

**Β' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΘΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ. ΚΡΕΑΤΣΑΣ**

**ΝΕΟΓΝΟΛΟΓΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΜΑΛΑΜΙΤΣΗ-ΠΟΥΧΝΕΡ**

**ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ (ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ,
ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ) ΣΤΟ
ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΤΡΙΜΗΝΟΥ ΚΥΗΣΗΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΘΑΛΗΣ-ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΑΠΑΠΟΣΤΟΛΟΥ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2013

**Στους γονείς μου
και στην Καθηγήτρια Α.Μαλαμίτση-Πούχερ**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Ι.ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	13
1. ΟΡΙΣΜΟΣ	
2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	
3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	
4. ΣΤΑΔΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	
5. ΡΟΛΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	
6. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ-ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	
6.1 ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΓΟΝΤΑΣ (VEGF)-ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (PIGF)	
6.2 ΙΝΟΒΛΑΣΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (FGF)	
6.3 ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΕΣ	
6.4 ΑΛΛΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	
7. ΕΙΔΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	
7.1 ΕΚΒΛΑΣΤΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	
7.2 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΕΓΚΟΛΕΑΣΜΟ	
8. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	
9. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ - ΜΙΑ ΣΥΝΤΟΜΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ	
10. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΕΜΜΗΝΟΡΥΣΙΑΚΟ ΚΥΚΛΟ	

11. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΣΤΗΝ ΜΕΤΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ

12. ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑΚΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

13. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

13.1 ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ (21η-32η ΗΜΕΡΑ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΥΛΛΗΨΗ)

13.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΔΙΚΤΥΟΥ (32Η ΗΜΕΡΑ ΩΣ 25Η ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΥΛΛΗΨΗ)

13.3 ΜΗ ΔΙΑΚΛΑΔΩΤΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ (24-25 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΥΛΛΗΨΗ ΕΩΣ ΤΕΛΟΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ)

II. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....35

1. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΙΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΥΗΣΕΙΣ

2. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

3. ΑΝΩΜΑΛΗ ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑΣ

4. ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΗΣΗ

III. ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ.....46

1. ΟΡΙΣΜΟΣ - ΣΥΣΤΑΣΗ

2. ΡΟΛΟΣ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΥΓΡΟΥ - ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΗΛΙΚΙΑ ΚΥΗΣΗΣ

IV. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ – ΜΕΛΕΤΕΣ.....50

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	59
II. ΥΠΟΘΕΣΗ-ΣΚΟΠΟΣ.....	59
III. ΥΛΙΚΟ- ΜΕΘΟΔΟΣ.....	60
IV. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	61
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	62
VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
VII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
VIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ.....	70
IX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	90

ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: **Θαλής Κωνσταντίνος Παπαποστόλου**

Ημερομηνία γέννησης: **12-6-1979**

Τόπος γέννησης: **Αθήνα**

Υπηκοότητα: **Ελληνική**

Διεύθυνση οικίας: **Νιόβης 3, 15237, Φιλοθέη**

Τηλέφωνα οικίας: **210 6727700**

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: thalispapapostolou@gmail.com

2. ΠΑΡΟΥΣΑ ΘΕΣΗ (1/9/12-31/3/13)

- Εξειδικευόμενος στο τμήμα Ενδοσκοπικής Γυναικολογικής Χειρουργικής και Υπογονιμότητας, Μαιευτικό-Γυναικολογικό Τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ουαλίας, Κάρντιφ (University Hospital of Wales).

3. ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ

- Τρίμηνη Εκπαίδευση στο Γ.Ν.Ν. Βόλου ως έμμισθος εσωτερικός βοηθός στην Παθολογική, Καρδιολογική και Χειρουργική Κλινική (1/8/2006-31/10/2006)
- Αγροτικός Ιατρός στο Π.Ι. Αερινού Μαγνησίας με εφημερίες στο Κέντρο Υγείας Βελεστίνου

4. ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

Εγκύκλιες σπουδές:

1991-1997 Ελληνοαμερικανικό Κολλέγιο Αθηνών-Ψυχικού

Προπτυχιακή εκπαίδευση

1998-2005 Ιατρική Σχολή, 1^ο Πανεπιστήμιο Ρώμης, « La Sapienza»

Εισαγωγή κατόπιν εξετάσεων. Βαθμός Πτυχίου: « Λίαν Καλώς »

Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος

2006 Νομαρχία Αθηνών

Μεταπτυχιακή εκπαίδευση

- 1/11/2007-31/10/2008 Ειδικευόμενος στο τμήμα Μαιευτικής - Γυναικολογίας Νοσοκομείου « Simone Veil» , Montmorency, Παρίσι (Διευθύντρια Κα Joclyne Morvan)

-1/11/2008- 1/5/2009 Ειδικευόμενος στο τμήμα Γενικής Χειρουργικής Νοσοκομείου Σητείας –Κρήτης (Διευθυντής Κος Γεώργιος Δελημπαλαδάκης)

-2/5/2009-31/1/2010 Ειδικευόμενος στο τμήμα Μαιευτικής-Γυναικολογίας Νοσοκομείου « Simone Veil» , Montmorency, Παρίσι (Διευθύντρια Κα Joclyne Morvan)

-15/2/2010-15/1/2011 Ειδικευόμενος στο Τμήμα Μαιευτικής-Γυναικολογίας Νοσοκομείου « St Mary's Hospital », Manchester, Ηνωμένο Βασίλειο

-17/1/2011-31/7/2011 Ειδικευόμενος στο Τμήμα Μαιευτικής-Γυναικολογίας Νοσοκομείου « Royal Derby Hospital», Derby, Ηνωμένο Βασίλειο

- 3/9/2011 – 31/3/2013 Ειδικευόμενος στο Τμήμα Μαιευτικής-Γυναικολογίας Νοσοκομείου « University Hospital of Wales », Cardiff, Wales, Ηνωμένο Βασίλειο.

Τίτλος Ειδίκευσης

2012 Μαιευτική-Γυναικολογία (κατόπιν εξετάσεων)

Άδεια Ασκήσεως Ιατρικής Ειδικότητας:

2012 Νομαρχία Λάρισας

Διδακτορική Διατριβή

2007-2013 «Αγγειογενετικοί Παράγοντες (VGEF,PIGF) στο αμνιακό υγρό δευτέρου τριμήνου κύησης». Νεογνικό Τμήμα, Β΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μεταπτυχιακή Εκπαίδευση – Σεμινάρια

2103: Male Fertility Study days, London, British Fertility Society

2013: IUI and Embryo Transfer Study, London, British Fertility Society

2011: Colposcopy Course , Cardiff, RCOG

2011: Doppler Ultrasound in Clinical Obstetrics, RCOG, London

2011: Pelvic Ultrasound Certification, British Fertility Society, London, UK

2010: MRCOG Part 1, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, UK

2010: ALSO (Advanced life support in Obstetrics), Αρεταίειο Νοσοκομείο

2009: Diplome de Contraception (Δίπλωμα Αντισύλληψης) Ιατρική Σχολή Pierre et Marie Curie, Paris 7 (Dr. Serfaty)

2009: Grossesses Gemellaires (Δίδυμες Κυήσεις), Cochin Hospital, Port Royal, Paris

2009: Emergency Ultrasound of Trauma Ευγενίδειο Ίδρυμα, Αθήνα, Ελλάδα

Μετεκπαίδευση στο εξωτερικό

9/2011 – 8/2012: Clinical Fellow (Registrar) in Obstetrics-Gynaecology working in the Gynae Oncology team. University Hospital of Wales (Supervisor: Mr Lim)

9/2012- 4/2013 Clinical Fellow (Registrar) in Obstetrics-Gynaecology working in the Endometriosis and Infertility Team (Supervisor: Mr Griffiths)

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά, Γαλλικά, Ιταλικά

5. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

A. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- Midtrimester amniotic fluid concentrations of angiogenic factors in relation to maternal, gestational and neonatal characteristics in normal pregnancies

Papapostolou T, Briana DD, Boutsikou M, Iavazzo C, Puchner KP, Gourgiotis D, Marmarinos A, Malamitsi-Puchner A.
J Matern Fetal Neonatal Med. 2013 Jan;26(1):75-8

-Oral progestogens vs levonorgestrel-releasing intrauterine system for endometrial hyperplasia: a systematic review and metaanalysis.

Gallos ID, Shehmar M, Thangaratinam S, Papapostolou TK, Coomarasamy A, Gupta JK.
Am J Obstet Gynecol. 2010 Dec; 203(6):547:1-10

B. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΑ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1) Midtrimester amniotic fluid concentrations of angiogenic factors in relation to maternal, gestational and neonatal characteristics in normal pregnancies

Papapostolou T, Briana DD, Boutsikou M, Iavazzo C, Puchner KP, Gourgiotis D, Marmarinos A, Malamitsi-Puchner A.

-XXIII European Congress of Perinatal Medicine, Paris, France, 13-16/6/2012 – Oral Presentation

-11th World Congress in Fetal Medicine, Kos, Greece , 24-28/6/2012 – Poster Presentation

2) Deadly injuries in the regions of Hrakleion and Lasithi of Crete.

T.Papapostolou, G. Delimpaltadakis

5th Congress of Trauma and Emergency Surgery, 16-21/2009, Athens, Greece – Oral Presentation

3) Difficult airway.

T. Papapostolou, G. Delimpaltadakis

5th Congress of Trauma and Emergency Surgery, 16-21/2/2009, Athens, Greece –

Poster Presentation

4) Atypical endometrial hyperplasia: A correlation with pathological findings on hysterectomy specimens

T. Papapostolou, I. Gallos

13th World Congress of Gynaecological Endocrinology, 28/2-2/32008, Florence, Italy

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της διδακτορικής αυτής διατριβής, την Καθηγήτρια Παιδιατρικής και Νεογνολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Αριάδνη Μαλαμίτση - Πούχγερ. Θα ήθελα να της εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στην για την ανεκτίμητη συμπαράσταση, καθοδήγηση και υπομονή που μου έδειξε από την αρχή του παρόντος έργου μέχρι και σήμερα. Η πολύτιμη συμβολή της ήταν και είναι καθοριστική στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή και Διευθυντή της Β' Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Γεώργιο Κρεατσά, που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω αυτή τη διδακτορική διατριβή στην Κλινική του.

Επίσης, θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς Εισηγητικής Επιτροπής:

Τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ν. Βιτωράτο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δ. Χασιάκο.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Γουργιώτη, Διευθυντή των Ερευνητικών Εργαστηρίων της Β' Παιδιατρικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου πραγματοποιήθηκε όλο το εργαστηριακό μέρος της μελέτης.

Επίσης, επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες μου στην Παιδίατρο-Νεογνολόγο εκλεγμένη Επίκουρη Καθηγήτρια κ Δ. Μπριάνα, η οποία με τη μεγάλη εμπειρία της με βοήθησε στη δημοσίευση του άρθρου, που προήλθε από αυτή τη διατριβή, και μου έδωσε χρήσιμες συμβουλές για την συγγραφή της διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ τέλος την Βιοστατιστικό-Ιατρό κ. Μαρία Μπούτσικου, για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της διατριβής.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

1. ΟΡΙΣΜΟΣ – ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η αγγειογένεση είναι ο σχηματισμός νέων αγγείων από προυπάρχοντα (1). Το αίμα, που ρέει μέσα στα αιμοφόρα αγγεία, μεταφέρει στους ιστούς το οξυγόνο και τα διάφορα θρεπτικά συστατικά, ενώ απάγει το διοξείδιο του άνθρακα και τα μεταβολικά προϊόντα για να αποβληθούν. Παρόντα στο αίμα είναι πάντοτε τα κυτταρικά στοιχεία που συμβάλλουν στις λειτουργίες του.

