, οι Reshetnikova et al., σε υλικό που προερχόταν από 20 πλακούντες, 10 από τους οποίους ήταν φυσιολογικοί και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, ενώ οι υπόλοιποι 10 προέρχονταν από κύησεις με σιδηροπενική αναιμία. Τα χαρακτηριστικά των κύησεων αυτών, παρουσίαζαν πολύ σημαντικές ομοιότητες ως προς την ηλικία κύησης (38-40 εβδομάδες), τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης ( $<10 \text{ g/dl}$ ) καθώς και τα επίπεδα σιδήρου ( $< 50 \mu\text{g/dl}$ ) με το υλικό, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για την ομάδα των πλακούντων με σιδηροπενική αναιμία. Παρόλα αυτά εξήχθησαν αποτελέσματα, τα οποία έρχονται σε αντίθεση τόσο με τα ευρήματα των Huang et al. (2001), όσο και με τα δικά μας ευρήματα. Πιο συγκεκριμένα, το βάρος του πλακούντα ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν παρουσίαζε καμιά διαφορά, ενώ το πιο ενδιαφέρον εύρημα ήταν η σημαντική αύξηση, που παρατηρήθηκε στο συνολικό όγκο των διαμέσων και τελικών λαχνών. Το γεγονός αυτό είχε ως συνέπεια την αύξηση του ποσοστού των στελεχιαίων λαχνών μέσα στο συνολικό δίκτυο των λαχνών καθώς επίσης και της αύξησης των παθολογικών δομών, όπως έμφρακτα, θρόμβοι και απασβεστώσεις μέσα στις πλακουντιακές δομές. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι παρά το γεγονός ότι το βάρος του πλακούντα δεν παρουσίασε μεταβολές ανάμεσα στις δύο ομάδες, στην περίπτωση της αναιμίας δεν υπήρχε υπερτροφία και κατά συνέπεια αύξηση του πλακουντιακού βάρους, αλλά σημαντική ελάττωση του λαχνικού δικτύου, η οποία οφειλόταν κυρίως στην ελάττωση του πάχους της μεμβράνης των λαχνών. Η ελάττωση αυτή σχετιζόταν με την αύξηση του όγκου, που καταλάμβαναν τα

εμβρυικά αγγεία εντός των λαχνών. Με τον τρόπο αυτό, υποστηρίζουν οι ερευνητές, ο πλακούντας επιτυγχάνει τη διατήρηση της ικανότητας διάχυσης, προκειμένου να υποστηρίξει την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στο βάρος γέννησης των εμβρύων μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας με σιδηροπενική αναιμία. Το γεγονός αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με τα συμπεράσματα των δύο παραπάνω μελετών, που επίσης δεν καταγράφουν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ως προς το βάρος γέννησης ανάμεσα στις ομάδες, που απαρτίζουν το υλικό μελέτης τους. Και στις δύο περιπτώσεις, οι εξηγήσεις, που δίνονται, η αύξηση δηλαδή του βάρους του πλακούντα ή η βελτιστοποίηση του λαχνικού αγγειακού δικτύου παρέχουν ικανοποιητικές απαντήσεις για το φαινόμενο. Ωστόσο, σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, οι γυναίκες με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία γέννησαν σε μικρότερη ηλικία κύησης νεογνά με χαμηλότερο βάρος γέννησης σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα. Όσον αφορά στην ηλικία κύησης, η αξία του ευρήματος είναι αμφισβητήσιμη, δεδομένου ότι όλες οι κύσεις που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη ήταν τελειόμηνες. Όσο για το βάρος γέννησης, το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Tsatalas et al. (2009), οι οποίοι υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχουν διαφορές σε σχέση με το γενικό πληθυσμό ως προς το περιγεννητικό αποτέλεσμα. Επειδή η δική μας μελέτη δεν περιελάμβανε μορφομετρική εξέταση των πλακουντιακών παραμέτρων, θεωρείται αναγκαία η διεξαγωγή και άλλων μελετών με σχετικό αντικείμενο, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το ανωτέρω εύρημα και να διερευνηθεί η σημασία του.

Το Apgar Score κατά το 1' ήταν χαμηλότερο στην ομάδα ελέγχου (7.59) σε σχέση με την ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών (7.92) και την ομάδα των ετεροζυγωτών της β-θαλασσαιμίας (7.89). Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη μελέτη των Reshetnikova et al (1995)., οι οποίοι δεν διαπίστωσαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο Apgar Score ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα της σιδηροπενίας (8 και 7.9 αντίστοιχα). Αντίθετα, κατά το 5' το Apgar Score ήταν χαμηλότερο στην ομάδα της σιδηροπενικής αναιμίας (8.5 έναντι 8.98 στην ομάδα ελέγχου και 9.0 στην ομάδα των ετεροζυγωτών). Το εύρημα αυτό που ήταν επίσης στατιστικά σημαντικό, δεν έχει διαπιστωθεί σε προηγούμενες μελέτες και η κλινική του σημασία, εφόσον υπάρχει, μένει να επιβεβαιωθεί στο μέλλον.

Κατά την τελική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και κατά τη συσχέτιση της ποσοτικής σχέσης των τριών αγγειογενετικών παραγόντων με το περιγεννητικό αποτέλεσμα (βάρος γέννησης, βάρος πλακούντα, Apgar Score στο 1' και 5'), διαπιστώθηκε ότι δεν προκύπτει καμμία θετική ή αρνητική συσχέτιση, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι μεταβολές που παρατηρούνται σε μικροσκοπικό επίπεδο παρά τις επιδράσεις, που μπορεί να έχουν στην αγγειογένεση, δεν αντανακλούν απαραίτητα και στην έκβαση της κύησης.

Στο παρελθόν είχαν διεξαχθεί κάποιες μελέτες με παρόμοια συλλογιστική. Πρώτοι οι Wheeler et al.(1995), θέλησαν να μελετήσουν τις μεταβολές του VEGF σε τροφοβλαστικό ιστό, ο οποίος προερχόταν από 5 γυναίκες, οι οποίες είχαν υποβληθεί σε θεραπευτική διακοπή της κύησης κατά το πρώτο τρίμηνο. Οι ιστοί αυτοί καλλιεργήθηκαν στη συνέχεια υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες για 72 ώρες.

Έγινε εξαγωγή RNA από τα κύτταρα στις 24, 48 και 72 ώρες και από τις 24 ώρες η μέση πίεση του O<sub>2</sub> ήταν σημαντικά χαμηλότερη (10 kPa) στις αναερόβιες καλλιέργειες απ' ό,τι στις αερόβιες (22 kPa). Με τη βοήθεια RT-PCR διαπιστώθηκε ότι τα ισχυρότερα μηνύματα για τον VEGF προερχόταν από τις αναερόβιες καλλιέργειες, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με την επανάληψη της μεθόδου. Η αναλογία των προϊόντων VEGF σε σχέση με τις τιμές αναφοράς αύξανε με το χρόνο επώασης και το μέγεθος της υποξίας.

Σε μια μελέτη που ακολούθησε την παραπάνω, οι Shore et al. (1997), χρησιμοποίησαν τμήματα πλακούντα προερχόμενα από 30 φυσιολογικές, τελειόμηνες κυήσεις. Σκοπός της ήταν να μελετήσει αρχικά την έκφραση των VEGF, PlGF και των υποδοχέων τους στην κυτταροτροφοβλάστη και ακολούθως σε καλλιέργειες υπό συνθήκες υποξίας. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 24 ώρες σε υποξικό περιβάλλον (<2% O<sub>2</sub>), ενώ στην ομάδα ελέγχου σε 21% O<sub>2</sub> για τον ίδιο χρόνο. Το RNA αφαιρέθηκε και στη συνέχεια αξιολογήθηκε ο VEGF με δοκιμασία ριβονουκλεάσης (RPA) και με Northern Blot ο PlGF. Όπως προέκυψε λοιπόν, η RPA έδειξε σημαντική αύξηση του VEGF mRNA μετά από 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας, ενώ η Northern Blot έδειξε ότι η έκφραση του PlGF στα ίδια δείγματα σημείωσε σημαντική ελάττωση. Οι ως άνω ερευνητές εξήγαν το συμπέρασμα ότι οι VEGF/PlGF, προερχόμενοι από τον πλακούντα μπορούν να παρουσιάσουν παρακρινή δράση, προκειμένου να ρυθμίσουν την εκτεταμένη αγγειογένεση, τη διαμόρφωση των αγγείων και την αγγειακή διαπερατότητα κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης και εγείρουν την πιθανότητα ότι οι ίδιοι παράγοντες μπορούν μέσω

αυτοκκρινών μηχανισμών να επιδρούν στην τροφοβλαστική λειτουργία κατά την περίοδο της κύησης. Επίσης, η ικανότητα της υποξίας να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των VEGF και PlGF υποδηλώνει ότι οι επιπλοκές της κύησης, που σχετίζονται με αλλαγές της τάσης του  $O_2$  κατά την επικοινωνία μητέρας-εμβρύου, όπως στην προεκλαμψία, μπορεί να οδηγήσει σε αποκλίσεις στις τιμές των παραπάνω αυξητικών παραγόντων.

Οι Khaliq et al. (1996), μελέτησαν με τη μέθοδο Western Blot την έκφραση των VEGF, PlGF και των υποδοχέων τους σε πλακούντες από IUGR και προεκλαμψία καθώς και σε *in vitro* συνθήκες υποξίας σε δύο σειρές τροφοβλαστικών κυττάρων, δηλαδή σε φυσιολογικό ιστό, προερχόμενο από φυσιολογική τελειόμηνη κύηση και σε σειρά τροφοβλαστικών κυττάρων, προερχόμενων από χοριοκαρκίνωμα (Be Wo).

Όσον αφορά στα περιστατικά IUGR και προεκλαμψίας, η έκφραση του PlGF mRNA και του PlGF παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με τους φυσιολογικούς πλακούντες (2.3 και 1.6 αντίστοιχα), γεγονός που σε συνδυασμό με την ελάττωση του VEGFR-1 αποτελεί ενδεικτικό σημείο της αντιδραστικής αύξησης της οξυγόνωσης, που παρατηρείται σε σοβαρές περιπτώσεις IUGR. Σε συνθήκες υποξίας επιβεβαιώθηκε για μια ακόμη φορά η αυξημένη έκφραση του VEGF.

Ωστόσο, στην πρώτη ομάδα τροφοβλαστικού ιστού η έκθεση σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου (0%) για 24 ώρες δεν προκάλεσε καμμία μεταβολή στην έκφραση του PlGF. Στην ομάδα κυττάρων, που προέρχονταν από το χοριοκαρκίνωμα η ελάττωση του οξυγόνου (1%) προκάλεσε μείωση των PlGF και PlGF mRNA, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο ELISA. Οι συγγραφείς δεν εξηγούν όμως το λόγο

αυτής της διαφοροποίησης ανάμεσα στα δύο αποτελέσματα.

Οι Kumazaki et al.(2002), μελέτησαν μια ανομοιογενή ομάδα 42 πλακούντων, προερχόμενων από κύσεις υψηλού κινδύνου στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο (πρόωρος τοκετός, ενδομήτρια λοίμωξη, προεκλαμψία, IUGR, μονοχοριακές δίδυμες κύσεις με TTTS, εμβρυική δυσχέρεια, προδρομικός πλακούντας και διακοπή λόγω εμβρυικής ανωμαλίας ). Για τη μελέτη των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν *in situ* υβριδισμός και ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι. Διαπιστώθηκε ότι σε λάχνες με χαρακτηριστικές υποξικές/ισχαιμικές βλάβες (έμφρακτα, συγκυτιακά συμπλέγματα και αυξημένη τριχοειδική πυκνότητα ) υπήρχε αυξημένη σήμανση τόσο για τον VEGF όσο και για τον υποδοχέα του, KDR ,στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυξημένη έκφραση του PlGF υπήρχε σε εκφυλισμένη τροφοβλάστη γύρω από τα έμφρακτα καθώς και σε περιπτώσεις χοριοαμνιονίτιδας. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι σε συνθήκες υποξίας, η έκφραση των VEGF και KDR αυξάνεται στα αγγεία των λαχνών με παρακρινείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, ενώ η έκφραση των PlGF και flt-1 ενισχύεται με αυτοκρινείς μηχανισμούς. Επίσης, οι συνθήκες υποξίας/ισχαιμίας μπορεί να ρυθμίζουν άμεσα την έκφραση του flt-1.