Η αγγειογένεση παρατηρείται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Οι πρώτες αφορούν στην ανάπτυξη του εμβρύου, στην επούλωση πληγών αλλά και στην έμμηνο ρύση κατά τον επανασχηματισμό του ενδομητρίου. Οι δεύτερες παρουσιάζονται σαν ανεξέλεγκτη και συνεχή αγγειογένεση σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Στην αρθρίτιδα για παράδειγμα, νέα αιμοφόρα τριχοειδή αγγεία εισβάλλουν στις αρθρώσεις και καταστρέφουν το χόνδρο. Στον σακχαρώδη διαβήτη, νεόπλαστα τριχοειδή αγγεία του αμφιβληστροειδούς θραύονται και αιμορραγούν προς το υαλώδες σώμα με συνέπεια την τύφλωση του ασθενούς. Η οφθαλμική αγγειογένεση είναι η πιο κοινή αιτία τύφλωσης και παρατηρείται σε περισσότερες από είκοσι οφθαλμικές νόσους (2). Στην ογκογένεση η αγγειογένεση παρατηρείται σε μεγάλο βαθμό (3). Άλλωστε, η αύξηση των όγκων προϋποθέτει τη δημιουργία νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Τέλος και άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση και η ψωρίαση εμπλέκουν την αγγειογένεση.

Η φυσιολογική αγγειογένεση διαρκεί περιορισμένο χρόνο, όπως μερικές ημέρες κατά τη διάρκεια του εμμήνου κύκλου ή μερικές εβδομάδες κατά την επούλωση πληγών. Αντίθετα, η παθολογική αγγειογένεση μπορεί να διαρκέσει χρόνια (3).

Τα αγγεία ανάλογα με τη δομή και λειτουργία τους διακρίνονται σε αρτηρίες, τριχοειδή και φλέβες. Υπάρχουν δύο τύποι δημιουργίας αγγείων: Η αγγειογένεση (angiogenesis) και η νεοαγγειογένεση (vasculogenesis). Η αγγειογένεση είναι η δημιουργία νέων αγγείων από προυπάρχοντα ενώ η νεοαγγειογένεση είναι ο de novo σχηματισμός αγγείων (1).

2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Όταν δημιουργηθεί το κυρίως αγγειακό πλέγμα μέσω της διαδικασίας της νεοαγγειογένεσης, τότε νέα τριχοειδή αγγεία μπορούν να δημιουργηθούν από τα προυπάρχοντα μέσω της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Οι δύο μηχανισμοί μέσω των οποίων μπορεί να γίνει η αγγειογένεση είναι είτε η εκβλάστηση (sprouting) είτε η διάσπαση (splitting) των ήδη υπαρχόντων αγγείων. Η εκβλαστική αγγειογένεση είναι πιθανώς συνέπεια της υποξίας, καθώς ενεργοποιείται η έκφραση διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό των αγγείων και την ωρίμανσή τους, όπως η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και η αγγειοποιητίνη-2. Εξάλλου το χαμηλό pH, η μη φυσιολογική υδροστατική πίεση και οι καταστάσεις στρες είναι αιτίες που επηρεάζουν το σχηματισμό, την ωρίμανση και τη διαφοροποίηση μικρών και μεγάλων αγγείων στα πλαίσια φυσιολογικών διαδικασιών. Δεύτερος μηχανισμός είναι η διάσπαση διατριχοειδικών τμημάτων (στηλών) ή τμημάτων του εξωκυττάρου υλικού. Η διαδικασία παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στον εμβρυικό πνεύμονα. Η αγγειογένεση με διάσπαση συντελείται με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσα σε ένα αγγείο όπου και παράγεται ένας ευρύς αυλός. Στη συνέχεια ακολουθεί διάσπαση διατριχοειδικών τμημάτων ή σύντηξη του αυλού με προυπάρχοντα αγγεία και διάσπασή τους σε τριχοειδή (4,5,6,7).

3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από τα πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων, τους αγγειοβλάστες. Η διαδικασία της νεοαγγειογένεσης λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Οι αγγειοβλάστες προέρχονται από το μεσόδερμα. Τα πρόδρομα αυτά κύτταρα μεταναστεύουν, διαφοροποιούνται και πολλαπλασιάζονται σε έναν ιστό σχηματίζοντας ένα αγγειακό πλέγμα. Στη συνέχεια, σχηματίζουν διαύλους, που λαμβάνουν την ακριβή τοποθεσία των μελλοντικών αγγείων. Από τη στιγμή που έχει διαμορφωθεί αυτός ο σχηματισμός, το ενδοθήλιο περιβάλλεται από βασική μεμβράνη, λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα και έτσι αποκτά τη μορφή των ώριμων αγγείων. Η διαδικασία της νεοαγγειογένεσης ελέγχεται από την οικογένεια του αυξητικού παράγοντα VEGF και των υποδοχέων του (8).

4. ΣΤΑΔΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από αγγειογενετικό ερέθισμα προκαλεί την έναρξη μιας σειράς από μορφολογικά και βιοχημικά γεγονότα που οδηγούν στο σχηματισμό νέων αγγείων.

1) Αγγειοδιαστολή του υπάρχοντος αγγείου.

Το υπάρχον αγγείο από το οποίο θα γεννηθεί ένας νέος κλάδος (νέο τριχοειδές) είναι συνήθως ένα μικρό φλεβίδιο ή ένα ολοκληρωμένο τριχοειδές. Αυτό το αγγείο υφίσταται παρατεταμένη διαστολή πριν την έναρξη της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Πιθανώς, με την αγγειοδιαστολή τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτείνονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία τους στους διάφορους παράγοντες ανάπτυξης (9).

2) Αποδόμηση των βασικών μεμβρανών του υπάρχοντος αγγείου.

Ένας αγγειογενετικός παράγοντας όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες εκκρίνεται και δεσμεύεται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διεγείρομενα από τα μόρια αυτά αυξάνουν την παραγωγή τους σε ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και σε κολλαγενάσες. Ο πιθανός ρόλος του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου είναι να αναστείλει τη θρόμβωση στο νεοσχηματιζόμενο άκρο του τριχοειδούς πριν ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του και πριν αρχίσει η ροή του αίματος. Επίσης, καταλύει τη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Η πλασμίνη ενεργοποιεί την ανενεργό μορφή της κολλαγενάσης. Η κολλαγενάση με τη σειρά της αποδομεί τη βασική μεμβράνη του αγγειακού τοιχώματος. Στη διαδικασία της αγγειογένεσης συνεισφέρουν εκτός από τα ίδια τα πρωτεολυτικά ένζυμα και τα προϊόντα αποδόμησης των βασικών μεμβρανών και του ινώδους πλέγματος. Η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα που χαρακτηρίζει αυτό το στάδιο έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ινώδους πλέγματος στον εξωαγγειακό χώρο (10).

3) Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Μετά την τοπική αποδόμηση και τη δημιουργία οπών στη βασική μεμβράνη του υπάρχοντος αγγείου τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση αγγειογενετικού ερεθίσματος αυξάνουν τον αριθμό των οργανιδίων τους και σχηματίζουν προεξοχές στην επιφάνειά τους (ψευδοπόδια). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που ελευθερώνονται από τις αποδομημένες βασικές μεμβράνες εκτίθενται στα κολλαγόνα τύπου I και II, την ινονεκτίνη και τη βινκουλίνη, που είναι παράγοντες που σχετίζονται με τη

μετανάστευση. Αυτή η διαδικασία αποτελεί παράδειγμα χημειοταξίας in vivo. Το ινώδες πλέγμα παίζει ρόλο στο σχηματισμό των νέων τριχοειδών διακλαδώσεων, ειδικά όταν η αγγειογένεση προκαλείται από φλεγμονώδη αίτια ή κατά την ανάπτυξη καρκινικού όγκου.

4) Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματισμός αυλού.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν τον αυλό των νέων αγγείων.

5) Σχηματισμός της νέας βασικής μεμβράνης.

Το τελικό στάδιο κατά τη μεταλλαγή ενός εξελισσόμενου τριχοειδούς σε ένα ολοκληρωμένο τριχοειδές είναι η εναπόθεση της νέας βασικής μεμβράνης που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ινονεκτίνη είναι το πρώτο από τα συστατικά των βασικών μεμβρανών που εμφανίζεται, ενώ ακολουθεί η λαμινίνη και τελικά το κολλαγόνο τύπου IV(10).

6) Ενσωμάτωση περικυττάρων και λείων μυικών κυττάρων στο νέο τριχοειδές αγγείο.

Τα περικύτταρα συναθροίζονται και συνδέονται στενά στην επιφάνεια των νεοσχηματιζόμενων τριχοειδών. Τα περικύτταρα έλκονται προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από το ενδοθήλιο. Τα περικύτταρα και τα λεία μυικά κύτταρα στηρίζουν δομικά τα νέα αγγεία.

7) Ωρίμανση των νέων αγγείων.

Οι άκρες παράλληλα αυξανόμενων τριχοειδικών διακλαδώσεων αναστομώνονται και σχηματίζουν κυκλικά τριχοειδή, μέσα στις οποίες αρχίζει να πραγματοποιείται η αιματική ροή. Τα κυκλικά αυτά τριχοειδή, καθώς επιμηκύνονται συγκλίνοντας προς το αγγειογενετικό ερέθισμα, είναι δυνατόν να αποτελέσουν την απαρχή νέων διακλαδώσεων. Η ωρίμανση των νέων αγγείων θα ολοκληρωθεί με την έναρξη της ροής του αίματος (11).

5) ΡΟΛΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η αγγείωση του ενήλικα προέρχεται από ένα δίκτυο αιμοφόρων αγγείων που αρχικά σχηματίζεται στο έμβρυο μέσω της νεοαγγειογένεσης όπου αγγεία σχηματίζονται de novo από ενδοθηλιακά πρόδρομα κύτταρα, τους αγγειοβλάστες (11). Οι αγγειοβλάστες πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν ένα πρωτογενές δίκτυο αγγείων, γνωστό σαν το τριχοειδές πρωτογενές πλέγμα. Αυτό χρησιμεύει για την έναρξη της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Μετά το σχηματισμό του πρωτογενούς τριχοειδούς δικτύου, αυτό ανασηματίζεται μέσω εκβλάστησης και διακλάδωσης νέων αγγείων από προυπάρχοντα στη διαδικασία της αγγειογένεσης.

Η φυσιολογική αγγειογένεση συμβαίνει ως επί των πλείστων στο έμβρυο, όπου εγκαθίσταται το πρωτογενές αγγειακό δέντρο καθώς και η κατάλληλη αγγείωση για τα αυξανόμενα και αναπτυσσόμενα όργανα (12).

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αγγειογένεση θετικά και αρνητικά. Ανάμεσα σ' αυτούς είναι τα διαλυτά πολυπεπίδια, αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και μεταξύ κυττάρων και στρώματος. Οι διαλυτοί αυξητικοί αγγειογενετικοί παράγοντες που μεσολαβούν στη δράση αυτών των ερεθισμάτων συνοψίζονται στη συνέχεια.

6. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ-ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

6.1 ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (VEGF) - ΠΛΑΚΟΥΝΤΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (PlGF)

Ο πιο γνωστός αγγειογενετικός παράγοντας είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Έχουν βρεθεί 6 ισομορφές του VEGF που αποτελούνται από 121,145,165,183,189 και 206 αμινοξέα αντίστοιχα. Ο VEGF165 είναι η πιο κοινά εκφραζόμενη μορφή (13).

Παρότι όλες οι ισομορφές παρουσιάζουν τις ίδιες βιολογικές ιδιότητες, οι VEGF121 και VEGF165 εκκρίνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον, ενώ οι VEGF189 και VEGF206 παραμένουν συνδεδεμένοι με το κύτταρο ή το στρώμα. Ο VEGF είναι μία διθειϊκή διμερική γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 34-45 kDa, που χάνει την βιολογική του δραστηριότητα παρουσία κάποιων παραγόντων.

Ευρεία ποικιλία ανθρώπινων ιστών εκφράζει χαμηλά επίπεδα VEGF, ενώ υψηλά επίπεδα παράγονται όταν απαιτείται αγγειογένεση όπως στο έμβρυο, στον πλακούντα και στο ωχρο σωματίο καθώς και στην πλειονότητα των ανθρώπινων καρκινικών όγκων.

Πολλά μεσεγγυματικά και συνδετικά κύτταρα παράγουν τον VEGF (14). Ο VEGF δεσμεύεται με τουλάχιστον τρεις γνωστούς υποδοχείς, οι κινάσες τυροσίνης. Αυτοί είναι οι Flt-1 (VEGFR-1) (15), KDR/Flk-1 (VEGFR-2) (16), και Flt-4 (VEGFR-3) (17).

Αρχικά, οι υποδοχείς του VEGF θεωρούνταν χαρακτηριστικοί των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά πρόσφατα έχουν βρεθεί και σε άλλους φυσιολογικούς κυτταρικούς τύπους όπως στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και στα μονοκύτταρα-μακροφάγα (18,19).

Ο υποδοχέας VEGFR-1 έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια (affinity) για τον VEGF και εκφράζεται στο ενδοθήλιο καθώς και στα δερματικά τραύματα που επουλώνονται (20). Από την άλλη μεριά, ο VEGFR-2, με μικρότερη συγγένεια για τον VEGF μεσολαβεί στην ενδοθηλιακή κυτταρική μιτογένεση και χημειοταξία (21).

Ο VEGFR-3 εκφράζεται κυρίως στο λεμφικό ενδοθήλιο και φαίνεται πως εμπλέκεται στη διαδικασία της λεμφοαγγειογένεσης (22).

Ο VEGF αυξάνει την ενδοθηλιακή κυτταρική διαπερατότητα των μικρών αιμοφόρων αγγείων στους κυκλοφορούντες μεταβολίτες. Η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα επιτρέπει την εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος και τον σχηματισμό εξωκυττάριας ουσίας που ευνοεί την ενδοθηλιακή και κυτταρική στρωματική μετανάστευση (23). Επίσης, ο VEGF ερεθίζει την παραγωγή κολλαγενάσης στον ενδιάμεσο ιστό. Έτσι, δημιουργείται ένα ισορροπημένο σύστημα πρωτεόλυσης που μπορεί να ανασχηματίσει τα εξωκυττάρια στοιχεία που απαιτούνται για την αγγειογένεση. Ευνοεί τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* (24), αρχικό βήμα στην διακλάδωση του ενδοθηλίου από την προϋπάρχουσα αγγείωση. Ο VEGF καταστέλλει την ενδοθηλιακή κυτταρική απόπτωση και έτσι λειτουργεί σαν παράγοντας επιβίωσης (25).

Στον κερατοειδή, ο VEGF ανάγει την αύξηση τριχοειδών εκβλαστήσεων από προϋπάρχοντα αιματικά αγγεία. Η παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα ρυθμίζεται από την τοπική συγκέντρωση του οξυγόνου (26). Ο VEGF ερεθίζει την αγγειογενετική διαδικασία μέσω των διαφόρων δράσεων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και συμβάλλει στην αγγειογένεση σε συνθήκες χαμηλών

συγκεντρώσεων οξυγόνου. Ο ίδιος αυτός μηχανισμός παρουσιάζεται σε παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με την αγγειογένεση.

Άλλοι παράγοντες που συνδέονται με τον VEGF δεσμεύουν τους υποδοχείς του. Για παράδειγμα, ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PlGF), που είναι ομόλογος κατά 53% ως προς τα αμινοξέα με τον VEGF, δεσμεύει τον VEGFR-1. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο PlGF εκφράζεται κυρίως στον πλακούντα (27).

Ο VEGF-B είναι ένας αυξητικός παράγοντας που είναι ομόλογος κατά 43% με τον VEGF164 και 30% με τον PlGF. Εκφράζεται κυρίως στο μυϊκό ιστό και λιγότερο σε άλλους ιστούς όπως στον εγκέφαλο, τον πνεύμονα και τον νεφρό (28).

Οι VEGF-C, VEGF-D δεσμεύουν και ενεργοποιούν τους υποδοχείς VEGFR-2 και VEGFR-3 και έχουν μιτογόνο δράση για τα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*.

Ο δεύτερος σημαντικός αγγειογενετικός παράγοντας που όπως αναφέρθηκε είναι ομόλογος κατά 53% του VEGF, ο PlGF παίζει σημαντικό ρόλο στην πλακουντιακή αγγειογένεση. Είναι μία διμερής πρωτεΐνη της οποίας τα μονομερή συνδέονται με διθειϊκούς δεσμούς. Στον πλακούντα εκφράζεται τόσο στη λαχνική συγκυτιοτροφοβλάστη όσο και στην μέση στοιβάδα των αρχέγονων αγγείων. Ο PlGF έχει επίσης ανιχνευθεί και σε άλλους ιστούς όπως στην καρδιά, στον πνεύμονα, στους μύες και στον λιπώδη ιστό (29).

Φαίνεται πως επιδρά πρωτογενώς στα τροφοβλαστικά κύτταρα που εκφράζουν τον VEGFR-1. Έχει φανεί πως δεν επηρεάζει σημαντικά την κυτταρική χημειοταξία και τον πολλαπλασιασμό. Όπως και ο VEGF ο PlGF είναι σημαντικός για την εμβρυική ανάπτυξη και την πλακουντιακή αύξηση. Ο PlGF ωστόσο δεσμεύει μόνο τον VEGFR-1 και όχι τον VEGFR-2 όπως ο VEGF, οδηγώντας σε μη διακλαδωτική αγγειογένεση. Ο PlGF φαίνεται πως εμπλέκεται στο σχηματισμό των τελικών, επιμηκυσμένων τριχοειδών στο τρίτο τρίμηνο κύησης σε αντίθεση με τον VEGF που παρουσιάζεται κυρίως στα πρώτα δύο τρίμηνα κύησης.

Η σημασία του παράγοντα αυτού είναι μεγάλη στην προεκλαμψία καθώς και στην ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση. Ο PlGF είναι μία ισχυρή αγγειοδιασταλτική ουσία που αυξάνει τη διάμετρο των υπάρχοντων αρτηριών, όπως και το NO. Στο ενδοθήλιο, ο PlGF προάγει την παραγωγή του NO. Στη φυσιολογική κύηση, η έκφραση του υποδοχέα VEGFR-1 (s-Flt-1) αυξάνεται με αποτέλεσμα την αυξανόμενη ευαισθησία του PlGF σαν αγγειοδιασταλτική ουσία. Αυτή οδηγεί σε αυξημένη μητροπλακουντιακή κυκλοφορία, απαραίτητη στην εξέλιξη της φυσιολογικής κύησης (30).

6.2 ΙΝΟΒΛΑΣΤΙΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (FGF)

Οι ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες bFGF και aFGF είναι πολυπεπίδια που είναι μέλη μιας μεγάλης οικογένειας αυξητικών ρυθμιστών που παίζουν ρόλο στη φυσιολογική αγγειογένεση. Ο aFGF ήταν ο πρώτος που βρέθηκε πως συνδέεται με την αγγειογένεση. Όπως και ο VEGF δημιουργούν συνθήκες στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* απαραίτητες στην αγγειογένεση. Προάγουν τον ενδοθηλιακό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση καθώς και την παραγωγή του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και της κολλαγενάσης (31,32). Ο FGF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προέρχονται από το εμβρυικό μεσόδερμα και νευροεκτόδερμα, συμπεριλαμβανομένων των περικυττάρων, των χονδροκυττάρων και των οστεοβλαστών.

Ο FGF απελευθερώνεται σε περιπτώσεις τραυματισμού και πιθανώς να παίζει ρόλο στην τοπική διορθωτική αγγειογένεση όπου απελευθερώνεται στην εξωκυττάρια ουσία.

Φαίνεται λοιπόν πως δεν παίζει ένα γενικότερο ρόλο στην αγγειογενετική διαδικασία αλλά είναι απαραίτητος για τον αγγειακό ανασχηματισμό που συνδέεται με την επούλωση του ιστού.

6.3 ΟΙ ΑΓΓΕΙΟΠΟΙΗΤΙΝΕΣ

Οι αγγειοποιητίνες (Ang-1, Ang-2) εμπλέκονται στο σχηματισμό της αγγείωσης κατά την νεοαγγειογένεση. Και οι δύο είναι συνδέτες (ligands) του Tie2 υποδοχέα (tyrosine kinase υποδοχέα που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά και τα αιμοποιητικά κύτταρα). Οι αγγειοποιητίνες εμπλέκονται στην σταθεροποίηση και στην αναδόμηση του πρωτογενούς τριχοειδούς πλέγματος και είναι υπεύθυνες για την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (32,33,34).

Η αγγειοποιητίνη 1 φαίνεται να εκφράζεται τόσο στην κυτταροτροφοβλάστη όσο και στην συγκυτιοτροφοβλάστη, ενώ η αγγειοποιητίνη 2 και ο Tie2 εκφράζονται στην κυτταροτροφοβλάστη.

6.4 ΑΛΛΟΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Ο ινσουλινικός αυξητικός παράγοντας (IGF) είναι σημαντικός για την ανάπτυξη του ενδομητρίου κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο και στη διαδικασία της εμφύτευσης (35).

Οι παράγοντες IGF και οι πρωτεΐνες δέσμευσής τους έχουν μιτογόνο, αντιαποπτωτική και πιθανώς αγγειογενετική ιδιότητα.

Άλλοι αυξητικοί παράγοντες όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο transforming growth factor-α (TGF-α) έχουν επίσης αγγειογενετικές ιδιότητες.

Ο TNF-α εκκρίνεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και κάποια καρκινικά κύτταρα και παρότι εμπλέκεται στη διαδικασία της φλεγμονής, μοιράζεται πολλές ιδιότητες με τον TGF-β (36). Και οι δύο προάγουν την αγγειογένεση ίνινο και καταστέλλουν την ενδοθηλιακή κυτταρική αύξηση.

7. ΕΙΔΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Οι δύο βασικοί τύποι αγγειογένεσης είναι η εκβλαστική (sprouting) αγγειογένεση και η αγγειογένεση με εγκολεασμό (intussusceptive).

Η εκβλαστική αγγειογένεση και η αγγειογένεση με εγκολεασμό συμβαίνουν τόσο στην ενδομήτριο ζωή όσο και στον ενήλικα. Η εκβλαστική αγγειογένεση είναι καλύτερα κατανοητή. Η αγγειογένεση με εγκολεασμό ανακαλύφθηκε από τον Burri (37,38) πριν δύο δεκαετίες περίπου.

Η εκβλαστική αγγειογένεση χαρακτηρίζεται από εκβλαστήσεις που συντίθενται από ενδοθηλιακά κύτταρα που συνήθως αυξάνονται σε απάντηση ενός αγγειογενετικού ερεθίσματος όπως του VEGF-A. Έτσι, η εκβλαστική αγγειογένεση μπορεί να προσθέσει αιμοφόρα αγγεία σε τμήματα ιστών όπου αυτά απουσιάζουν.

Από την άλλη μεριά, η αγγειογένεση με εγκολεασμό χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων μέσω μίας διαδικασίας διάσπασης στην οποία στοιχεία των ενδιάμεσων ιστών εισβάλλουν στα προυπάρχοντα αγγεία, σχηματίζοντας διαγγειακούς πυλώνες ιστού που επεκτείνονται. Και οι δυο τύποι αγγειογένεσης συμβαίνουν σε όλους τους ιστούς και τα όργανα.

7.1 ΕΚΒΛΑΣΤΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Τα βασικά στάδια της εκβλαστικής αγγειογένεσης περιλαμβάνουν ενζυμική αποδόμηση της τριχοειδούς βασικής μεμβράνης, πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, συνένωση και «κλάδεμα» αγγείων (pruning of vessels) και σταθεροποίηση των περικυττάρων. Η εκβλαστική αγγειογένεση ξεκινά σε ιστούς με μειωμένη αιμάτωση οπότε τα επίπεδα υποξίας απαιτούν το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων για να ικανοποιηθούν οι μεταβολικές ανάγκες των παρεγχυματικών κυττάρων. Οι περισσότεροι τύποι παρεγχυματικών κυττάρων (μονοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, νευρώνες, αστροκύτταρα) απαντούν σε υποξικό περιβάλλον, εκκρίνοντας τον προαγγειογενετικό αυξητικό παράγοντα VEGF-A.

Η διαδικασία της εκβλαστικής αγγειογένεσης περιλαμβάνει μερικά αλληλοδιάδοχα στάδια. Η καρκινική αγγειογένεση αρχίζει με την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ειδικών αυξητικών παραγόντων που δεσμεύονται στους υποδοχείς τους. Έτσι, η εξωκυττάρια ουσία και η βασική μεμβράνη, που περικλείουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποδομούνται τοπικά από ενεργοποιημένες πρωτεάσες. Αυτό επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να εισβάλλουν στην περιβάλλουσα ουσία και ακολούθως να πολλαπλασιαστούν και να μεταναστεύσουν μέσω αυτής. Με την ευθυγράμμιση (polarization) των ενδοθηλιακών κυττάρων που μεταναστεύουν δημιουργείται ένας αυλός και έτσι σχηματίζεται το ανώριμο αιμοφόρο αγγείο. Η σταθεροποίηση των αιμοφόρων αγγείων ολοκληρώνεται με την πρόσληψη τοιχωματικών κυττάρων και δημιουργία εξωκυττάριας ουσίας. Η αγγειογενετική αυτή διαδικασία ελέγχεται στενά από θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστές, η ισορροπία των οποίων καθορίζει το επίπεδο της συνεχιζόμενης αγγειογένεσης (39,40).

7.2 Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΕΓΚΟΛΕΑΣΜΟ

Αυτού του είδους η αγγειογένεση λέγεται επίσης διασπαστική επειδή το αγγειακό τοίχωμα εκτείνεται στον αυλό προκαλώντας ένα απλό αγγείο να διασπαστεί σε δύο. Αυτός ο τύπος αγγειογένεσης είναι ταχύς και επαρκής σε σχέση με την εκβλαστική αγγειογένεση επειδή αρχικά απαιτεί επανοργάνωση των προυπαρχόντων ενδοθηλιακών κυττάρων και δε βασίζεται σε άμεσο ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό ή μετανάστευση. Η αγγειογένεση με εγκολεασμό συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ζωής

αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειακή ανάπτυξη σε έμβρυα όπου η αύξηση είναι ταχεία (41,42).

Αυτό το είδος αγγειογένεσης ανακαλύφθηκε στους πνεύμονες ποντικών και ανθρώπων, αλλά και σε πολλούς άλλους ιστούς και όργανα, κυρίως σε τριχοειδή δίκτυα όπως στον χοριοειδή χιτώνα του οφθαλμού, στον εντερικό βλεννογόνο, στον νεφρό, στην ωοθήκη και στη μήτρα (43).

Επίσης, συμβαίνει στον σκελετικό μυ, στην καρδιά και στον εγκέφαλο. Εκτός από τη σημασία της στο σχηματισμό νέων τριχοειδικών δομών, παίζει ρόλο στο σχηματισμό αρτηριακών και φλεβικών αναστομόσεων.

Το μηχανικό στρες που συνδέεται με αύξηση της αιματικής ροής, μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση της αγγειογένεσης με εγκολεασμό σε κάποιες περιοχές της κυκλοφορίας.

8. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Η παθολογική αγγειογένεση συνδυάζεται συνήθως με τον καρκίνο και εξελίσσεται χρονίως σε αντίθεση με τη φυσιολογική, που αναστέλλεται σε χρονικό διάστημα ημερών ή και εβδομάδων. Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί ως καθοριστικής σημασίας παράγοντας στους μηχανισμούς διηθητικής επέκτασης και υποστροφής των κακοήθων όγκων, με σαφή προγνωστική αξία στον καθορισμό της βιολογικής συμπεριφοράς όχι μόνο του πρωτοπαθούς όγκου αλλά και των μεταστάσεων του (44).

Ο σχηματισμός νέων αγγείων στην περιοχή του πρωτοπαθούς όγκου προάγει τη μεταστατική του ικανότητα, αυξάνοντας την πιθανότητα επέκτασης των καρκινικών κυττάρων μέσα στον αυλό των αγγείων. Αυτό επιτυγχάνεται με την αυξημένη πυκνότητα του αγγειακού δικτύου της περιοχής, αλλά και με το σχηματισμό αγγείων με λεπτή βασική μεμβράνη και χαλαρή συνοχή των ενδοθηλιακών κυττάρων (45).

Ο αριθμός των καρκινικών κυττάρων που εισέρχονται στο αίμα μέσω των νεόπλαστων αυτών αγγείων έχει αποδειχτεί ότι σχετίζεται άμεσα με τη μεταστατική ικανότητα του όγκου.

Το δίκτυο των νεόπλαστων αγγείων ενός πρωτοπαθούς κακοήθους όγκου μπορεί να συνεχίζει να αναπτύσσεται πέραν ενός συγκεκριμένου μεγέθους του όγκου που του εξασφαλίζει ιδανικές συνθήκες προσφοράς αίματος. Έτσι, η αγγειογένεση και κατά

συνέπεια η μεταστατική δυνατότητα του καρκίνου προάγεται, ενώ το μέγεθος του όγκου παραμένει σταθερό.

Η ενδογλίνη, ένας υποδοχέας του παράγοντα TGF-β εκφράζεται σε ενδοθήλια νεόπλαστων αγγείων ενώ απουσιάζει σε ενδοθήλια ώριμων ή προουπαρχόντων αγγείων και ενισχύει την προγνωστική σημασία της αγγειογένεσης στον ανθρώπινο καρκίνο.

Σήμερα, είναι γνωστές 14 πρωτεΐνες που προάγουν την αγγειογένεση, σημαντικότερες των οποίων για τον ανθρώπινο καρκίνο θεωρούνται εκείνες της οικογένειας του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (basic fibroblast growth factor) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) (46). Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκαν αναστολείς της αγγειογένεσης, ουσίες εξωγενείς ή ενδογενείς, που αναστέλλουν την ανάπτυξη των νέων αγγείων και που έχουν χρησιμοποιηθεί σε ερευνητικά πρωτόκολλα για τη θεραπεία καρκίνων και των μεταστάσεων τους σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους (ενδοστατίνη, θαλιδομίδη, ιντερφερόνη-α, αγγειοστατίνη, TNP-470) (47).

Διάφορα σήματα που ενεργοποιούν αυτή την διαδικασία έχουν ανακαλυφθεί, όπως το μεταβολικό στρες (π.χ. χαμηλή μερική πίεση οξυγόνου, χαμηλό pH και υπογλυκαιμία), μηχανικό στρες, φλεγμονώδεις διεργασίες και γενετικές μεταλλάξεις (π.χ. ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή αφαίρεση ογκοκατασταλτικών γονιδίων) που ελέγχουν την παραγωγή ρυθμιστών αγγειογένεσης.

Τα καρκινικά αγγεία αναπτύσσονται με εκβλάστηση ή εγκολεασμό από προυπάρχοντα αγγεία. Τα καρκινικά αγγεία δεν έχουν προστατευτικούς μηχανισμούς που τα φυσιολογικά αγγεία αποκτούν κατά την αύξηση.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων αυτών είναι ανώμαλα σε σχήμα μέσα στον αυλό. Η αγγειακή διαπερατότητα και η αγγειογένεση εξαρτώνται από τον τύπο του καρκίνου και το όργανο όπου ο όγκος αυξάνεται, διότι το κάθε όργανο έχει διαφορετικά κύτταρα στρώματος που παράγουν διαφορετικά προ και αντιαγγειογενετικά μόρια (48).

Όγκοι χαμηλής διαπερατότητας δύναται να υπερεκφράσουν αγγειογενίνη 1 ή να υποεκφράσουν τους VEGF και PlGF.

Η αγγειογένεση μπορεί να αφορά και μη νεοπλαστικές παθήσεις. Σε άλλες ασθένειες, τα αγγεία δεν αυξάνονται αλλά ανασχηματίζονται. Η υποξία και η φλεγμονή συμβάλλουν στην αγγειογένεση σε μη νεοπλαστικές ασθένειες. Η υποξία είναι ένα ισχυρό ερέθισμα για αγγειογένεση σε διάφορες παθήσεις. Η ανώμαλη εναπόθεση

εξωκυττάριας ουσίας ή η αγγειακή απόφραξη παρεμποδίζει την απελευθέρωση οξυγόνου και προκαλεί υποξία στο διαβήτη, στη νόσο Alzheimer και στο άσθμα.

Η υποξία ενεργοποιεί υποξικούς μεταγραφικούς παράγοντες που προάγουν την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων, η αγγειοποιητίνη-2 και άλλοι. Η αγγειογένεση όμως λόγω υποξίας διασώζει το ισχαιμικό μυοκάρδιο και παρατείνει την επιβίωση ασθενών με εγκεφαλικά επεισόδια. Παρ'όλα αυτά, δύναται να προκαλέσει τύφλωση σε πρόωρα νεογέννητα και σε διαβητικούς ασθενείς και αιμορραγική ρήξη αθηρωματικών πλακών. Η υποξία μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αγγειακό ανασχηματισμό, που οφείλεται σε ανισορροπία μεταξύ αγγειοδιασταλτικών (μονοξειδίου του αζώτου) και αγγειοσυσπαστικών ουσιών (ενδοθηλίνη 1) (48).