Σε μια εργασία που αναφέρθηκε παραπάνω των Pietro et al. (2010), μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους τα επίπεδα των VEGF και VEGFR-2 σε πλακούντες με ήπια υπεργλυκαιμία και σακχαρώδη διαβήτη κατά την κύηση. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι σε γυναίκες με ήπια υπεργλυκαιμία στην κύηση υπήρχε ισχυρή χρώση για τον VEGF και τον VEGFR-2, ενώ στην περίπτωση του σακχαρώδη διαβήτη κύησης, οι παραπάνω παράγοντες ανιχνεύτηκαν μόνο στην τροφοβλάστη. Τα παραπάνω

ευρήματα δείχνουν ότι και η υπεργλυκαιμία μπορεί να αποτελεί έναν ακόμη σημαντικό παράγοντα, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την αγγειογένεση μέσω του ρυθμιστικού της ρόλου στην παραγωγή των αγγειογενετικών παραγόντων.

Η επιτυχής πλακουντοποίηση εμπεριέχει την ανάπτυξη μιας μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας χαμηλών αντιστάσεων, που προκύπτει ως αποτέλεσμα της τροφοβλαστικής διήθησης και της διαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριδίων (Benirschke & Kaufmann, 1995). Στην περίπτωση της προεκλαμψίας και της ενδομήτριας καθυστέρησης της ανάπτυξης (IUGR), τα μητρικά αιμοφόρα αγγεία δεν μπορούν να υποβληθούν σε ικανοποιητική μεταβολή και το ποσοστό του οξυγονωμένου αίματος, που μεταφέρεται στο έμβρυο, ελαττώνεται (Frusca et al., 1989; Brosens et al., 1997). Αυτή ακριβώς η εμβρυοπλακουντιακή ανεπάρκεια οδήγησε στη διαμόρφωση της έννοιας της πλακουντιακής υποξίας. Ωστόσο, διάφορες αναφορές παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά στην έκφραση του VEGF σε κύσεις με προεκλαμψία. Σε επίπεδο RNA, οι Cooper et al. (1996) ανακοίνωσαν ότι η έκφραση του VEGF βρέθηκε ελαττωμένη σε δείγματα πλακούντων με προεκλαμψία σε σχέση με δείγματα φυσιολογικών πλακούντων.

Αντίθετα, σε ορισμένες άλλες μελέτες (Baker et al., 1995; Sharkey et al., 1996) τα επίπεδα του VEGF βρέθηκαν αυξημένα, ενώ σε κάποιες άλλες ελαττωμένα σε σχέση με φυσιολογικές κύσεις (Lyll et al., 1997). Για το γεγονός αυτό, έχουν διατυπωθεί διάφορες εξηγήσεις, που αφορούν στην επιλογή των ασθενών και στην ευαισθησία των διαγνωστικών μεθόδων. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων περιπλέκεται περαιτέρω από το γεγονός ότι ο πλακούντας μπορεί να μην αποτελεί τη μοναδική



πηγή VEGF και ότι ο PlGF μπορεί να αποτελεί έναν πιο αξιόπιστο δείκτη της τάσης του  $O_2$  στο αγγειακό δίκτυο του πλακούντα.

Οι Caniggia και Winter (2001), μελέτησαν την έκφραση του HIF-1α σε πλακούντες, που προέρχονταν από φυσιολογικές κυήσεις και κυήσεις με προεκλαμψία (ηλικία κύησης 26-35 εβδομάδες). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο HIF-1α παρουσίαζε ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση στον τροφοβλαστικό ιστό, τον προερχόμενο από πλακούντες με προεκλαμψία, σε σχέση με τους φυσιολογικούς πλακούντες. Επειδή όμως είναι γνωστό ότι ο HIF-1α διεγείρεται σε καταστάσεις υποξίας, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η ελαττωμένη τάση του οξυγόνου παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση της προεκλαμψίας.

Ωστόσο, το εύρημα ότι ο HIF-1α αυξάνεται στην προεκλαμψία δημιουργεί και κάποια ερωτηματικά, δεδομένου ότι οι πλακουντιακές λάχνες στην προεκλαμψία αιματώνονται με μητρικό αίμα και η τάση του οξυγόνου θα έπρεπε να είναι δραματικά ελαττωμένη, ώστε να προκαλεί αυτή την αύξηση του HIF-1α. Είναι λοιπόν πιθανόν στην περίπτωση αυτή να μην ευθύνεται μόνο το χαμηλό οξυγόνο για αυτή την αύξηση του HIF-1α.

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η εργασία των Debieve et al.(2001), η οποία, ξεκινώντας από τη διαπίστωση ότι στους πλακούντες, που προέρχονται από κυήσεις με τρισωμία 21, παρατηρείται υποπλασία του τροφοβλαστικού ιστού και ελαττωμένη αγγειακή πυκνότητα, μελέτησε τις ποσοτικές διακυμάνσεις των VEGF και PlGF σε 15 φυσιολογικούς πλακούντες καθώς και σε 6 πλακούντες από κυήσεις με σύνδρομο Down. Και οι δύο παραπάνω παράγοντες ανιχνεύθηκαν στα δείγματα

των πλακούντων με τον VEGF να μην παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των πλακούντων από κυήσεις με σύνδρομο Down και τους φυσιολογικούς πλακούντες. Αντίθετα, ο PlGF δεν παρουσίαζε διακυμάνσεις ανάλογα με την ηλικία κύησης, αλλά η σύγκριση ανάμεσα στους πλακούντες των δύο ομάδων έδειξε σημαντικές διαφορές στην έκφραση του PlGF. Πιο συγκεκριμένα, ο PlGF παρουσιαζόταν σημαντικά ελαττωμένος σε δείγματα πλακούντα προερχόμενα από κυήσεις με Down σε σχέση με τις φυσιολογικές κυήσεις. Το εύρημα αυτό αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η ελάττωση του PlGF μπορεί να σχετίζεται με τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς που προκαλούν τις ορμονικές μεταβολές στον ορρό της μητέρας και οι οποίες σχετίζονται με το σύνδρομο Down (αύξηση της  $\beta$ -hCG και ελάττωση της AFP) . Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στη διεθνή βιβλιογραφία, η οποία εξετάζει τις ποσοτικές μεταβολές των VEGF και PlGF και HIF-1 $\alpha$  σε συνθήκες υποξίας σε τελειόμηνες κυήσεις γυναικών με σιδηροπενική αναιμία και ετερόζυγη  $\beta$ -θαλασσαιμία και ουσιαστικά έρχεται να καλύψει το κενό που, είχαν επισημάνει και αρκετοί από τους ανωτέρω ερευνητές . Πιο συγκεκριμένα, όλες οι παραπάνω μελέτες εκτός από αυτή των Kumazaki et al.(2002), αναφέρονται σε συνθήκες υποξίας in vitro, οι οποίες αν και ενδεικτικές δεν αντανakλούν σε καμιά περίπτωση το τι συμβαίνει σε έναν πλακούντα με σιδηροπενική αναιμία ή ετερόζυγη  $\beta$ -θαλασσαιμία. Επίσης, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι πλακούντες δεν προερχόταν από τελειόμηνες κυήσεις αλλά από από πλακούντες πρώτου ή δευτέρου τριμήνου, συνήθως ύστερα από διακοπή της κύησης για θεραπευτικούς σκοπούς. Βέβαια, ερευνητές όπως οι Kadyrov et al.(1998), υποστηρίζουν ότι οι αλλαγές στην

αγγειογένεση ξεκινούν από πολύ νωρίς, από το πρώτο τρίμηνο της κύησης και εξακολουθούν να επιδρούν καθ' όλη τη διάρκειά της.

Επίσης, όσον αφορά στον HIF-1α, εκτός από τη μελέτη των Caniggia and Winter (2001), οι οποίοι μελέτησαν τις ποσοτικές μεταβολές του σε πλακούντες προερχόμενους από κυήσεις με προεκλαμψία, δεν υπάρχει καμιά άλλη μελέτη η οποία να ασχολείται με το πώς μεταβάλλονται τα επίπεδα του HIF-1α σε καταστάσεις υποξίας ανάλογες με την σιδηροπενική αναιμία στην κύηση. Το γεγονός ότι ο παράγοντας αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας, δείχνει ότι η ελαττωμένη τάση του O<sub>2</sub> αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα, ο οποίος διεγείρει την παραγωγή του. Ουσιαστικά, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη, η οποία περιλαμβάνει ένα τόσο μεγάλο αριθμό πλακούντων (υπερβαίνουν τους 120), οι οποίοι προέρχονται από κυήσεις γυναικών που είτε ήταν ετεροζυγώτες της β-θαλασσαιμίας είτε ήταν σιδηροπενικές ή είχαν φυσιολογικές τιμές αιματοκρίτη. Τα δείγματα συνεπώς ήταν σε σαφείς και διακριτές ομάδες. Πέραν όμως από τις μεταβολές των VEGF, PlGF και HIF-1α, οι οποίες αναφέρονται σε μικροσκοπικό επίπεδο, γίνεται μια πρώτη προσπάθεια συσχέτισης των παραμέτρων αυτών με παράγοντες που καθορίζουν το περιγεννητικό αποτέλεσμα. Σκοπός μας ήταν λοιπόν να διαπιστωθεί εάν το βάρος γέννησης του νεογνού, το βάρος του πλακούντα, το Apgar Score και η παραμονή ή όχι στη ΜΕΝΝ, εξαρτιόταν από τα επίπεδα των VEGF, PlGF και HIF-1α. Τελικά, δεν προέκυψε κανένα αποτέλεσμα, που να επιβεβαιώνει μια τέτοια συσχέτιση. Στην περίπτωση των γυναικών με σιδηροπενική αναιμία, τα άτομα τα οποία συμπεριελήφθησαν, προέρχονταν από ιδιαίτερα χαμηλά κοινωνικο-οικονομικά

στρώματα, είχαν πλημμελή παρακολούθηση κατά τη διάρκεια της κύησης και η πλειοψηφία αυτών δεν ελάμβανε καθόλου σκευάσματα σιδήρου κατά την κύηση. Όπως είναι κατανοητό, οι συνθήκες αυτές επέτρεψαν τη σωστή διεξαγωγή της εν λόγω μελέτης, καθώς ιδιαίτερα στην περίπτωση της σιδηροπενικής αναιμίας, η μη θεραπευτική χορήγηση σιδήρου κατά τη διάρκεια της κύησης για ερευνητικούς σκοπούς εγείρει πολλά ηθικά ζητήματα και δυσκολίες .

Η απόφαση να συμπεριληφθούν στη μελέτη και τα άτομα με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία οφείλεται στο γεγονός ότι η Ελλάδα , όπως και οι υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό τέτοιων ατόμων, οπότε και θα ήταν ενδιαφέρουσα η μελέτη των αγγειακών αυξητικών παραγόντων και σε αυτούς τους πληθυσμούς .