Η αγγειογένεση έχει επίσης παρατηρηθεί στην παχυσαρκία και φαίνεται πως συμβάλλει στην εναπόθεση λίπους σε παχύσαρκα άτομα. Τα προλιποκύτταρα μεταναστεύουν σε εστίες νεοαγγείωσης και ο λιπώδης ιστός είναι σημαντικά αγγειοβριθής. Οι VEGF, FGF (προάγεται από την ινσουλίνη) και η λεπτίνη υποβοηθούν την αγγειογένεση στον λιπώδη ιστό (49).

Η πιθανότητα χρήσης αντιαγγειογενετικών παραγόντων για τη θεραπεία παχύσαρκων ασθενών είναι προς έρευνα.

Παθολογική αγγειογενετική διαδικασία έχει παρατηρηθεί και στο σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών. Το σύνδρομο της υπερδιέγερσης των ωοθηκών στη σοβαρή του μορφή σε μη εγκυμονούσες γυναίκες αλλά και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης συνδέεται με υψηλές συγκεντρώσεις στον ορό του ελεύθερου VEGF. Ασθενείς με σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών έχουν υψηλές συγκεντρώσεις του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα και διαταραχές μεταξύ του VEGF και των υποδοχέων του. Οι συγκεντρώσεις των VEGF, VEGFR-1 στο πλάσμα των μητέρων μπορούν να καθορίσουν τη σοβαρότητα του συνδρόμου υπερδιέγερσης ωοθηκών. Η χορήγηση χοριακής γοναδοτροφίνης σε εγκύμονα ποντίκια αυξάνει την ωοθηκική παραγωγή του VEGF και την αγγειακή διαπερατότητα, που οδηγεί σε σοβαρό οίδημα, ασκίτη και υπεζωκωτική συλλογή σε ασθενείς με σύνδρομο σοβαρής υπερδιέγερσης ωοθηκών (50).

9. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ - ΜΙΑ ΣΥΝΤΟΜΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ

Η φυσιολογική αγγειογένεση είναι ρυθμιζόμενη σε αντίθεση με την καρκινική που χαρακτηρίζεται από αρρυθμιστη νεοαγγειογένεση. Η γνώση των μοριακών διαφορών για τη θεραπεία των ασθενειών που σχετίζονται με την αγγειογένεση, όπως η αντικαρκινική θεραπεία, είναι σημαντική. Η αλλαγή της αγγειογένεσης ρυθμίζεται από τη μεταβολή στην τοπική ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών παραγόντων και των καταστολέων τους (51).

Υπάρχει σημαντικός συσχετισμός μεταξύ του βαθμού αγγείωσης ενός καρκίνου και της έκφρασης του VEGF. Επίσης, οι VEGFR-1, 2 mRNA υπερεκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνδέονται με καρκίνο. Υψηλά επίπεδα του FGF έχουν αναφερθεί σε διάφορους καρκινικούς όγκους (52).

Σημαντικός αριθμός ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων εκφράζονται διαφορετικά σε διάφορους όγκους και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Τα ογκογονίδια είναι γονίδια των οποίων τα παράγωγα (πχ. αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, μεταγραφικοί παράγοντες) έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν λειτουργίες ευθέως ή πλάγιως σε σχέση με την κυτταρική αύξηση και να μετατρέπουν ευκαρυωτικά κύτταρα σε καρκινικά.

Τα αγγεία στον καρκίνο διαφέρουν σε πολλά σημεία από τα φυσιολογικά αγγεία. Γενικά, η καρκινική αγγείωση είναι κακώς διαφοροποιημένη, λόγω της ταχείας αύξησης και ανάπτυξης. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι πιο πλατιά, και ανώμαλα σε σχήμα και υπάρχουν λιγότερα κύτταρα στη διατομή των αγγείων. Οι βασικές μεμβράνες αυτών των αγγείων είναι συχνά ασυνεχείς, ενώ περικύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και νεύρωση απουσιάζουν.

Αυτές οι μορφολογικές αλλαγές συμβάλλουν στις λειτουργικές διαφορές και οδηγούν σε αύξηση της μικροαγγειακής διαπερατότητας που οδηγεί σε μειωμένη ταχύτητα ροής, βοηθώντας στην καρκινική αύξηση και στη μετάσταση (53).

10. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟΝ ΕΜΜΗΝΟΡΡΥΣΙΑΚΟ ΚΥΚΛΟ

Η αγγειογένεση είναι πολύ σημαντική στον εμμηνορρυσιακό κύκλο. Το ενδομήτριο με την αυξομείωση των ωθητικών ορμονών στο αίμα παχύνεται αλλά και αποδομείται κατά τη διάρκεια του κύκλου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία νεόπλαστων αγγείων.

Κατά τη φάση της εμμηνορρυσίας παρατηρείται αγγειογένεση στο βασικό στρώμα του ενδομητρίου, ενώ ειδικότερα κατά την παραγωγική και πρόιμη εκκριτική φάση η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα και στο λειτουργικό ενδομήτριο (54). Ακόμα και η δημιουργία του ωχρού σωματίου στην ωθήκη συνοδεύεται από σημαντική αγγειογένεση (55). Ειδικότερα με την αγγειογένεση του ενδομητρίου κατά τον εμμηνορρυσιακό κύκλο παρατηρούνται τρία στάδια: Κατά την εμμηνορρυσία η αγγειογένεση διορθώνει την αγγειακή κοίτη. Κατά την παραγωγική φάση η ταχεία αύξηση του πάχους του ενδομητρίου συνοδεύεται από δημιουργία αγγείων τα οποία και προσκομίζουν τα υλικά για την υπερπλασία του ενδομητρίου. Τέλος, κατά την εκκριτική φάση η αγγειογένεση συνεχίζεται και μετατρέπει τα ευθεία τριχοειδή αρτηρίδια σε εσπειραμένα (56). Η αγγειακή επιμήκυνση είναι σημαντικός αγγειογενετικός μηχανισμός κατά την παραγωγική φάση. Το ενδομήτριο συνθέτει όλα τα μέλη της οικογένειας του VEGF-A και τα επίπεδα του μεταβάλλονται ανάλογα με τη φάση του κύκλου. Στην παραγωγική φάση ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Περίληπτικά, η παραγωγική φάση συνοδεύεται από πάχυνση του λειτουργικού ενδομητρίου, η εκκριτική από ωρίμανση και η μετεμμηνορρυσιακή από διόρθωση του βασικού στρώματος που παρέμεινε.

Με αυτά τα δεδομένα ο Nardo υπέθεσε πως τα επίπεδα των κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων μεταβάλλονται κατά κυκλικό τρόπο (57).

Σε παθολογικές καταστάσεις, π.χ. φλεγμονές του ενδομητρίου η αγγειογένεση δημιουργεί ανώμαλα μορφολογικά αγγεία με αυξημένη διαπερατότητα που έχουν σαν κλινικό σύμπτωμα τις μητρορραγίες.

11. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΟΥ ΣΤΗΝ ΜΕΤΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ

Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την εμφύτευση του εμβρύου. Ο VEGF και οι υποδοχείς του αυξάνονται σημαντικά κατά την περίοδο μετά την ωορρηξία και την περιεμφυτευτική περίοδο (58). Φαίνεται πως η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται στα πρώιμα στάδια της εμφύτευσης.

Η έναρξη της αγγειογένεσης ξεκινά νωρίς κατά την εμφύτευση και υποστηρίζεται από αγγειογενετικά μόρια. Το φθαρτοποιημένο ενδομήτριο είναι απαραίτητο για την εμφύτευση του αναπτυσσόμενου εμβρύου και για την διατήρηση της εγκυμοσύνης. Ανώμαλη έκφραση των υποδοχέων του VEGF μπορεί να προκαλέσει το θάνατο του εμβρύου (59).

Ο VEGF προωθεί τη μητρική αγγειακή διαπερατότητα και διαστολή και συμβάλλει στην εμφύτευση. Διακοπή της ισορροπίας μεταξύ αγγειογενετικών παραγόντων και των αναστολέων τους τη στιγμή της εμφύτευσης, ίσως να οδηγήσουν σε αποβολή πρώτου τριμήνου, ή ελλειμματική πλακουντοποίηση με αυξημένη πιθανότητα ανωμαλιών στην εγκυμοσύνη.

Η ανάπτυξη του πλακουντικού αγγειακού δικτύου είναι απαραίτητη για την αύξηση και τη διατήρηση του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Διάφοροι παράγοντες εμπλέκονται σ' αυτή τη διαδικασία, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο PDGF (Platelet-derived growth factor) και ο PAF (Platelet-activating factor). Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας συμβάλλει στην αγγειογένεση και εκφράζεται τόσο στο ενδομήτριο όσο και στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Η έκφραση του VEGF mRNA μπορεί να ανιχνευθεί στο στάδιο της βλαστοκύστης, επιτρέποντας στο εμφυτευόμενο έμβρυο να προκαλέσει αγγειογένεση στο σημείο εμφύτευσης μέσω της σύνδεσης με ενδομητριακούς υποδοχείς. Διαταραχές της ισορροπίας μεταξύ αγγειογενετικών παραγόντων και των αναστολέων τους κατά τη στιγμή της εμφύτευσης ίσως οδηγήσει σε αποβολές πρώτου τριμήνου ή διαφορετικά παθολογική πλακουντοποίηση και αυξημένη πιθανότητα παθολογικής κύησης (60).

12. ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑΚΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η αύξηση και διαφοροποίηση του ενδομητρίου ελέγχεται από τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη. Το ενδομήτριο υποχωρεί μετά την άρση της δράσης των ορμονών κατά το τέλος της εκκριτικής φάσης αποδεικνύοντας πως η αγγειογένεση που απαιτείται για την διόρθωση του αγγειακού στρώματος μπορεί να συμβεί απουσία στεροειδών ορμονών.

Η χοριακή γοναδοτροφίνη παίζει άμεσο ρόλο στην εμφύτευση και πλακουντοποίηση. Προάγει την έκφραση του VEGF και εμμέσως προκαλεί αυξημένη αγγειογένεση (61). Τα οιστρογόνα προάγουν την αγγειογένεση δρώντας άμεσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η χορήγηση hCG σε γυναίκες που υφίστανται εξωσωματική γονιμοποίηση αυξάνει τη συγκέντρωση του VEGF στα ούρα καθώς και στον ορό και στο ωοθηλακικό υγρό. Τόσο τα οιστρογόνα όσο και η προγεστερόνη προάγουν την έκφραση του VEGF στα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου. Τα οιστρογόνα προωθούν την αγγειακή διαπερατότητα και προάγουν την αγγειογένεση ενώ η προγεστερόνη προάγει την αγγειογένεση με μικρές δράσεις στην αγγειακή διαπερατότητα.

13. Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

Στις πλακουντικές λάχνες η αγγειογένεση πραγματοποιείται παρουσία ενός βαθμού οξυγόνωσης που εκτείνεται από τη μητρική κυκλοφορία μέσω των τροφοβλαστικών λαχνών και της αναπτυσσόμενης εμβρυϊκής κυκλοφορίας (που λαμβάνει οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες από τις λάχνες) στο αναπτυσσόμενο έμβρυο.

Η σύνδεση μεταξύ των αναπτυσσόμενων τριχοειδών και του εμβρυϊκού κυκλοφορικού συστήματος εγκαθίσταται περίπου την 32η ημέρα μετά τη σύλληψη. Απ' αυτό το σημείο και μετά, το ανώριμο μεσολαχνικό αγγειακό στρώμα πραγματοποιεί όλες τις πλακουντικές λειτουργικές μεταφορές. Εξαπλώνεται συνεχώς ώστε να ανταποκριθεί στις ανάγκες οξυγόνου και διατροφής του αναπτυσσόμενου εμβρύου (62,63).

Η ανάπτυξη συμβαίνει σε ένα περιβάλλον μειωμένων τάσεων οξυγόνου σχετικά με τους μητρικούς ιστούς αλλά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η διαλαχνική τάση του οξυγόνου αυξάνεται.

Σε αντίθεση με τα περισσότερα αναπτυσσόμενα όργανα, στα οποία η οξυγόνωση βελτιώνεται με την προοδευτική αγγείωση, η οξυγόνωση του ιστού στις πλακουντικές λάχνες σχετίζεται αντιστρόφως με την πυκνότητα των εμβρυϊκών τριχοειδών. Συμπερασματικά, χαμηλή πυκνότητα των εμβρυϊκών τριχοειδών λόγω μειωμένης αποβολής οξυγόνου οδηγεί σε αυξανόμενα διαπλακουντικά επίπεδα οξυγόνου τα οποία επηρεάζουν περαιτέρω την αγγειογένεση (64,65).

Σε κάθε αγγειακή επιφάνεια, αυξανόμενη ροή επιτυγχάνεται από τον συνδυασμό φυσιολογικών προσαρμογών (π.χ. αυξημένη αιματική τάση) και τις μεταβολές στην αγγειακή ανατομία (π.χ. αύξηση αγγειακής διαμέτρου, ελάττωση αγγειακού μήκους, σχηματισμός παράλληλης αντί σειριακής διάταξης των αγγείων).

Σύμφωνα με το νόμο του Πουαζέλ, η αντίσταση ροής είναι ανάλογη του αγγειακού μήκους και αντιστρόφως ανάλογη του τετραγώνου της αγγειακής επιφάνειας διατομής. Έτσι, το πλεονέκτημα της παράλληλης διάταξης με άλλες μεταβλητές να παραμένουν σταθερές είναι πως μειώνουν το μέσο μήκος και συνολικά την αντίσταση (66).

Αυτές οι αρχές έχουν μεγάλη σημασία στο εμβρυοπλακουντικό αγγειακό σύστημα, το οποίο πρέπει να προσαρμόζεται συνέχεια στις αυξανόμενες ανάγκες του αναπτυσσόμενου εμβρύου.

Μελέτες Doppler έχουν δείξει πως οι εμβρυϊκές αγγειακές αντιστάσεις μειώνονται στη φυσιολογική εγκυμοσύνη και μπορούν να επηρεαστούν σε εγκυμοσύνες με επιπλοκές (66).

Η ουσιαστική στρατηγική για τη μείωση του μήκους και των αντιστάσεων είναι η διακλαδωτική αγγειογένεση (branching angiogenesis). Νέοι κλάδοι μπορούν να δημιουργηθούν μέσω της εκβλαστικής αγγειογένεσης (πλευρική διακλάδωση από υπάρχοντα αγγεία) (67,68). Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται παράλληλα αγγειακά συμπλέγματα. Αντίθετα, η μη διακλαδωτική αγγειογένεση, που πιθανό να αυξάνει την αντίσταση της αιματικής ροής, χαρακτηρίζεται από επιμήκυνση των προυπάρχοντων τμημάτων αγγείων μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού του αγγειακού ενδοθηλίου.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου οι ανώριμες ενδιάμεσες λάχνες έχουν μεγάλη διάμετρο και καλύπτονται από ένα παχύ στρώμα τροφοβλάστης και περιέχουν ένα σύνθετο τριχοειδές δίκτυο περικλείοντας κεντρικά αρχέγονα αγγεία. Αντίθετα, οι λάχνες στο τρίτο τρίμηνο συνδέονται με λεπτή τροφοβλάστη. Αυτές οι σχέσεις

μεταξύ λαχνών και τριχοειδών αποδεικνύουν πως η τροφοβλαστική λάχνη είναι ένα πλαστικό στρώμα που προσαρμόζεται ανάλογα με τη δομική μεταβολή της υποκείμενης αγγείωσης.

Η ανάπτυξη της εμβρυϊκής αγγείωσης του πλακούντα εξαρτάται από τις δράσεις των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους, που παράγονται από κύτταρα και συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας μέσα ή κοντά στα εμβρυϊκά αγγεία (69).

13.1 ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ (21^η-32^η ΗΜΕΡΑ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΥΛΛΗΨΗ)

Η εμβρυϊκή αγγείωση της πρώτης γενιάς των πλακουντιακών λαχνών είναι το αποτέλεσμα του εκ νέου σχηματισμού των τριχοειδών μέσα στον πλακούντα. Ξεκινά περίπου την 21^η ημέρα μετά τη σύλληψη (70,71).

Οι πρόγονοι του εμβρυϊκού ενδοθηλίου στο λαχνικό στρώμα, οι αιμαγγειοπλαστικές κυτταρικές χορδές, μπορούν να εμφανιστούν από τις 15 έως τις 21 ημέρες μετά τη σύλληψη. Ο βασικός ινοβλαστικός παράγοντας (bFGF) εμπλέκεται στην στρατολόγηση των αιμαγγειογενετικών προγόνων κυττάρων και η έκφρασή του στις ανθρώπινες πλακουντικές λάχνες έχει αναφερθεί, αλλά όχι σε αυτό το πρώιμο στάδιο της εγκυμοσύνης (72,73,74).

Είναι γνωστό πως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF ή VEGF-A), που είναι υπεύθυνος για την αύξηση και την συνένωση των ενδοθηλιακών προδρόμων για το σχηματισμό των αιμαγγειογενετικών χορδών, εκφράζεται σημαντικά στην έναρξη της εγκυμοσύνης (75,76,77).

Στον ανθρώπινο πλακούντα, ο σχηματισμός των ενδοθηλιακών αγωγών από τις αιμαγγειογενετικές χορδές ξεκινά την εικοστή πρώτη ημέρα μετά τη σύλληψη.

Από την 28^η ημέρα μετά τη σύλληψη, οι πρώην αιμαγγειοβλαστικές χορδές των περισσότερων λαχνών, παρουσιάζουν επιμηκυσμένους πολυγωνικούς αυλούς που περικλείονται από ενδοθηλιακά κύτταρα.

13.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΡΙΧΟΕΙΔΟΥΣ ΔΙΚΤΥΟΥ (32Η ΗΜΕΡΑ ΩΣ 25Η ΕΒΔΟΜΑΔΑ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΥΛΛΗΨΗ)

Τα επόμενα στάδια της αγγειογένεσης μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις περιόδους. Πρώτα, ο σχηματισμός δικτύων τριχοειδών από τις 32 ημέρες ως τις 25 εβδομάδες μετά την σύλληψη μέσω της διακλαδωτικής αγγειογένεσης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται υποχώρηση της περιφερικής τριχοειδούς δικτύωσης και σχηματισμός κεντρικών αρχέγονων αγγείων από τις 15 ως τις 32 εβδομάδες μετά τη σύλληψη. Τέλος παρατηρείται ο σχηματισμός των τελικών τριχοειδών μέσω της μη διακλαδωτικής αγγειογένεσης (από τις 25 εβδομάδες μέχρι και το τέλος της κύησης). Από την 32η ημέρα μετά τη σύλληψη μέχρι το τέλος του πρώτου τριμήνου, τα ενδοθηλιακά τμήματα που σχηματίζονται από την νεοαγγειογένεση μετατρέπονται σε πρωτογενή τριχοειδή δίκτυα μέσω της ισορροπημένης αλληλεπίδρασης δύο παράλληλων μηχανισμών. Πρώτον μέσω της επιμήκυνσης προυπάρχοντων αγωγών με τη μη διακλαδωτική αγγειογένεση και δεύτερον μέσω της διακλάδωσης αυτών με πλευρική εκβλάστηση.

Στο στρώμα των μικρών σε διάμετρο λαχνών (μεσεγγυματικές λάχνες), η διακλαδωτική αγγειογένεση είναι πιο σπάνια απ' ό,τι η μη διακλαδωτική. Με την πάροδο της εγκυμοσύνης, η αυξανόμενη διάμετρος των λαχνών σε συνδυασμό με τη διακλαδωτική αγγειογένεση, τα τριχοειδή μετατρέπονται σε ένα πυκνό δισδιάστατο δίκτυο που εντοπίζεται ακριβώς κάτω από την λαχνική επιφάνεια. Αυτό είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό στις ανώριμες ενδιάμεσες λάχνες που αναπτύσσονται από τις μεσεγγυματικές λάχνες από την ένατη εβδομάδα μετά την έμμηνο ρύση και μετά. Η έκφραση των VEGF-A, VEGFR-2 είναι πιο έντονη στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης και μειώνεται με την πάροδο αυτής (78,79).

Αντίθετα, η έκφραση του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα (PlGF) και της διαλυτής μορφής του VEGFR-1, έχει φανεί πως αυξάνεται προς το τέλος της εγκυμοσύνης όταν η διακλαδωτική αγγειογένεση αντικαθίσταται από μη διακλαδωτικούς αγγειογενετικούς μηχανισμούς (80).

Ο PlGF συνδέεται επιλεκτικά με τον VEGFR-1 και σε κάποια συστήματα φαίνεται πως προκαλεί καταστολή της εκβλαστικής αγγειογένεσης (sprouting angiogenesis). Σε άλλα συστήματα ωστόσο, όπως στον κερατοειδή και στο δέρμα των ποντικών, φαίνεται πως ερεθίζει το σχηματισμό διακλαδωτικών τριχοειδών δικτύων (81,82).

13.3. ΜΗ ΔΙΑΚΛΑΔΩΤΙΚΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ (24-25 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΜΕΤΑ ΤΗ ΣΥΛΛΗΨΗ ΕΩΣ ΤΕΛΟΣ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗΣ)

Από τις 25 εβδομάδες μετά τη σύλληψη ως το τέλος της εγκυμοσύνης, πραγματοποιείται μετατροπή από διακλαδωτική αγγειογένεση σε μη διακλαδωτική. Αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη νέων τύπων λαχνών, τις ώριμες ενδιάμεσες λάχνες. Η ανάλυση των δεικτών πολλαπλασιασμού σε αυτό το στάδιο αναδεικνύει τη σχετική ελάττωση του τροφοβλαστικού πολλαπλασιασμού και την αύξηση του ενδοθηλιακού πολλαπλασιασμού σε όλο το μήκος αυτών των δομών, οδηγώντας σε μη εκβλαστική αγγειογένεση. Τα περιφερικά τριχοειδή αυξάνονται με ρυθμό που ξεπερνά αυτόν των ίδιων των λαχνών, οδηγώντας σε συσπείρωση των τριχοειδών.