Η μελέτη των αυξητικών αγγειακών παραγόντων στην κύηση και οι επιδράσεις τους στην αγγειογένεση αποτελούν ένα μεγάλο ερευνητικό κεφάλαιο, το οποίο είναι στην αρχή του. Πολλά ακόμη μπορούν να γίνουν, προκειμένου να διεκρινιστεί ο ρόλος τους και οι επιδράσεις τους σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις στην κύηση.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την ανάλυση των δεδομένων της μελέτης μας μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Η έκφραση του VEGF σε πλακούντες γυναικών με σιδηροπενική αναιμία και ετερόζυγη β-θαλασσαιμία είναι αυξημένη, ενώ είναι ελαττωμένη σε πλακούντες γυναικών χωρίς προβλήματα αναιμίας .
2. Αντίστροφα, είναι ελαττωμένη η έκφραση του PlGF σε πλακούντες γυναικών με σιδηροπενική αναιμία και ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, ενώ παραμένει αυξημένη σε πλακούντες γυναικών χωρίς προβλήματα αναιμίας.
3. Η έκφραση του HIF-1α είναι αυξημένη σε πλακούντες γυναικών με σιδηροπενική αναιμία και ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, ενώ είναι ελαττωμένη σε πλακούντες γυναικών χωρίς αναιμία. Επιπλέον, προκύπτει ότι η έκφραση των HIF-1α και VEGF μεταβάλλεται παράλληλα, δηλαδή σε αυξημένη έκφραση του HIF-1α διαπιστώνεται αντίστοιχα αυξημένη έκφραση του VEGF .
4. Από τα παραπάνω μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι η σχετική υποξαιμία της μητέρας, που προκαλείται λόγω της αναιμίας, τόσο στη σιδηροπενική αναιμία όσο και στην ετερόζυγη β-θαλασσαιμία παρατείνει την έκφραση του VEGF σε βάρος του PlGF, με όλες τις συνέπειες που έχει το γεγονός αυτό για την αγγειογένεση .
5. Η έκφραση του VEGF είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα σιδήρου στο ορό της μητέρας. Συνεπώς, η αυξημένη έκφραση του VEGF που παρατηρείται στην ομάδα

των σιδηροπενικών γυναικών δεν μπορεί να αποδοθεί στα ελαττωμένα επίπεδα σιδήρου και το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του HIF-1α. Αντίθετα, η έκφραση των VEGF και HIF-1α εξαρτάται από τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης, του αιματοκρίτη, του MCV, της τρανσφερρίνης και των υποδοχέων της (αυξημένη έκφραση των VEGF και HIF-1α συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα τρανσφερρίνης και των υποδοχέων της). Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η σημασία των ανωτέρω παραμέτρων για τη σωστή διάγνωση της σιδηροπενικής αναιμίας.

6. Στην ομάδα των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία, τα νεογνά γεννήθηκαν σε μικρότερη ηλικία κύησης και είχαν χαμηλότερο βάρος γέννησης, ενώ στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών το βάρος του πλακούντα ήταν μεγαλύτερο. Το Apgar Score στο 1' ήταν χαμηλότερο στην ομάδα ελέγχου και στο 5' στην ομάδα της σιδηροπενικής αναιμίας.

7. Ωστόσο, παρά τα παραπάνω αποτελέσματα, που παρατηρήθηκαν στα πλαίσια κάθε ομάδας δεν διαπιστώθηκε καμμία συσχέτιση μεταξύ της ποσοτικής έκφρασης των VEGF, PlGF και HIF-1α και του περιγεννητικού αποτελέσματος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Μελέτη της αγγειογένεσης και της ποσοτικής μεταβολής των VEGF, PlGF και HIF-1α σε πλακούντες γυναικών με σιδηροπενική αναιμία και ετερόζυγη β-θαλασσαιμία.**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ:** Η αγγειογένεση στον πλακούντα, η *de novo* δηλαδή δημιουργία αιμοφόρων αγγείων από πρόδρομα αγγειακά στοιχεία, αποτελεί μια περίπλοκη διαδικασία, η οποία ρυθμίζεται από μια ομάδα αυξητικών αγγειογενετικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων δεσπόζουσα θέση κατέχουν οι VEGF και PlGF. Ο VEGF είναι ο παράγοντας ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση, η οποία παρατηρείται κατά το πρώτο μισό της κύησης. Η μεταγραφή του διεγείρεται υπό συνθήκες υποξίας και ελαττώνεται σταδιακά μέχρι το τέλος της κύησης. Αντίθετα, ο PlGF εκφράζεται κυρίως προς το τέλος της κύησης, η έκφρασή του αυξάνει παρουσία οξυγόνου και είναι υπεύθυνος για τη μη διακλαδιζόμενη αγγειογένεση. Τέλος, ο HIF-1α αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος παίζει γενικότερο ρόλο σηματοδοτώντας την υποξία. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου της υποξίας στην ποσοτική σχέση μεταξύ VEGF και PlGF σε πλακούντες γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία καθώς και σε πλακούντες γυναικών με σιδηροπενική αναιμία, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν στις καταστάσεις αυτές παρατείνεται η έκφραση του VEGF σε βάρος του PlGF. Επίσης, να μελετηθεί η έκφραση του HIF-1α, ο οποίος υπο φυσιολογικές συνθήκες είναι ελαττωμένος έως και ανύπαρκτος στο τέλος της κύησης στους πλακούντες των δύο ανωτέρω κατηγοριών.

**ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ:** Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 126 γυναίκες σε ισάριθμες τελειόμηνες μονήρεις κήσεις, οι οποίες ταξινομήθηκαν σε 3 ομάδες: Ομάδα ελέγχου-Control Group (34 γυναίκες), ομάδα σιδηροπενικής αναιμίας (39 γυναίκες) και ομάδα ετεροζυγωτών στη β-θαλασσαιμία (53 γυναίκες). Η ταξινόμηση έγινε με βάση αιματολογικές παραμέτρους (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, σίδηρος, φερριτίνη, τρανσφερίνη και υποδοχείς τρανσφερίνης) .

Αμέσως μετά τον τοκετό, οι πλακούντες ζυγίζονταν και ακολούθως αποστέλονταν στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, όπου οι ιστοί υφίσταντο συγκεκριμένη επεξεργασία. Αρχικά διατηρούνταν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και στη συνέχεια ένα μικρό ιστοτεμάχιο εμβαπτιζόταν σε παραφίνη. Οι τομές αυτές υποβάλλονταν σε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και στη συνέχεια με τη βοήθεια των κατάλληλων αντισωμάτων και τη χρήση ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, οι οποίες ελάμβαναν υπόψη την ένταση της χρώσης και το ποσοστό των θετικών στη χρώση κυττάρων, γινόταν ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των VEGF, PlGF και HIF-1α .

Επίσης, έγινε συσχετισμός των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων με διάφορες παραμέτρους, που αφορούν στην έκβαση της κύησης (βάρος πλακούντα, βάρος νεογνού, ηλικία κύησης, Apgar Score, εισαγωγή ή όχι στη ΜΕΝΝ), προκειμένου να διαπιστωθεί εάν οι μεταβολές της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων αντανακλούν και στο περιγεννητικό αποτέλεσμα.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Η πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και αυτών με σιδηροπενική αναιμία εμφάνιζε έντονη χρώση στον παράγοντα VEGF, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας



ελέγχου, που εμφάνιζε ασθενή χρώση. Επιπρόσθετα, τόσο στην ομάδα σιδηροπενικών γυναικών όσο και στην ομάδα ετερόζυγης β-θαλασσαιμίας, το ποσοστό της ασθενούς χρώσης ήταν μηδενικό. Το εύρημα αυτό ήταν στατιστικώς σημαντικό. Αντίθετα, η διαφορά στην έκφραση του VEGF ανάμεσα στην ομάδα των σιδηροπενικών γυναικών και στην ομάδα με β-θαλασσαιμία δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Η συντριπτική πλειοψηφία των γυναικών στην ομάδα ελέγχου παρουσίαζε ισχυρή χρώση στον παράγοντα PlGF, ενώ το 66% των γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία και το 59% των σιδηροπενικών γυναικών παρουσίαζαν ασθενή χρώση ως προς τον ίδιο παράγοντα. Και το εύρημα αυτό ήταν στατιστικώς σημαντικό.

Όσον αφορά στον παράγοντα HIF-1α, παρατηρήθηκε έντονη χρώση του τόσο στην ομάδα της β-θαλασσαιμίας όσο και την ομάδα της σιδηροπενικής αναιμίας. Αντίθετα, στην ομάδα ελέγχου, η χρώση ήταν απύσχα ή ασθενής. Διαπιστώθηκε επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του HIF-1α και των τιμών αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης, MCV, τρανσφερρίνης και των υποδοχέων της.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Σε πλακούντες σιδηροπενικών γυναικών και γυναικών με ετερόζυγη β-θαλασσαιμία παρατηρείται αυξημένη έκφραση του VEGF και ελαττωμένη έκφραση του PlGF. Το εύρημα αυτό δηλώνει ότι σε συνθήκες υποξίας παρατείνεται η έκφραση του VEGF σε βάρος του PlGF. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ευοδώνεται η σύνθεση του HIF-1α, ο οποίος μεταβάλλεται παράλληλα με τον VEGF. Η έκφραση του VEGF είναι ανεξάρτητη από τα επίπεδα σιδήρου στον ορό της μητέρας και τέλος οι ποσοτικές μεταβολές των VEGF, PlGF και HIF-1α δεν επηρεάζουν στο ελάχιστο το περιγεννητικό αποτέλεσμα.

## ABSTRACT

**Study of angiogenesis and quantitative changes of VEGF, PlGF and HIF-1 $\alpha$  in placentas from women with iron deficiency anemia and beta-thalassemia trait.**

**INTRODUCTION:** Placental angiogenesis, the *de novo* formation of blood vessels from precursor vascular structures, represents a complicated procedure regulated by an heterogeneous group of angiogenic growth factors. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and PlGF (Placental Growth Factor) possess a capital position in the above group. VEGF is responsible for branching angiogenesis during the first half of pregnancy. Its transcription is enhanced under hypoxic conditions and gradually declines until the end of pregnancy. Conversely, PlGF, which promotes non-branching angiogenesis, is expressed during the end of pregnancy and its synthesis is upregulated by oxygen. HIF-1 $\alpha$  is a transcriptional factor which plays a general role in the signaling of hypoxia. The aim of the present study was the investigation of the impact of hypoxia on the quantitative correlation between VEGF and PlGF in placentas of women with iron deficiency anemia and beta-thalassemia trait, in order to figure out whether there is a prolonged expression of VEGF at the expense of PlGF under those conditions. Furthermore, we wanted to study the expression of HIF-1 $\alpha$ , which is normally reduced or even undetectable by term, in the placentas of the above two categories.

**MATERIALS-METHODS:** A total of 126 women with term singleton pregnancies

were included in the study. The women were divided to three groups: Control group (36 women), iron deficiency anemia group (39 women) and beta-thalassemia trait group (53 women). The classification was based on haematological parameters (hematocrit, hemoglobin, iron, ferritin, transferrin and transferrin receptors).

Immediately after delivery, the placentas were weighed and sent to the Department of Pathology, where the tissues underwent a specific processing. Initially, they were fixed for 24 h in 4% phosphate-buffered formaldehyde (pH 7.2) after which a random 1 cm<sup>3</sup> block was embedded in paraffin (melting point 52° C). Sections of 4µm paraffin were mounted on glass slides covered with 3-amino-propyl-ethoxy-silan and a standard haematoxylin-eosin stain was used. Consequently, a quantitative assessment of VEGF, PlGF and HIF-1α was performed. This was achieved with the use of specific antibodies and immunohistochemical assays which took under consideration the intensity of the immunostaining and the whole area of the section and the percentage of positive stained trophoblastic cells.

Additionally, there was a correlation of the immunohistochemical findings with a number of parameters associated with the pregnancy outcome (placental weight, birthweight, gestational age, Apgar score, NICU admission), in order to find out whether the changes in the expression of growth factors can affect perinatal outcome.

**RESULTS:** The majority of the women with beta-thalassemia trait and iron deficiency anemia presented an intense VEGF cytoplasmatic immunostaining, whereas the majority of the control group members presented weak immunostaining. Furthermore, in the two anemia groups the percentage of weak immunostaining was

practically null. All these findings were statistically significant. Conversely, it was found that in the vast majority of the Control group there was strong cytoplasmatic immunostaining for PlGF but in the 66% of women with beta-thalassemia trait and in 59% of iron deficient women there was weak immunostaining for the above factor. This conclusion was also statistically significant.

HIF-1 $\alpha$  immunostaining was intense in the two groups of anemia and weak or absent in the Control Group. A statistically significant association was found between HIF-1 $\alpha$  immunoreactivity and hematocrit, hemoglobin, MCV, transferrin and its receptors. HIF-1 $\alpha$  had no important direct effect on perinatal outcome.

**CONCLUSIONS :** We concluded that there is increased expression of VEGF and reduced expression of PlGF in placentas from women with iron-deficiency anaemia and beta-thalassemia trait. This finding suggests that hypoxic conditions upregulate the production of VEGF in the expense of PlGF. Furthermore, it was found that hypoxic conditions stimulate HIF-1 $\alpha$  synthesis and its quantitative changes correspond to VEGF changes. VEGF expression does not depend on maternal serum iron levels and finally, VEGF, PlGF and HIF-1 $\alpha$  by no means affect perinatal outcome .



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ACOG Committee on Obstetrics. ACOG Practice Bulletin No 78: hemoglobinopathies in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2007;109: 229-37.
- Ahmed A, Whittle MJ, Khaliq A. Differential expression of PlGF and VEGF in abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 1997; 4: A663
- Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of VEGF and PlGF and soluble Flt-1 by oxygen- a review. *Placenta* 2000;21(Suppl A,14):S16-S24.
- Åkesson A, Bjellerup P, Berglund M, Bremme K, Vahter M. Serum transferrin receptor: a specific marker of iron deficiency in pregnancy. *M. Am J Clin Nutr* 1998;68:1241-6.
- Allen LH. Pregnancy and iron deficiency: Unresolved issues. *Nutrition reviews* 1997;55:95-101.
- Allen LH. Anaemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):1280S-4S.
- Allen LH. Biological mechanisms that might underline iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J Nutr* 2001;131:581S-9S.
- Alger LS, Golbus MS, Laros RK. Thalassaemia and pregnancy: results of an antenatal screening program. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 134:662-73.
- Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2000;141:757-64.

Baker P, Krasnow J, Roberts J, Yeo K. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with pre-eclampsia. *Obstet and Gynecol* 1995; 86:815-21.

Bianco I, Mastropietro F, D'Asero I, Graziani B, Pergrossi P, Nezzabotta H, Modiano G. Serum levels of erythropoietin and soluble transferrin receptors during pregnancy in non- $\beta$ -thalassemic and  $\beta$ -thalassemic women. 2000; 85(9):902-907.

Beck L. and Heywinkel E.: Berechtigte und unberechtigte Befürchtungen in der Reproduktionsmedizin. *Gynaekologe* 23:249-251, 1990.

Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status . *Clin Chim Acta* 2003 Mar;329(1-2):9-22.

Bencaiova G, Krafft A, Burkhardt T et al. Variable efficacy of recombinant human erythropoietin in anemic pregnant patients with different forms of heterozygous hemoglobinopathy. *Acta Hematol* 2006; 116: 259-65.

Benirschke K. Fetal Homeostasis Vol I, p.328. New York Academy of Sciences New York ,1965.

Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 4<sup>th</sup> edition New York: Springer Verlag, 2000; 947pp.

Benirschke K, Kaufmann P, Baerger R. Pathology of the human placenta. New York: Springer 2006.

Boyd JD, Hamilton WJ: The Human placenta. Heffer, Cambridge ,1970.

Bouw GM, Stolte LAM, Baak JPA et al. Quantitative morphology of the placenta, Standardization of sampling. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1976; 6:325-31.

function in the human placenta.

Breymann C, Fibach E, Visca E et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis with recombinant human erythropoietin in anemic patients with heterozygous beta-thalassemia during pregnancy. *J Matern Fetal Med* 1999;8: 1-7.

Breyman C. Iron deficiency and anaemia in pregnancy: modern aspects of diagnosis and therapy. *Blood Cells Mol Dis* 2002 Nov-Dec;29(3):506-16; discussion 517-21.

Brosens I, Dixon HG, Robertson WB. Fetal Growth retardation and the arteries of the placental bed. *Br J Obstet Gynecol* 1997;84: 656-664.

Bunn HF, Poyton RO. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 1996;76: 839-885.

Burton GJ, Charnock-Jones DS, Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reprod* 2009; 138(6):895-902.

Butler NR, Bonham DG. Perinatal mortality . First Report of the 1958 British Perinatal Mortality Survey. Edinburgh:E&S Livingston 1963.

Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A. Activation of VEGFR-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3 kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* 2003;52:2959-68.

Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M. Hypoxia-inducible Factor 1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFβ3. *J Clin Invest* 2000b;105:577-587.

Caniggia I, Winter L. Adrianna 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 S (16): S47-S57.



Cao A, Moi P, Calanella R. Recent advances in  $\beta$ -thalassemias. *Pediatric Reports* 2011 Jun 16;3 (2):e17.

Cao A, Galanella R, Rosatelli MC. Genotype-phenotype correlations in betathalassemias. *Blood Rev* 1994;8:1-12.

Cao Y, Ji WR, Rosin A, Cao Y. PlGF identification and characterization of a novel isoform generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:493-8.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert J et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in the hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-90.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-39.

Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, et al. Synergism between VEGF and PlGF contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7:575-83.

Carter AM. When is the maternal placental circulation established in Man? *Placenta* 1997; 18:83-7.

Castellucci M & Kaufmann P. A three-dimensional study of the normal human placental villous core. II. Stromal architecture. *Placenta* 1982; 3:269-86.

Castellucci M, Scheper M, Scheffer I, et al. The development of the human placental

villous tree. *Anat Embryol* 1990; 181: 117-28.

Castellucci M, Classen-Linke I, Muhlhauser J, Chiquet-Ehrismann R. The human placenta: a model for tenascin expression. *Histochemistry* 1991;95: 449-58.

Castellucci M, Crescimanno C, Mulhauser J, Frank HG, Kaufmann P, Zardi L. Expression of extracellular matrix molecules related to placental development. *Placenta* 1993;14:A9.

Castellucci M, Crescimanno C, Schroeter CA, et al. Extravillous trophoblast: immunohistochemical localization of extracellular matrix molecules. *Frontiers in gynecologic and obstetric investigation*. New York: Parthenon, 1993:19-25.

Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: Fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 2000;6:485-94.

Centres of Disease Control 1989. Criteria for anaemia in Children and Childbearing age Women. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 38(200):400-4.

Chander K, Shekhar G, Gautam J. Iron Deficiency in Pregnancy and the Rationality of Iron Supplements Prescribed During Pregnancy. *Medscape J Med*. 2008; 10(12): 283.

Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. I. Molecular Regulation. *Placenta* 2004; 25:103-13.

Clark DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AC et al. A VEGF antagonist is produced in the human placenta and released in the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998; 59: 1540-8.

Clark DE, Smith SK, Licence D, Charnock-Jones DS. Comparison of expression patterns of PlGF, VEGF, VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *J Endocrinol* 1998;159: 459-67.

Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsel R, Siegel N, Haymore BL, Leimbruber R, Feder J. Human Vascular Permeability Factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 20017-24.

Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum Transferrin Receptor. *Annu Rev Med* 1993; 44:63.

Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1996; 103: 1191-6.

Crescimanno C, Marzioni D, Persico MG, Vuckovic M, Muhlhauser J, Castellucci M. Expression of bFGF, PlGF and their receptors in the human placenta. *Placenta* 1995;16: A 13.

Daikoku T, Matsumoto H, Gupta RA, Das SK, Gassmann M, Dubois RN, Dey SK. Expression of Hypoxia-inducible factors in the peri-implantation mouse uterus is regulated in a cell-specific and ovarian steroid hormone-dependent manner. Evidence for differential function of HIFs during early pregnancy. *J Biol Chem* 2003;278:7683-7691.

Dalman PR, Siimes MR, Stekel A. Iron deficiency in infancy and childhood. *Am J Clin Nutr* 1980;33:86-118.

Debieve F, Moiset A, Thomas K, Pampfer S, Hublot C. VEGF and PlGF

concentrations in Down's Syndrome and control pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2001;7(8):765-70.

Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T. and Kotowski A. Fetal vasculogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 1989; 136:190-203.

Demir R, Demir N, Kohnen G, Kosanke G, Mironov V, Ustunel I, Kocamaz E. Ultrastructure and distribution of myotrophoblast cells in human placental stem villi. *Electron Microsc* 1992;3:509-10.

Denker HW. Trophoblast-endometrial interactions at embryo implantation: a cell biological paradox. *Trophoblast Res* ,4:1-27,1990.

Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible Factor 1; regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Bioch Cell Bio* 2004;37: 353-40.

Desai J, Holt-Shore V, Torry J, Caudle M, Torry DS. Signal Transduction and Biological Function of Placenta Growth Factor in Primary Human Trophoblast. *Biol of Reprod* 1999; 60 : 887-92.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.

Ema M, Taya S , Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujji-Kuriyama Y. A novel basic helix-loop-helix PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1a regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad USA* 1997;94:4273-78.

Enders AC, King BF. Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in

the rhesus monkey. *Am J anat* 1988;118:327-40.

Evans PW, Wheeler T, Anthony FW, Osmond C. A longitudinal study of maternal serum VEGF in early pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 1057-62.

Faulk WP. Placental fibrinoid. *Am J Reprod Immunol* 1989;19:132-5.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K, Powel-Braxton L, Hillan KJ, Wood CR. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380:439-42.

Fleming AF, Martin JD, Hahnel R, Westlake AJ. Effects of iron and folic acid supplements in maternal fetal wellbeing. *Med J Aust* 1974;2:429-36.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267: 10931-4.

Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development* 1999; 126: 3015-25.

Forsythe JA, Liang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW , et al. Activation of VEGF gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16: 4604-13.

Frank HG, Malekzadeh F, Kertschanska S et al. Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat* 1994;150:55-68.

Garby L, Irnell L, Werner I. Iron deficiency in women of fertile age in a Swedish population. *Acta Med Scand* 1969;185:113-7.

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997; 277: 1669-72. *Placenta* 2002; 23, Suppl A: S20-S27.

Godfrey KM. The Role of Placenta in Fetal Programming -A Review.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and cromosomal localization of a third a-class hypoxia-inducible factor subunit HIF-3 $\alpha$ . *Gene Expr* 1998; 7:205-13.

Hamilton WJ, Boyd JD. Development of the human placenta in the first three months of gestation. *J Anat* 1960;94:297-328.

He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS. Alternative splicing of VEGF-R1(flt-1)pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 1999;13:537-45.

Hegde UM. Thalassaemia, Iron, and Pregnancy. *British Medical Journal* 1975; 3:509-511.

Hercberg S, Galan P, Preziosi P. Consequences of iron deficiency in pregnant women: current issues. *Clin Drug Invest.* 2000;19, suppl :1-17.

Hewitson KS, Schofield CJ. The HIF pathway as a therapeutic target. *Drug Discov Today.*2004; 9: 704-11.

Huang A, Rendong Z, Yang Z. Quantitive (stereological) study of placental structures in women with pregnancy iron-deficiency anemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97: 59-64.

Huber AV, Saleh L, Bauer S, Husslein P, Knofler M. tNF alpha-mediated induction of PAI-I restricts invasion of HTR-8/SVneo trophoblast cells. *Placenta* 2006;27: 127-36.

Huppertz B, Kertschanska S, Frank H, et al. Extracellular matrix components of th placental extravillous trophoblast. *Immunohistochemistry and ultrastructural distribution.*

Histochem Cell Biol 1996; 196:291-301.

Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. J Clin Pathol 2008;61:1296-1302.

Ibba RM, Zoppi MA, Floris M, et al. Neural tube defects in the offspring of thalassaemia carriers. Fetal Diagn Ther 2003; 18: 5-7.

Ioannou M, Papamichali R, Kouvaras E, Mylonis I, Vageli D, Barbanis S, Daponte A, Simos G, Gourgoulisanis K, Coucoulis G. HIF-1a and VEGF in Biopsies of Small Cells Lung Carcinoma. Lung 2009 ;187(5): 321-9.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu YL, Semenza GL. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> hemostasis by hypoxia-inducible factor 1a. Genes Dev 1998;12:149-162.

Jackson MR, Mayhew TM, Boyd PA. Quantitative description of the elaboration and maturation of villi from 10 weeks of gestation to term. Placenta 1992;13:357-70.

Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic factors (PDECFCG and VEGF) in human placenta throughout gestation. Placenta 1994; 15:341-53.

James JL, Stone PR, Chamley LW. The regulation of trophoblast differentiation by Oxygen in the first trimester of pregnancy.