Ο ρόλος του PlGF είναι πολύ πιο σύνθετος από ότι είχε αρχικά θεωρηθεί. Αρχικά, είχε υποτεθεί πως έχει μικρή δυνατότητα για τον ερεθισμό του ενδοθηλιακού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έτσι, είχε θεωρηθεί πως λειτουργούσε σαν ανταγωνιστής των προαγγειογενετικών δράσεων του VEGF-A (83).

Ωστόσο, αποδείχτηκε πως ο PlGF *in vivo* ερεθίζει τον πολλαπλασιασμό των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων στον ανθρώπινο πλακούντα ενώ παίζει ρόλο και στην αγγειογένεση. Παίζει επίσης ρόλο στην παθολογική αγγειογένεση (84).

Η τελική γεωμετρία του λαχνικού αγγειακού στρώματος καθορίζεται από την ισορροπία των VEGF-A, PlGF μαζί με τους υποδοχείς τους. Η επικράτηση του VEGF-A προωθεί την εγκαθίδρυση ενός πολύπλοκου δικτύου με χαμηλή αντίσταση τριχοειδών μέσα στις μεσεγγυματικές και ανώριμες ενδιάμεσες λάχνες οι οποίες επικρατούν στα δύο πρώτα τρίμηνα της εγκυμοσύνης. Αντίθετα, η απουσία σύνθετου τριχοειδούς δικτύου στο τελευταίο τρίμηνο ελέγχεται από την επικράτηση του PlGF και του υποδοχέα του VEGFR-1.

Η ισορροπία μεταξύ έκκρισης VEGF-A και PlGF ίσως ρυθμίζεται από τις μερικές τάσεις οξυγόνου. Όπως προαναφέρθηκε, ο VEGF και οι υποδοχείς του στους πλακουντικούς ιστούς υπερεκφράζονται σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης οξυγόνου.

Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση του PlGF. Τα προαναφερθέντα εγείρουν το ερώτημα για το αν η αλλαγή (από επικράτηση του VEGF-A στην έναρξη της εγκυμοσύνης σε επικράτηση του PlGF στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο), μαζί με τις

μεταβολές στην αγγειακή γεωμετρία, οφείλονται στην αυξανόμενη ενδοπλακουντική οξυγόνωση, λόγω της αύξησης της αιματικής ροής. Παρ' όλα αυτά πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν πως οι πλακουντιακοί ιστοί ίσως απαντούν διαφορετικά στις μεταβολές της μερικής τάσης οξυγόνου σε διαφορετικά στάδια της κύησης (84,85).

Στα πρώιμα και προχωρημένα στάδια της εγκυμοσύνης, είναι απαραίτητο να προστατευθεί το έμβρυο από τις πιθανώς ζημιογόνες δράσεις των υψηλών τάσεων οξυγόνου. Η ανάπτυξη και ο ανασχηματισμός της εμβρυοπλακουντικής αγγείωσης ίσως αποτελεί τμήμα αυτής της προστασίας.

Τα επίπεδα του οξυγόνου αυξάνονται μετά τις 12 εβδομάδες (86,87), ενώ σημαντικές αλλαγές στην περιφερική αγγείωση είναι προφανείς περίπου στις 20 με 25 εβδομάδες. Η εμβρυική ανάγκη για οξυγόνο στο δεύτερο τρίμηνο καλύπτεται άνετα αφού η μερική μεσολαχνική τάση του οξυγόνου είναι πολύ υψηλή αυτή την περίοδο. Παρ' όλα αυτά, με την πάροδο της εγκυμοσύνης, οι εμβρυικές ανάγκες για οξυγόνο αυξάνονται και η λαχνική αγγείωση ίσως χρειάζεται ανασχηματισμό για την πρόσληψη περισσότερου οξυγόνου από την αγγείωση της μήτρας.

Ωστόσο, οι αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες δεν είναι οι μόνοι που ρυθμίζουν την λαχνική ανάπτυξη και αγγειογένεση. Ίσως, ο σχηματισμός των πρώτων ώριμων ενδιάμεσων λαχνών απαιτεί επιπλέον και διαφορετικά σήματα απ' ό,τι αυξητικούς παράγοντες που εξαρτώνται από το οξυγόνο. Τουλάχιστον, για τις τελικές λάχνες υπάρχει ένδειξη πως η ανάπτυξή τους εξαρτάται απευθείας από τα επίπεδα οξυγόνου, την επιμήκυνση των τριχοειδών και ίσως από τους αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες (86,87).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

1.ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΣΤΙΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΥΗΣΕΙΣ

Η αγγείωση του ανθρώπινου εμβρύου συμβαίνει πολύ νωρίς στην εγκυμοσύνη (δεύτερη εβδομάδα μετά τη σύλληψη) και ξεκινά στις εξωεμβρυικές περιοχές. Έχει φανεί πως υπάρχει στενή σχέση μεταξύ εμβρυικής ανάπτυξης και της αγγειακής κατάστασης των χοριονικών λαχνών και πως η φυσιολογική λαχνική χοριονική αγγείωση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της εγκυμοσύνης (88). Σε περίπτωση εμβρυικού θανάτου, οι λάχνες χαρακτηρίζονται από χαμηλή αγγειακή πυκνότητα, ίνωση και υδρωπικό εκφυλισμό. Επίσης, αυξημένη αγγειακή πυκνότητα στον τοιχωματικό φθαρτό συνδέεται με αυτόματη αποβολή, παίζοντας τον κρίσιμο ρόλο της αγγειακής ανάπτυξης στην αρχή της εγκυμοσύνης.

Η προεκλαμψία, είναι υπεύθυνη για σημαντική αιτία περιγεννητικής θνησιμότητας και νοσηρότητας. Παρ'ότι η αιτιολογία της παραμένει άγνωστη, η ρύθμιση της αγγειακής αύξησης στην εμβρυοπλακουντική μονάδα φαίνεται να διαταράσσεται, οδηγώντας σε προβληματική πλακουντοποίηση. Έχει φανεί πως υπάρχει θετικός συσχετισμός μεταξύ των μητροπλακουντιακών αγγειακών βλαβών και άλλων λαχνικών βλαβών σε σχέση με την προεκλαμψία (89).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ελάττωση των αγγειογενετικών παραγόντων (VEGF, PlGF) στο αίμα προεκλαμπτικών γυναικών καθώς και στο φλεβικό ομφαλικό αίμα (90,91).

Μεταβολές στην έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων έχουν φανεί μέσα στον πλακούντα. Το m-RNA για τον VEGF και τον υποδοχέα του, Flt-1, είναι σημαντικά χαμηλότερα στις πλακουντικές βιοψίες προεκλαμπτικών γυναικών, δείχνοντας ότι μία ανωμαλία στην έκφραση των αυξητικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη εμβρυική τριχοειδική διακλάδωση (92).

2. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΜΗΤΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΡΟΕΚΚΛΑΜΨΙΑ

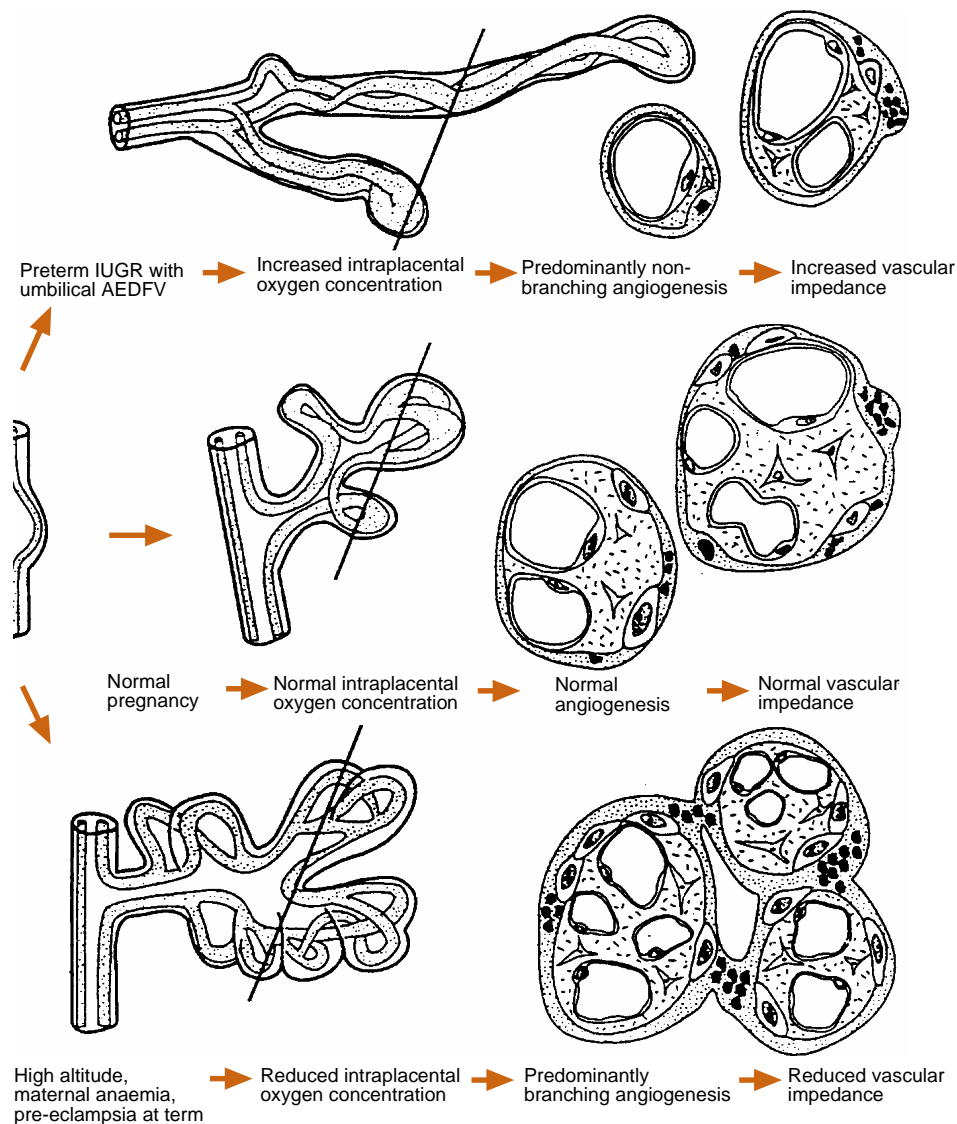
Μεταβολές στην ανάπτυξη του λαχνικού δέντρου και παθολογικές μεταβολές στο τριχοειδικό αγγειακό σύστημα που χαρακτηρίζονται από χρόνια λαχνίτιδα, έμφρακτα και αιμορραγική ενδοαγγειίτιδα με επόμενη ανεπαρκή αιματική ροή, συνδέονται με την παθογένεση της ενδομήτριας υπολειπόμενης αύξησης (93).

Η εκτίμηση της δομής του αγγειακού δέντρου στην ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση χαρακτηρίζεται από σημαντικά χαμηλότερο αριθμό τριχοειδών λαχνών σε σχέση με τους φυσιολογικούς τελειόμηνους πλακούντες (94,95). Επίσης, έχει περιγραφεί ελάττωση στις επιφάνειες και στον όγκο των τελικών λαχνών σε εγκυμοσύνες με ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση. Η λαχνική αγγείωση του πλακούντα είναι σημαντικά χαμηλότερη στην πάθηση αυτή. Πρόσφατες μελέτες Doppler έχουν δείξει ανώμαλη πλακουντική ροή που συνδέεται με αγγειακές ανωμαλίες στο 60% των περιπτώσεων που υποδηλώνουν συσχετισμό μεταξύ πλακουντικής αγγειακής παθολογίας και ενδομήτριας υπολειπόμενης αύξησης.