Human Reprod Update 2006; 12(2): 137-144.

Jauniaux E, Watson A, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial bloodflow and placental oxidative stress; a possible factor in human early pregnancy failure. Am J Pathol 2000; 157: 2111-2122.

Jauniaux E, Watson A, Burton G. Evaluation of respiratory gases and acid-base

gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissues between 7 and 16 weeks gestation . Am J Obstet Gynecol 2001; 184: 998-1003.

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of Hypoxia-inducible Factor 1. Cell Growth Differ 2001;12:363-69.

Houk KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung D. The vascular endothelial growth family: Identification of a four molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol 1991;5: 1806-14.

Huang A, Zhang R, Yang Z. Quantitive (stereological) study of placental structures in women with iron-deficiency anaemia. Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol 2001;97: 59-64.

Kadyrov M, Kosanke G, Kingdom G, Kaufmann P. Increased fetoplacental angiogenesis during first trimester in anaemic women. The Lancet 1998 Nov 28;352(9142): 1747-9.

Kaltsoya-Tassiopoulou A, Loutradi-Anagnostou A, Rompos J, et al. Hematological and biochemical parameters in pregnancy. Comparison between normal controls and heterozygous  $\beta$ -thalassemia. Iatriki 1983;43:40-48.

Kaufmann P, Stegner HE. Over the functional differentiation of the syncytiotrophoblast in the human placenta. Zellforsch 1972 .135;361-82.

Kaufmann P, Stark J. Enzyme histochemical studies on mature human placental villi. I. Differentiation and degeneration of the trophoblast. Histochemie 1972;29:65-82.

Kaufmann P, Bruns U, Leiser R, Luckhardt M, Winterhager E. The fetal



vascularisation of term human placental villi.II. Intermediate and terminal villi. *Anat Embryol* 1985;173: 203-14.

Kaufmann P. Basic morphology of the fetal and maternal circuits in the human placenta.*Contrib Gynecol Obstet* 1985;13:5-17.

Kaufmann P, Luckhardt M, Leiser R. Three-dimensional representation of the fetal vessel system in the human placenta. *Trophoblast Res* 1988; 3: 113-37.

Kaufmann P, Kingdom J. Development of the vascular system of the placenta .In: Risau W, Rubanyi GM, editors. *Morphogenesis of endothelium*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers 2000;255-75.

Kaufmann P, Black S, Huppertz B.Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of IUGR and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; 69:5-17.

Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of Human fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis.II. Changes during Normal Pregnancy. *Placenta* 2004; 25:114-26.

Khaliq A,Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Whittle MG, Weich H, Ahmed A. Localization of PlGF in human term placenta. *Growth factors* 1996;13:243-50.

Khaliq A, Dunk C, Jiang Jedo C, Weich H, Shams M, Li X, Acevedo C, Whittle M, Ahmed A. Hypoxia down-regulates PlGF whereas IUGR up-regulates PlGF. Molecular evidence for “placental hyperoxia” In IUGR.*Labor Invest* 1999;13:537-45.

King BF, Blankenship TN. Himmunohistochemical localization of fibrillin in developing macaque and term human placentas and fetal membranes. *Microsc Res Tech* 1997;38:42-51.

Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 2000;18:613-26.

Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92 :35-43.

Kitay DZ, Harbort RA. Iron and folic acid deficiency in pregnancy. *Clin Perinatol* 1975;2:255-73.

Klatte T, Seligson D, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kled MD, Yu H, Kabbavar FF, Pantuck AJ, Beldegrun AS. Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  in Clear Renal Cell Carcinoma . *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7388-7393.

Kohgo Y, Torimoto Y, Kato J. Transferrin receptor in tissue and serum: updated clinical significance of soluble receptor. *Int J of Hematol.* 2002 Oct;76 (3): 213-8. Review.

Kohnen G, Castellucci M, Hsi BL, Yeh CGJ, Kaufmann P. The monoclonal antibody GB42-a useful marker for the differentiation of the myofibroblasts. *Cell tissue Res*, 1995; 281:231-42.

Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of VEGF, PlGF and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol* 2002;33:517-31.

Kurz HJ, Wilting K, Sandau K, Christ B. Automated evaluation of angiogenic effects mediated by VEGF and PlGF homo- and heterodimers. *Microvasc Res* 1998; 55:92-102.

Larsen LG, Clausen HV, Johnson L. Stereological examination of placentas of

mothers who smoke during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:531-7.

Leiser R, Luckhardt M, Kaufmann P, Winterhager E, Bruns U. The fetal vascularisation of human term placental villi.I. Peripheral stem villi. *Anat Embryol* 1985;173:71-80.

Lewis RM, Doherty CB, James LA, Burton GJ, Hales CN. Effects of maternal iron restriction on placental vascularisation in the Rat. *Placenta* 2001;22 : 534-39.

Locksmith GJ, Duff P. Preventing neural tube defects : the importance of periconceptional folic acid supplements.*Obstet Gynecol* 1998; 9: 1027-34.

Lucket WP. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat* 1978;152:59-97.  
pregnancy and in pre-eclampsia. *BJOG* 1997; 104: 223-28.

Lyall F, Greer IA, Boswell F, Fleming R. Supression of VEGF immunoreactivity in normal pregnancy and in preeclampsia.*Br J Obstet Gynaecol* 1997 Feb;104(2):223-8.

Macara L, Kingdom JC, Kohnen G. et al. Elaboration of stem villous vessels in growth restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Br J Obstet Gynecol* 1995; 102: 807-12

Macara L, Kingdom JC, Kaufmann P. et al. Structural analysis of placental terminal villi from growth-restricted pregnancies with abnormal umbilical artery Doppler waveforms. *Placenta* 1996; 17:37-48.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G et al. Isolation of a human placenta cDNA encoding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 9267-71.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.

Mc Lean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Publ Hlth Nutr*. 2008;12:444-54.

McLennan JE, Englert Y, Vanesse M, et al. Implications of eccentricity of the human umbilical cord. *Am J Obstet Gynecol* 1968;101:1124-30.

Mehendale R, Hillard J, Fazleabas A, Leach R. Placental angiogenesis markers sFlt-1 and PlGF: Response to cigarette smoke. *AJOG* 2007; 197: 363. e1-363. e5.

Murphy JF, O'Riordan J, Newcombe RG, Coles EC, Pearson JF. Relation of hemoglobin levels in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> trimester to the outcome of pregnancy. *Lancet* 1986; 1:992-4.

Myatt L. Control of vascular resistance in the human placenta. *Placenta* 1992;13:329-41 VEGF and its receptors. *The FASEB J* 1999;13:9-22.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z, Pajusola K, Aprelikova O, Kohronen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 1992; 52:5738-43.

Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I. Increased expression of sFlt-1 in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291: R

1085-R 1093.

Park S, Dadak A, Haase VH, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson RS. Hypoxia-induced Gene Expression Occurs Solely through the action of Hypoxia-inducible Factor (HIF-1a): Role of Cytoplasmic Trapping of HIF-2a. *Mol Cell Biol* 2003; 23(14): 4959-71.

Pena-Rosas JP, Viteri FE. Effects and safety of preventive oral iron or iron+folic acid supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;4:CD004736.

Pietro L, Daher S, Rudge MV, Calderon IM, Damasceno DC, Sinzato YK, Bandeira C, Bevilacqua E. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta* 2010 Sep;31(9):770-80.

Pinjnenborg R. Trophoblast invasion and placentation in the human: morphological aspects. *Trophoblast res* 1990;4;33-47.

Polhamus B, Dalenius K, Mackintosh H, Smith B, Grummer-Strawn L. Paediatric Nutrition Surveillance 2008. Atlanta US Dept of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention 2009.

Polin RA, Fox WW, Abman SH. Fetal and Neonatal Physiology 3<sup>rd</sup> Ed, Vol I, II. Saunders, Philadelphia, 2004.

Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, et al. Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* 2002; 23 (suppl A):S107-13.

Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT. Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy.

Human Reprod Update 2010; 16(4): 415-31.

Punnonen K, Kerttu I, Allan R. Serum Transferrin Receptor and its Ratio to Serum Transferrin in the diagnosis of Iron deficiency. Blood 1997; 89: 1052-57.

Rao K, Shapiro D, Mattia E, Bridges K, Klausner RD. Effects of alterations in cellular iron and biosynthesis of the transferrin receptor in K562 cells. Mol Cell Biol 1985; 5:595.

Rajakumar A, Conrad CK. Expression, Ontogeny and Regulation of Hypoxia-inducible Transcription Factors in the Human Placenta. Biol Reprod 2000;63: 559-69.

Rappaport VJ, Velasquez M, Williams K. Hemoglobinopathies in pregnancy. Obstet Gynecol Clin North Am 2004;31: 287-317.

Ratten GJ, Beischer NA. The significance of anemia in an obstetric population in Australia. J Obstet Gynecol Brit Commonw 1972; 79:228-37.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997;386: 671-4.

Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J Cell Sci 2001;114(5): 853-65.

Rodesch F, Simon P, Doner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. Obstet Gynecol 1992;80:283-5.

Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A. Mean corpuscular volume of heterozygotes for beta-thalassemia correlates with the severity of the mutations. Blood 1992;79:238-43.

Rusia U, Madan N, Agarwal N, Sood SK, Sikka M. Serum transferrin receptors in detection of iron deficiency in pregnancy. Ann Hematol 1999; 78: 358-63.

Ryan H, Lo J, Johnson RH. HIF-1a is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998;17: 3005-3015.

Savona-Ventura C, Bonello F. Beta-thalassemia Syndromes and Pregnancy. *Obstetric Gynecol Survey* 1994;49(2):129-37.

Scholl TO, Hediger ML, Fischer RL, Shearer JW. Anemia vs iron deficiency: Increased risk of preterm delivery in a prospective study. *Am J Clin Nutr* 1992;55:985-88.

Scholl TO, Hediger ML. Anemia and iron deficiency anemia : compilation of data on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 1994;59 (suppl):492S-510S.

Scholl TO. Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant.. *Am J Clin Nutr*. 2005 May;81(5):1218S-1222S.

Scholl TO. Maternal iron status : relation to fetal growth, length of gestation, and iron endowment of the neonate. *Nutrition rev* 2011;69(suppl): S23-S29.

Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for VEGF in human placenta. *Journal of Reprod and Fertility* 1996; 99:609-15.

Schweikhart G, Kaufmann P. Zur Abgrenzung normaler, artefizieller und pathologischen Strukturen in reifen menschlichen Plazentazotten. *Ultrastruktur der Syncytiotrophoblasten*. *Arch Gynecol* 1977;222:213-30.

Selingman SP, Nishiwaki T, Kadner J, Dancis J, Finlay TH. Hypoxia stimulates eNOS mRNA expression by differentiated human trophoblasts. *Ann NY Academy Sci* 1997;828:180-7.

Semenza GL. Targeting HIF-1a for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:721-732.

Senger DR, Peruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promoted accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983; 219:983-5.

Sheiner E, Levy A, Yerushalmi R et al. Beta-thalassemia minor during pregnancy. *Obstet gynecol* 2004;103:1273-7.

Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001;22:1-13.

Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry MR, Caudle MR, Torry DS. VEGF ,PlGF, and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997;18: 657-65.

Sifakis S, Pharmakides G. Anemia in pregnancy.Hematological problems in pregnancy 1999:125-36.

Skikne B. Serum transferrin receptor. *Am J Hematol* 2008;83:872-75.

Skikne BS ,Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency.Blood 1990 1;75(9):1870-6.

Schmid T, Zhou J, Brune B. HIF-1 and p53 : communication of transcription factors in hypoxia. *J Cell Mol Med* 2004; 8:423-31.

Soothil PW, Nikolaides KH, Rodeck CH, Cambell S. Effects of gestational age on fetal and intervillous blood gas and acid-base values in human pregnancy. *Fetal Therapy* 1986; 1: 168-75.

Taylor R, Grimwood J, Taylor RS, McMaster M, Fisher S, North R. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor:Evidence for abnormal angiogenesis



in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 177-82 .

Tertemitz F, Kayisli UA, Arici A, Demir R. Apoptosis contributes to vascular lumen formation and vascular branching in human placental vasculogenesis. *Biol of Reprod* 2005; 72:727-35.

Thein SL. Genetic modifiers of the betahaemoglobinopathies. *Br J Haematol*. 2008;141:357-66.

Thorstensen K, Romslo I. The transferrin receptor: Its diagnostic value and its potential as therapeutic target. *Scan J clin Lab Invest* 1993; 53;113.

Todros T, Sciarrone A, Piccoli E. et al. Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 1999; 93:499-503.

Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of VEGF expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:1045-49.

Tsatalas C, Chalkia P, Pantelidou D, Margaritis D, Bourikas G, Spanoudakis E. Pregnancy in  $\beta$ -thalassemia trait carriers: an uneventfull journey. *Hematology* 2009;14(5):301-3.

Tseng JJ, Chou MM, Hsieh YT, Wen MC, Esther SC, Ho SC, Hsu SL. Differential expression of VEGF, PlGF and their receptors in placentae from pregnancies complicated by placenta accreta. *Placenta* 2006; 27: 70-78.

Vaupel P. The role of Hypoxia-inducible Factor in tumor progression. *Oncologist* 2004; 9: 10-17.

- Vincenti V, Cassano C, Rocchi , Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3 *Circulation* 1996; 93: 1493-5.
- Vuckovic M, Ponting J, Terman BI, Niketic V, Seif MW, Kumar S. Expression of the VEGFR, KDR, in human placenta. *J Anat* 1996;188:361:361-6.
- Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG. Expression of VEGF and PlGF in human placenta. *Biol Reprod* 1997;56:489-94.
- Wang ZL, Jiang HE, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;92:5510-14.
- Welsh AO, Enders AE. Light and electron microscopic examination of the mature decidua cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degradation. *Am J Anat.*172:1-29,1985.
- Wheeler T, Elcock CL, Anthony FW. Angiogenesis and the placental environment. *Placenta* 1995; 16: 289-96.
- White JM ,Richards R, Byrne M, Buchanan T, White YS, Jelenski G. Thalassaemia trait and pregnancy. *J Clin Pathol* 1985;38:810-817.
- Wheatherall DJ, Clegg B. *Thalassemia Syndromes*. The 4th Ed. 2001 Blackwell Science Ltd.
- Weatherall DJ .Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet* 2001;2:245-55.
- Wilting J, Birkenhager R, Eichmann A, Kurz H, Martiny-Baron G, Marne D, McCarthy JEG, Christ B, Weich HA. VEGF induces proliferation of vascular

endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic cells of the chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1996; 176: 76-85.

World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia Report 1993-2005.

WHO Global Database on Anaemia. Geneva, WHO 2008.

Zhao B, Cai J, Boulton M. Expression of Placenta Growth Factor by both VEGF and hyperglycaemia via VEGFR-2. *Microvascular Research* 2004;68: 239-46.

Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, Bana A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, Persico MG. PlGF-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic. *Lab Invest* 1997;76:517-31.

Zhang EG, Burton GJ, Smith SK, Charnock-Jones DS. Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: Changes in diameter and perivascular cell coverage. *Placenta* 2002; 23 :751- 62.

Ziello J, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *Yale J Biol Med* 2007; 80: 51-60.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**Όνομα :** Μιχαλίτση Βασιλική

**Πατρώνυμο :** Δημήτριος

**Μητρώνυμο :** Μαρία

**Οικογενειακή κατάσταση :** Έγγαμος, μητέρα ενός άρρενος τέκνου

**Ημερομηνία γέννησης :** 25/09/1971

**Τόπος γέννησης :** Τρίκαλα

**Διεύθυνση κατοικίας :** Σαλαμινομάχων 46, 15236, Νέα Πεντέλη, Αθήνα

**Τηλέφωνα :** 2106095027, 6932242783

**e-mail :** [vmichalitsi@yahoo.com](mailto:vmichalitsi@yahoo.com)

## ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

**Ιούνιος 1989 :** Αποφοίτηση από το Γενικό Λύκειο Καλαμπάκας με βαθμό απολυτηρίου «Άριστα» (19/20).

**Σεπτέμβριος 1990-Νοέμβριος 1997 :** Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ύστερα από Πανελλήνιες Εξετάσεις με σειρά εισαγωγής 13<sup>η</sup> .Αποφοίτηση με βαθμό «Λίαν καλώς» (8/10)

**Ιούνιος- Ιούλιος 1995 :** Elective Γενικής Χειρουργικής στη Χειρουργική Κλινική του

Νοσοκομείου «Leeds General Infirmary» του Πανεπιστημίου του Leeds –  
Μεγ. Βρετανία

**Σεπτέμβριος- Οκτώβριος 1995 :** Elective Γενικής Παθολογίας στην Παθολογική

Κλινική του Νοσοκομείου «Eastern General Hospital» του Πανεπιστημίου του  
Εδιμβούργου – Μεγ. Βρετανία

## **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ- ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

**Δεκέμβριος 1997 :** Απόκτηση Άδειας Ασκήσεως του Ιατρικού Επαγγέλματος

**Ιανουάριος 1998 :** Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Τρικάλων

**Φεβρουάριος-Μάιος 1998 :** Τρίμηνη εκπαίδευση σε Γενική Χειρουργική , Γενική  
Παθολογία και Καρδιολογία στο Γενικό Νοσοκομείο Τρικάλων

**Μάιος 1998- Μάιος 1999 :** Ιατρός στο Αγροτικό Ιατρείο Καστανιάς Τρικάλων

**Αύγουστος 1999- Μάιος 2000 :**Ειδικευόμενη Γενικής Χειρουργικής στη  
Β Χειρουργική Κλινική του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά»  
(Διευθυντής : Ευρ. Ευλογημένος).

**Μάρτιος 2000 :** Απόκτηση άδειας ασκήσεως Ιατρικού επαγγέλματος στη Μεγ.  
Βρετανία (General Medical Council)

**Οκτώβριος 2000- Οκτώβριος 2004 :** Ειδικευόμενη Μαιευτικής - Γυναικολογίας  
στην Πανεπιστημιακή Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Περιφερικού  
Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Διευθυντής : Καθηγητής  
Ι.Ε. Μεσσήνης).Εκπαίδευση στο Τμήμα Μαιευτικών και Γυνακολογικών Υπερήχων  
( Υπεύθυνη : Κα Χ. Σκέντου ).

**Φεβρουάριος 2005 :** Απόκτηση του τίτλου ειδικότητας της Μαιευτικής-  
Γυναικολογίας

**Φεβρουάριος -Δεκέμβριος 2005:** Παρακολούθηση των δραστηριοτήτων της Γ΄

Πανεπιστημιακής Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου  
«Αττικόν» (Διευθυντής : Καθηγητής Εμ. Σαλαμαλέκης)

**Δεκέμβριος 2005- Ιούνιος 2006 :** Εκπαίδευση στο τμήμα Προγεννητικού Ελέγχου  
της Πανεπιστημιακής Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Περιφερικού  
Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Διευθυντής : Καθηγητής  
Ι.Ε. Μεσσήνης).

**Απρίλιος 2006 :** Εγγραφή στον Ιατρικό Σύλλογο της Μεγ. Βρετανίας ως ειδικευμένη  
Μαιευτήρας - Γυναικολόγος

**Οκτώβριος 2006- Νοέμβριος 2007 :** Επιστημονική Συνεργάτης ( Clinical Fellow)  
της Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Chelsea & Westminster Hospital –  
Imperial College , Λονδίνο ( Διευθυντής : Καθηγητής Philip Steer). Εκπαίδευση στον  
τομέα «Κύηση υψηλού κινδύνου – Maternal Medicine».

Από το Μάρτιο 2007 έως και τον Οκτώβριο ανέλαβα έμμισθη θέση ως Specialist  
Registrar στην ανωτέρω Κλινική και εργάστηκα στα παρακάτω τμήματα: Εξωτερικά  
Μαιευτικά και Γυναικολογικά Ιατρεία, στο Ιατρείο Κύησης Υψηλού Κινδύνου και  
Διαβήτη καθώς και στην Αίθουσα Τοκετών.

Μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα παρακολούθησα το ειδικό εκπαιδευτικό πρόγραμμα  
του Βασιλικού Κολλεγίου των Μαιευτήρων – Γυναικολόγων για την Κύηση Υψηλού  
Κινδύνου ( Maternal Medicine Module) με επιβλέποντες τους :Καθηγητή Philip Steer  
και τον Mr Mark Johnson και τον Ιούνιο του 2008 έλαβα επισήμως τον τίτλο της  
υποειδικότητας μετά από επιτυχείς εξετάσεις .

Από τον Οκτώβριο 2006 έως και τον Νοέμβριο 2007 διατηρούσα θέση  
Επιστημονικής- Ερευνητικής Συνεργάτιδος (Clinical- Research Fellow) του

τμήματος Συγγενών Καρδιοπαθειών Ενηλίκων στο Νοσοκομείο Royal Brompton (Διευθυντής : Καθηγητής Michael Gatzoulis) , όπου εκπαιδεύτηκα στο αντικείμενο «Καρδιοπάθειες και Κύηση».Παράλληλα , μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα παρακολουθούσα μαθήματα Εμβρυικής Υπερηχοκαρδιογραφίας από την Δρα Helena Gardiner στα Νοσοκομεία Queen Charlotte's και Royal Brompton.

**Νοέμβριος 2006 :** Απόκτηση του Ελληνικού Κρατικού Διπλώματος Μαιευτικών-Γυναικολογικών Υπερήχων ύστερα από επιτυχείς εξετάσεις.

Από το Νοέμβριο του 2007 μέχρι και σήμερα απασχολούμαι στη Γ' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών ως Επιστημονική Συνεργάτης με γνωστικό αντικείμενο «Κύηση Υψηλού Κινδύνου». Από τον Απρίλιο ως και τον Αύγουστο του 2008 εργάστηκα ως **Λέκτωρ Π.Δ . 407/80** στο ίδιο γνωστικό αντικείμενο.

**Μάιος 2008 :** περάτωσα με επιτυχία τις εξετάσεις επάρκειας στη Διαγνωστική Κολποσκόπηση .

Από τον Ιούνιο 2009 μέχρι και το Δεκέμβριο 2009 πραγματοποίησα ερευνητικό έργο με τίτλο « Doppler νεφρικών αρτηριών σε κύσεις με IUGR και προεκλαμψία» ως ειδική ερευνήτρια του ΕΛΚΕ , ενώ από το Μάρτιο του 2011 ανανεώθηκε η σύμβασή μου , η οποία συνεχίστηκε μέχρι τον Αύγουστο του 2013.

**Σεπτέμβριος 2013:** Υπότροφος του Εθνικού και Καποδιστριακού πανεπιστημίου Αθηνών στη Γ'Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική στο Νοσοκομείο ΑΤΤΙΚΟΝ με γνωστικό αντικείμενο: Κύηση Υψηλού Κινδύνου-Συγγενείς Καρδιοπάθειες και Κύηση. Στα καθήκοντά μου περιλαμβάνονταν οι διδασκαλία των φοιτητών και των

ειδικευόμενων ιατρών καθώς και το ερευνητικό έργο πάνω στην κύηση Υψηλού Κινδύνου . Κατά το παραπάνω χρονικό διάστημα παρακολούθησα στα εξωτερικά ιατρεία της Κλινικής μεγάλο αριθμό γυναικών με προβλήματα υγείας κατά την κύηση, όπως Σακχαρώδης Διαβήτης , ρευματοπάθειες , νευρολογικά νοσήματα και λοιμώξεις. Λόγω του ιδιαίτερου ενδιαφέροντός μου για την αντιμετώπιση των καρδιοπαθειών στην κύηση ,συνεργάστηκα στενά με εξειδικευμένους ιατρούς της Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αττικών» για την οργάνωση μιας από κοινού Κλινικής για τη παρακολούθηση των εγκύων με καρδιοπάθεια .Με τον τρόπο αυτό, ένας σημαντικός αριθμός κυήσεων με καρδιοπάθεια αντιμετωπίστηκε επιτυχώς , ενώ από το καλοκαίρι του 2008 η κλινική μας αποτελεί τη μόνη ελληνική συμμετοχή στο **European Registry of Heart Disease and Pregnancy**, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα του οποίου δημοσιοποιήθηκαν πρόσφατα ( Βαλένσια ,Μάρτιος 2010).

Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα δραστηριοποιούμαι στο τμήμα Ιατρικής Εμβρύου Ιατρικής και Υπερήχων της Γ' Μ/Γ Κλινικής , το οποίο λειτουργεί υπό τη διεύθυνση του καθηγητού κου Δ. Κασσάνου . Στα καθήκοντά ως ειδικής ερευνήτριας περιλαμβάνεται η παρακολούθηση κυήσεων , η εκτέλεση σε καθημερινή βάση μεγάλου αριθμού υπερηχογραφήμάτων , τόσο μαιευτικών όσο και γυναικολογικών και η παροχή συμβουλευτικής στους γονείς σε περιπτώσεις επιπλεγμένων περιστατικών.

Όσον αφορά στη μαιευτική υπερηχογραφία έχω εκπαιδευτεί στην εκτέλεση του συνόλου των διαγνωστικών εξετάσεων σε όλα τα στάδια της κύησης στις οποίες περιλαμβάνονται τα παρακάτω υπερηχογραφήματα : Αυχενικής διαφάνειας, β'



επιπέδου, Doppler και μέτρησης μήκους τραχήλου . Επίσης έχω εκπαιδευτεί να πραγματοποιώ αμνιοπαρακεντήσεις υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση. Τέλος, είμαι πιστοποιημένη και από το Fetal Medicine Foundation (FMF ID:94381) στην εκτέλεση του υπερηχογραφήματος αυχενικής διαφάνειας και μέτρησης μήκους τραχήλου.

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ**

Υποψήφια Διδάκτωρ της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με θέμα : «Ποσοτικές μεταβολές των VEGF και PlGF και HIF-1α σε πλακούντες γυναικών με σιδηροπενική αναιμία και σε ετεροζυγώτες της β-μεσογειακής αναιμίας . (Επιβλέπων : Καθηγητής Ι.Ε. Μεσσήνης).

Κάτοχος Μεταπτυχιακού Τίτλου στο αντικείμενο “Παθολογία της Κύησης” από το οποίο αποφοίτησα το Νοέμβριο του 2013 με βαθμό « Άριστα, 8.71/10 ». Το εν λόγω πρόγραμμα διοργανώνεται από τη Γ' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών ( Επιστημονικός Υπεύθυνος Ομ.Καθ. Ε.Ε.Σαλαμαλέκης). Η διάρκεια του προγράμματος είναι διετής.Ο τίτλος της διπλωματικής μου εργασίας ήταν “ Κύηση και Συγγενείς Καρδιοπάθειες”.

## **ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΙΩΝ**

1. Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρία (Τακτικό μέλος)
2. Ελληνική Εταιρία Υπερήχων στη Μαιευτική- γυναικολογία (Τακτικό μέλος)
3. Βρετανική Εταιρία Εμβρυομητρικής Ιατρικής (Τακτικό μέλος)

4. Ελληνική Εταιρία Κολποσκόπησης και Παθολογίας Τραχήλου
5. Ελληνική Εταιρία Εμβρυομητρικής Ιατρικής
6. Ευρωπαϊκής Εταιρίας Γυναικολογικής Ενδοσκόπησης

## **ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ**

Κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου στη Μαιευτική – Γυναικολογία στην Πανεπιστημιακή Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική συμμετείχα ενεργά σε όλες τις εκπαιδευτικές δραστηριότητες της Κλινικής, όπως μετεκπαιδευτικά μαθήματα, βιβλιογραφικές ενημερώσεις και εκπαιδευτικές συναντήσεις με κλινικές συναφών ειδικοτήτων. Επίσης, μέρος των αρμοδιοτήτων μου αποτελούσε και η εκπαίδευση των φοιτητών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και των ασκούμενων Μαιών του Τ.Ε.Ι. Μαιευτικής Λάρισας.

Κατά τη διάρκεια της μετεκπαίδευσής μου στο εξωτερικό συμμετείχα σε όλες τις εκπαιδευτικές δραστηριότητες των Νοσοκομείων Royal Brompton και Chelsea & Westminster καθώς και εκπαίδευση και αξιολόγηση των φοιτητών του Imperial College στο μάθημα της Μαιευτικής – Γυναικολογίας.

Στη Γ' Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Αττικών» συμμετέχω στην εκπαίδευση των φοιτητών του ΣΤ' έτους καθώς και των ειδικευόμενων ιατρών της κλινικής. Επίσης, στο τμήμα Υπερήχων στο οποίο δραστηριοποιούμαι, μετεκπαιδεύεται σε εξαμηνιαία βάση στη Μαιευτική-Γυναικολογική υπερηχογραφία σημαντικός αριθμός ειδικών Μαιευτήρων-Γυναικολόγων. Από το 2007 μέχρι και σήμερα έχω αποτελέσει μέλος της οργανωτικής επιτροπής όλων των συνεδρίων που οργανώθηκαν από τη Γ' Μαιευτική- Γυναικολογική Κλινική.

## ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ - ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- Μετάφραση από την Αγγλική στην Ελληνική γλώσσα και επιμέλεια έκδοσης του συγγράμματος « Καρδιοπάθειες και Κύηση » (Heart Disease and Pregnancy) των Ph. Steer, M. Gatzoulis και Ph. Baker .  
( Εκδοτικός Οίκος Γ. Παρισιάνου , 2009 )
- Εμβρυική ασφυξία: ορισμοί, αιτιολογικοί παράγοντες , δημογραφικά στοιχεία Πρακτικά επιστημονικής ημερίδας για την περιγεννητική ασφυξία, 2009
- Συγγραφή του κεφαλαίου “ Εντατική παρακολούθηση της βαρέως πάσχουσας εγκύου” , το οποίο περιλαμβάνεται στο Β' τόμο του συγγράμματος “ Παθολογία της κύησης” του Καθ. Ε. Σαλαμαλέκη (Εκδόσεις Mendor)

## ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ ΣΕ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

### 1. Καρδιοπάθειες και κύηση .

4<sup>ο</sup> Συμπόσιο Γ' Πανεπιστημιακής Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αττικόν» , Σεπτέμβριος 2007

### 2. The Obstetric – Cardiac Audit

Royal Brompton Hospital – Grand Round , Οκτώβριος 2007

### 3. Συμβουλευτική πριν τη σύλληψη σε γυναίκες με καρδιοπάθεια .

1<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής-Γυναικολογίας ,  
Ηράκλειο Κρήτης ,Απρίλιος 2008

**4. Φυσιολογικές μεταβολές κατά την κύηση,**

Μάιος 2009, Μετεκπαιδευτικά μαθήματα Γ'Μ/Γ ,Νοσοκομείο «Αττικόν».

**5. Εμβρυική δυσφορία : Ορισμοί ,Επιδημιολογικά στοιχεία ,Αιτιολογικοί παράγοντες.**

5<sup>η</sup> Διακλινική ημερίδα : Περιγεννητική ασφυξία – Δυσχέρειες στην εφαρμογή του μητρικού θηλασμού. Νοσοκομείο « Αττικόν», Δεκέμβριος 2009

**6. Congenital Heart Disease and Pregnancy- The Obstetrician's point of view**

1<sup>st</sup> Congenital Heart Disease Congress , Λεμεσός , Φεβρουάριος 2010.

**7. Συγγενείς Καρδιοπάθειες και Κύηση- η άποψη του Μαιευτήρα**

Σεμινάριο Ελληνικής Παιδοκαρδιολογικής Εταιρίας «Καρδιά και Κύηση», Αθήνα Ιούνιος 2010,

**8. Κύηση σε γυναίκες με συγγενή καρδιοπάθεια**

7<sup>ο</sup> Συμπόσιο Γ' Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής ,Νοσοκομείο «Αττικόν» ,  
Οκτώβριος 2010 .

**9. Έκθεση σε φάρμακα κατά την κύηση και καρδιακά ελλείματα**

15ο Καρδιολογικό Συνέδριο Κεντρικής Ελλάδος , Λάρισα , Οκτώβριος 2012.

**10. Ρευματοπάθειες και κύηση**

Δεκέμβριος 2012, Μετεκπαιδευτικά μαθήματα Γ'Μ/Γ ,Νοσοκομείο «Αττικόν».

**11. Υπέρταση, αρρυθμίες και κύηση**

Επιμορφωτικά Σεμινάρια Ειδικευομένων Καρδιολογίας 2011-12.Ελληνική Εταιρία  
Καρδιολογίας , Αθήνα ,Απρίλιος 2012

### **12.Κύηση σε γυναίκες με συγγενή καρδιοπάθεια, η άποψη του Μαιευτήρα**

Ομάδες Εργασίας Καρδιολογικής Εταιρίας , Θεσσαλονίκη, Φεβρουάριος 2013.

### **13. Κύηση σε γυναίκες με συγγενή καρδιοπάθεια.**

Μαιευτήριο ΓΑΙΑ , Μάρτιος 2014

## **ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Τεχνητής Διατροφής ,Πάτρα 11-13 Φεβρουαρίου 2000.
- 26<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο,Αθήνα 16-20 Μαΐου 2000.
- Larissa Symposia 27-28 Ιανουαρίου 2001.Παθολογικές καταστάσεις στην Κύηση
- 1<sup>ο</sup> Παιδιατρικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας ,30-31 Απριλίου 2001, Λάρισα
- 5<sup>η</sup> Επιστημονική Συνάντηση « Πρόληψη και έγκαιρη διάγνωση του γυναικολογικού καρκίνου», 25-27 Μαΐου 2001, Θεσσαλονίκη
- Research and Developments in fetal Medicine, 30/8-01/09 2001, London, UK
- Larissa Symposia Εμμηνόπαυση, σύγχρονα δεδομένα, 102 Δεκεμβρίου 2001, Λάρισα
- Μετεγχειρητικές συμφύσεις,σύγχρονα δεδομένα, 3 Απριλίου 2002, Θεσσαλονίκη.
- Larissa Symposia 1-2 Ιουνίου 2002, Γυναικολογική ενδοσκόπηση
- 1<sup>st</sup> World Congress in Fetal Medicine ,Αθήνα 28-30 Ιουνίου 2002.
- 2<sup>ο</sup> Παιδιατρικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας ,19-21 Απριλίου 2002, Λάρισα
- 2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Εμβρυομητρικής Ιατρικής , 20-21 Απριλίου 2002, Θεσσαλονίκη.
- Larissa Symposia ,Καρκίνος τραχήλου, νεώτερα δεδομένα ,15-15 Δεκεμβρίου 2002, Λάρισα.
- Advanced Course of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology,22-23 Φεβρουαρίου 2003, Αθήνα
- Larissa Symposia 4-5 Οκτωβρίου 2003. Σύγχρονα δεδομένα στον Προγεννητικό έλεγχο

- Σεμινάριο Αυχενικής Διαφάνειας, 14 Φεβρουαρίου 2004, Λάρισα
- Transvaginal endoscopy-The art and Science. Seminar and Workshop on Hysteroscopy and Seminar on Transvaginal Laparoscopy, 4-7 Μαρτίου 2004, Λάρνακα, Κύπρος
- 4<sup>ο</sup> Παιδιατρικό Συμπόσιο Κεντρικής Ελλάδας ,27-28 Απριλίου Μαρτίου 2004, Λάρισα
- Larissa Symposia Νέες Εξελίξεις στην ART, 3-4 Απριλίου 2004, Λάρισα.
- Larissa Symposia,Οικογενειακός Προγραμματισμός-Αντισύλληψη, 2-3 Οκτωβρίου 2004, Λάρισα.
- 2<sup>η</sup> Μετ/κη συνάντηση Μαιευτικής- Γυναικολογίας «καρδιοτοκογραφία», 19 Απριλίου 2005, Αθήνα
- Congenital Heart Disease in the Adult, 25-27 September , 2006 , London, UK.
- Fetal Echocardiography for the Obstetrician and Sonographer, 26- 27 October 2006 , Imperial College, London , UK.
- Cardiac Disease and Pregnancy , 20 November 2006 , Royal College of Obstetricians and Gynecologists, London , UK.
- Fetal Medicine Foundation , The theoretical Course , 27- 28 January 2007, London , UK.
- Obstetric Emergency Training Day , 28 March 2007 , Chelsea & Westminster Hospital , London , UK
- 4<sup>ο</sup> Συμπόσιο Γ' Πανεπιστημιακής Μαιευτικής – Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αττικών» , 15 Σεπτεμβρίου 2007
- Medical Complications in Pregnancy, 3-5 October 2007 ,Imperial college London , UK
- Larissa Symposia , Σύγχρονα δεδομένα για τον προγεννητικό έλεγχο, 10-11 Νοεμβρίου 2007, Λάρισα.
- Λοιμώξεις κατά την κύηση, 15 Δεκεμβρίου 2007, αθήνα
- Ενδοσκοπικό σεμινάριο στη Γυναικολογία, 23 Φεβρουαρίου 2008, Αθήνα
- 5<sup>ο</sup> Ενδοσκοπικό σεμινάριο Ενδοσκόπησης,29 Φεβρουαρίου-1 Μαρτίου 2008, Ιασώ
- Larissa Symposia ,Ουρογεννητικά προβλήματα,29-30 Μαρτίου 2008, Λάρισα
- 1<sup>ο</sup> Παγκρήτιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Μαιευτικής – Γυναικολογίας, 12-13 Απριλίου 2008, Ηράκλειο.
- 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Εμβρυομητρικής Ιατρικής 16-18 Μαΐου 2008, Βόλος
- Πρακτικό Σεμινάριο, θεραπεία CIN ,29 Μαΐου 2008, Αθήνα.

- 6<sup>ο</sup> Ευρωπαϊκό Σεμινάριο Κολποσκόπησης και Παθολογίας Τραχήλου, 30-31 Μαΐου 2008
- Twin pregnancy, a global perspective, 1<sup>st</sup> world Congress, 16-18 April 2008 , Venice, Italy
- 20<sup>th</sup> International Congress on thrombosis ,June 25-28 2008, Athens
- Pediatric and Adult International Cardiac symposium , 20-23 July 2008, Las Vegas,USA .
- 4<sup>η</sup> Διακλινική Ημερίδα «Προωρότητα», 13 Δεκεμβρίου 2008.Αθήνα
- Athens Obstetrical Forum, 3 Φεβρουαρίου 2009, Αθήνα
- Ιατρική μητέρας-εμβρύου, 25 Απριλίου 2009, Αθήνα.
- Ενδοκρινολογικά θέματα στη Μαιευτική – Γυναικολογία, 14 Νοεμβρίου 2009, Αθήνα
- 5<sup>η</sup> Διακλινική ημερίδα : Περιγεννητική ασφυξία – Δυσχέρειες στην εφαρμογή του μητρικού θηλασμού. Νοσοκομείο « Αττικών», Δεκέμβριος 2009
- 1<sup>st</sup> Congenital Heart Disease Congress , Λεμεσός , Φεβρουάριος 2010.
- XXIIInd European Congress on Perinatal Medicine, May 26-29, Granada, Spain
- 7<sup>ο</sup> Συμπόσιο Γ΄ Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής ,Νοσοκομείο «Αττικών» , Οκτώβριος 2010

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Έκβαση της Κύησης σε γυναίκες με σύνδρομο Marfan  
Μιχαλίτση Β, Σταθοπούλου Β, Σιάσου Ζ, Σιούλας Β, Σαλαμαλέκης Ε.  
5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Εμβρυομητρικής Ιατρικής  
16-18 Μαΐου 2008, Βόλος
- Ταυτόχρονη εμφάνιση προεκλαμψίας, χολόστασης της κύησης και εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης κατά το 3<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης , αναφορά περιστατικού  
Μιχαλίτση Β, Κρεατσά Μ, Λυκάκης Α,Χρέλιας Χ, Σαλαμαλέκης Ε.  
5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Εμβρυομητρικής Ιατρικής  
16-18 Μαΐου 2008, Βόλος
- Θεραπευτική αντιμετώπιση εμβρυικού υδροθώρακα με τοποθέτηση θωρακοαμνιακής παροχέτευσης .Αναφορά περιστατικού, βιβλιογραφική ανασκόπηση.  
Κασσάνος Δ, Νικολαΐδου Μ, Μιχαλίτση Β, Σαλαμπάσης Κ, Κανελόπουλος Β,

Σαλαμαλέκης Ε.

- 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Εμβρυομητρικής Ιατρικής  
16-18 Μαΐου 2008, Βόλος
- Outcome of twin pregnancies after spontaneous conception and after IVF, the greek experience  
Michalitsi V, Makris G.M., Stathopoulou V, Patsouras C, Kassanos D, Salamalekis E.  
Twin pregnancy, a global perspective, 1<sup>st</sup> world Congress, 16-18 April  
2008, Venice, Italy.
- Υπερηχογραφική διάγνωση σύνθετης διαταραχής του κατώτερου ουροποιητικού  
συστήματος άρρενος εμβρύου  
Κασσάνος Δ, Σαλαμαλέκης Γ, Χιντιπάς Η, Γραμματικάκης Ι, Μιχαλίτση Β, Χρέλιας Χ,  
Λόγης Κ.  
2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο υπερήχων στη Μαιευτική Γυναικολογία, 9-11 Μαΐου 2008,  
Θεσσαλονίκη.
- Outcome of pregnancy in women with Marfan's syndrome and mechanical prosthetic heart  
valves  
Michalitsi V, Karanikolopoulos P, Patsouras C, Salamalekis E, Kassanos  
D. 20<sup>th</sup> International Congress on thrombosis, June 25-28 2008, Athens.
- Απόψεις των εγκύων γυναικών για τη διακοπή της κύησης σε περίπτωση εμβρυικής  
ανωμαλίας  
Σούκα Α, Μιχαλίτση Β, Σκέντου Χ, Μεσσήνης Ι, Σαλαμαλέκης Ε, Κασσάνος Δ.  
11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής- Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2009, Αθήνα.
- Επιτυχημένη τελειόμηνη κύηση σε γυναίκα με ομάζυγο β-μεσογειακή αναιμία  
επιπλεγμένη με επίκτητη ανοσοανεπάρκεια .περιγραφή περίπτωσης και ανασκόπηση  
βιβλιογραφίας.  
Χιντιπάς Η, Μιχαλίτση Β, Γραμματικάκης Ι, Παππάς Α, Χρέλιας Χ.  
11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής- Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2009, Αθήνα
- Ελονοσία στην κύηση  
Μιχαλίτση Β, Μακρής Γ.Μ. Χιντιπάς Η, Σκάρπας Π, Κασσάνος Δ  
11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής- Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2009, Αθήνα.



- Attitudes of women regarding termination of pregnancy  
Souka A, Michalitsi V, Skentou C, Messinis E, Kassanos D, Salamalekis E. 8<sup>th</sup> FMF World Congress , 26-30 June 2009, Portorose, Slovenia
- Μήκος τραχήλου μήτρας κατά την εξέλιξη της κύησης. Προκαταρκτικά αποτελέσματα  
Παπαστεφάνου Ι, Σούκα Α, Σαλαμπάσης Κ, Μιχαλίτση Β, Κασσάνος Δ.  
6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Εμβρυομητρικής Ιατρικής 14-16 Μαΐου 2010, Μέτσοβο.
- Στένωση μιτροειδούς ή πνευμονικής βαλβίδας και κύηση.  
Σταθοπούλου Β, Σιάσου Ζ, Μιχαλίτση Β, Γκουνάρα Ε, Συριστατίδης Χ, Κασσάνος Δ.  
6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Εμβρυομητρικής Ιατρικής 14-16 Μαΐου 2010, Μέτσοβο.
- Percutaneous balloon valvuloplasty during pregnancy. Maternal and fetal outcome.  
Michalitsi V, Stathopolou V, Thanopoulos V, Antoniadis A, Frogoudaki A, Kassanos D  
XXII<sup>nd</sup> European Congress on Perinatal Medicine, May 26-29, Granada, Spain
- Management and outcome of cardiomyopathy in pregnancy  
Michalitsi V, Bassios G, Frogoudaki A, Souka A, Chrelas C, Kassanos D.  
XXII<sup>nd</sup> European Congress on Perinatal Medicine, May 26-29, Granada, Spain.
- Prediction of short cervix at 22 weeks.  
Souka A, Papastefanou I, Michalitsi V, Salambasis C, Kassanos D.  
9<sup>th</sup> FMF World Congress, 20-24 June 2010, Rhodes
- Μελέτη του μήκους του τραχήλου της μήτρας στο 1<sup>ο</sup> και 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης.  
Σούκα Α, Παπαστεφάνου Ι, Μιχαλίτση Β, Σαλαμπάσης Κ, Κασσάνος Δ.  
3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο υπερήχων στη Μαιευτική Γυναικολογία, 10-12 Δεκεμβρίου 2010, Αθήνα.
- Μοντέλο πρόβλεψης κοντού τραχήλου στις 20-24 εβδομάδες της κύησης με το συνδυασμό μήκους τραχήλου πρώτου τριμήνου και μαιευτικού ιστορικού.  
Σούκα Α, Παπαστεφάνου Ι, Μιχαλίτση Β, Χρέλιας Χ, Κασσάνος Δ.  
3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο υπερήχων στη Μαιευτική Γυναικολογία, 10-12 Δεκεμβρίου 2010, Αθήνα.

## ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Attitudes of pregnant women towards termination of pregnancy for fetal abnormality  
Souka AP, Michalitsi VD, Skentou H, Evripioti H, Papadopoulos GK, Kassanos D, Messinis IE, Salamalekis E.  
Prenat Diagn. 2010 Oct ; 30(10):977-80.
- A predictive model of short cervix at 20-24 weeks using first trimester cervix length measurement and maternal history.  
Souka AP, Papastefanou I, Michalitsi V, Papadopoulos GK, Kassanos D.  
Prenat Diagn 2011 Feb; 31(2):203-6 .
- Cervical length changes from the first to second trimester of pregnancy, and prediction of preterm birth by first trimester sonographic cervical measurement.  
Souka AP, Papastefanou I, Michalitsi V, Salambasis K, Chrelias C, Salamalekis G, Kassanos D. J Ultrasound Med 2011 Jul ;30 (7):997-1002.
- Performance of third trimester ultrasound for the prediction of the small for gestation fetus and evaluation of contingency screening policies.  
Souka AP, Papastefanou I, Pilalis A, Michalitsi V, Kassanos D. Ultrasound Obstet Gynecol 2011 Aug
- First trimester prediction of small and large for gestation neonates by an integrated model incorporating ultrasound parameters, biochemical indices and maternal characteristics  
Papastefanou I, Souka AP, Pilalis A, Eleftheriades M, Michalitsi V, Kassanos D .  
Acta Obstet Gynecol Scand 2011 Sep 5
- Third trimester ultrasound for the prediction of the large for gestational age fetus in low risk population and evaluation of contingency strategies  
Pilalis A, Souka A, Papastefanou I, Michalitsi V, Panagopoulos P, Chrelias C, Kassanos D.  
Prenat Diagn. 2012 Sep; 32(9): 846-53.
- Performance of the ultrasound examination in the early and late third trimester for the prediction of birthweight deviations.  
Souka AP, Papastefanou I, Pilalis A, Michalitsi V, Panagopoulos P, Kassanos D.  
Prenat Diagn 2013 Oct;33(10):915-20

- Specific formulas improve the estimation of fetal weight by ultrasound scan  
Souka AP, Papastefanou I, Pilalis A, Michalitsi V, Kassanos D.  
J Matern Fetal Neonatal Med 2014 May; 27(7):737-42.
- Hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) expression in placentae of women with iron deficiency anemia and  $\beta$ -thalassemia trait.  
Michalitsi V, Dafopoulos K, Gourounti K, Messini C, Ioannou M, Christodoulaki C, Panagopoulos P, Messinis I.  
J Matern Fetal Neonatal Med 2014 June 4; 1-5.

## **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Άριστη γνώση της Αγγλικής, Γαλλικής και Ιταλικής γλώσσας και πολύ καλή γνώση της Γερμανικής και Ισπανικής.