Η νεοαγγειογένεση των πλακουντικών λαχνών ξεκινά την 21η ημέρα μετά τη σύλληψη όπως έχει προαναφερθεί. Αυτή αποτελείται από τη διαδικασία της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε αιμαγγειοβλάστες, που είναι οι πρόγονοι των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η πλακουντική αγγειογένεση μπορεί να διακριθεί σε διακλαδωτική και μη διακλαδωτική. Η διακλαδωτική αγγειογένεση συμβαίνει στο πρώτο και δεύτερο τρίμηνο σε συνθήκες σχετικής υποξίας. Μη διακλαδωτική αγγειογένεση συμβαίνει στο τρίτο τρίμηνο σε συνθήκες σχετικής φυσιολογικής συγκέντρωσης οξυγόνου. Η πλακουντιακή ανάπτυξη εξαρτάται από την διεισδυτική ιδιότητα της εξωλάχνιας τροφοβλάστης. Αυτά τα κύτταρα μεταναστεύουν, εισβάλλουν και μετατρέπουν τα μεσομυομητρικά και φθαρτικά τμήματα των σπειροειδών αρτηριών. Στην προεκλαμψία, η τροφοβλαστική διείσδυση είναι ρηχή και η μητρική αγγείωση είναι ακατάλληλη. Η φτωχή πλακουντική αιμάτωση προκαλεί υποξία, οδηγώντας στην απελευθέρωση παραγόντων από τον πλακούντα με αποτέλεσμα ενδοθηλιακή κυτταρική βλάβη στη μητέρα και ανώμαλη αγγειογένεση στον πλακούντα (96,97).

Είναι γνωστό πως η όψιμη αποβολή, η προεκλαμψία, η ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση και η πλακουντική αποκόλληση συνδέονται με πλακουντική υποξία που οφείλεται στην αναιμία της μητέρας, στην εγκυμοσύνη σε μεγάλο υψόμετρο, στην

προεκλαμψία και στην πρόωρη ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση με απουσία διαστολικής ροής, οδηγεί σε διαφορετικές μορφολογίες λαχνών (98). Πιο συγκεκριμένα, σε μεγάλο υψόμετρο και στην προεκλαμψία, υπάρχει μειωμένη ενδοπλακουντιακή συγκέντρωση οξυγόνου, που οδηγεί κυρίως σε διακλαδωτική αγγειογένεση και μειωμένη αγγειακή αντίσταση. Αντίθετα, στη σοβαρή ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση με απουσία διαστολικής ροής στην ομφαλική αρτηρία, παρουσιάζεται αυξημένη ενδοπλακουντιακή συγκέντρωση οξυγόνου, που οδηγεί κυρίως σε μη διακλαδωτική αγγειογένεση και έτσι αυξημένη αγγειακή αντίσταση.



Ong S, Lash G, Baker P.N. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2000; 14 : 969-980

Στις πλακουντιακές λάχνες, η αγγειογένεση γίνεται παρουσία οξυγόνου και εκτείνεται από την κυκλοφορία της μητέρας, μέσω της τροφοβλαστικής λάχνης στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Εξετάσεις Doppler έχουν δείξει πως οι αγγειακές εμβρυικές αντιστάσεις μειώνονται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης και μπορεί να αυξηθεί σε επιπλεγμένες εγκυμοσύνες.

Στη φυσιολογική εγκυμοσύνη, η τριχοειδική αύξηση είναι διφασική, περιλαμβάνοντας μία αρχική φάση διακλαδωτικής (branching) αγγειογένεσης ακολουθούμενη από μία φάση μη διακλαδωτικής (non branching) αγγειογένεσης. Σε κάποιο βαθμό, η μορφολογία των λαχνών αντικατοπτρίζει τις αγγειογενετικές διαδικασίες.

Η έκφραση του VEGF μειώνεται με την πάροδο της εγκυμοσύνης και αυξάνεται σε συνθήκες υποξίας. Ο παράγοντας αυτός ασκεί τη δράση του μέσω των υποδοχέων flt-1, KDR. Ο VEGF όταν συνδέεται με τον υποδοχέα KDR προκαλεί ενδοθηλιακό κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αγγειογένεση. Αντίθετα, όταν συνδέεται με τον flt-1, οδηγεί σε καταστολή του κυτταροτροφοβλαστικού πολλαπλασιασμού. Τα επίπεδα του PlGF αυξάνονται με την πάροδο της εγκυμοσύνης (99,100).

Τα επίπεδα του VEGF αυξάνονται στην προεκλαμψία και αυτή η αύξηση συνδέεται με τη σοβαρότητα της ασθένειας. Σε ορισμένες μελέτες έχουν βρεθεί μειωμένες συγκεντρώσεις του παράγοντα αυτού στον ορό γυναικών με προεκλαμψία και αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός πως η μέτρηση του επηρεάζεται από την παρέμβαση δεσμευτικών πρωτεϊνών. Ο VEGF αυξάνει την ενδοθηλιακή παραγωγή προστακυκλίνης και έχει αγγειοδιασταλτική δράση στις αγγειακές αντιστάσεις, πιθανόν μέσω της παραγωγής του μονοξειδίου του αζώτου.

Η υποξία είναι βασικός ερεθιστικός παράγοντας του VEGF. Η προεκλαμψία είναι μία κατάσταση που αντιπροσωπεύει ένα περιβάλλον υποξίας και θα έπρεπε να συνδυάζεται με αυξημένη έκφραση του VEGF. Το γεγονός πως η πλακουντιακή έκφραση του VEGF μειώνεται στην προεκλαμψία είναι οξύμωρο. Η μειωμένη πλακουντιακή έκφραση του VEGF στην προεκλαμψία συνυπάρχει με την έννοια της πλακουντιακής υποξίας και υπεροξίας.

Είναι γνωστό πως τα επίπεδα του PlGF στον ορό του αίματος της γυναίκας μειώνονται στην προεκλαμψία (101). Ο PlGF δεν έχει σημαντική δράση στην παραγωγή της προστακυκλίνης. Έχει ωστόσο σημαντική δράση στην παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Αφού ο VEGF φαίνεται πως είναι υπεύθυνος για πολλές από τις συστηματικές εκδηλώσεις της προεκλαμψίας, πολλοί ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους στην αναστολή του χρησιμοποιώντας ένα διαλυτό υποδοχέα ανταγωνιστή που δεσμεύει και απενεργοποιεί τον VEGF (102).

3. ΑΝΩΜΑΛΗ ΠΛΑΚΟΥΝΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΠΡΟΕΚΛΑΜΨΙΑΣ

Η προεκλαμψία επηρεάζει το 3 με 5% όλων των κυήσεων και αποτελεί την πιο συχνή επιπλοκή της εγκυμοσύνης. Συνδέεται με περιγενετική και νεογνική θνησιμότητα της τάξης του 10%. Παράγοντες κινδύνου προεκλαμψίας είναι η πρωτοτοκία, η πολύδυμη κύηση, η μεγάλη ηλικία της μητέρας, και το ιστορικό προεκλαμψίας. Επίσης, άλλες νοσηρές καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, οι υπερπηκτικές καταστάσεις, η χρόνια υπέρταση, η νεφρική νόσος, ο λύκος, ο σακχαρώδης διαβήτης αυξάνουν τον κίνδυνο προεκλαμψίας.

Η προεκλαμψία εκδηλώνεται όταν συνυπάρχει πρόσφατη εμφάνιση υπέρτασης με λευκωματουρία στο δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης. Η υπέρταση ορίζεται σαν εκδήλωση αρτηριακής πίεσης άνω της τιμής 140/90 σε δύο διαδοχικές μετρήσεις (που απέχουν περισσότερο από 6 ώρες) μετά από τις 20 εβδομάδες κύησης, χωρίς προηγούμενο ιστορικό υπέρτασης. Η λευκωματουρία ορίζεται σαν συγκέντρωση μεγαλύτερη των 300mg/dl πρωτεΐνης σε ούρα 24ώρου.

Άλλα συμπτώματα, που αποτελούν ένδειξη ερεθισμού του κεντρικού νευρικού συστήματος, είναι η κεφαλαλγία, η σκοτοδίνη, καθώς και το επιγαστρικό άλγος. Επίσης, η απότομη εμφάνιση σοβαρού οιδήματος μπορεί να αποτελεί σύμπτωμα της νόσου. Οι εργαστηριακές τιμές που στηρίζουν τη διάγνωση της προεκλαμψίας περιλαμβάνουν τις αιμόλυση, αιμοσυμπύκνωση, θρομβοκυτταροπενία, υψηλά ηπατικά ένζυμα και υψηλή κρεατινίνη.

Εμβρυικές επιπλοκές που οφείλονται στην προεκλαμψία περιλαμβάνουν την ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση, προωρότητα, πλακουντιακή αποκόλληση και αυξημένο κίνδυνο περιγεννητικού θανάτου.

Ο πιο κοινά αποδεκτός μηχανισμός της παθογένεσης της προεκλαμψίας περιλαμβάνει ανώμαλη πλακουντοποίηση που οδηγεί σε αύξηση αγγειακών ενδοθηλιακών αντιαγγειογενετικών παραγόντων. Στην φυσιολογική πλακουντοποίηση, τα

κυτταροτροφοβλάστικά κύτταρα προσκολλούν το κήμα στο τοίχωμα της μήτρας. Στη συνέχεια εισχωρούν στον ενδιάμεσο χώρο του φθαρτού και στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας ώστε να εξασφαλίσουν στο κήμα θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, ο πλακούντας πρέπει να σχηματίσει νέα αγγεία και να αυξήσει τον αριθμό των ήδη υπάρχοντων. Τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα που βρίσκονται μέσα στις λάχνες διαφοροποιούνται σε εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα. Καθώς οι λάχνες προσκολλώνται στο ενδομήτριο, το συγκιτιοτροφοβλαστικό στρώμα εξαφανίζεται, επιτρέποντας στα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα να μεταναστεύουν στον μητρικό ιστό προς τις μητροειδείς σπειροειδείς αρτηρίες. Ένας σύνθετος φυσιολογικός ανασχηματισμός των αγγείων συμβαίνει, μέσω του οποίου οι φυσιολογικές μυικές και ελαστικές δομές των σπειροειδών αρτηριών αντικαθίστανται μερικώς από εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα διευρύνουν τη διάμετρο και ενισχύουν τα τοιχώματα των αγγείων προσδίδοντας χαμηλές αντιστάσεις στις αρτηρίες με αποτέλεσμα την ιδανική παροχή αίματος στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Στα απομακρυσμένα τμήματα των μητρικών αρτηριών σχηματίζονται έμβολα (plugs), τα οποία εμποδίζουν τη ροή του μητρικού αίματος στο μεσολάχινο χώρο. Με τη συνέχιση του αγγειακού ανασχηματισμού των σπειροειδών αρτηριών, τα τροφοβλαστικά έμβολα χαλαρώνουν επιτρέποντας την αιματική ροή και επομένως τη μεταφορά οξυγόνου μεταξύ μητέρας και μεσολάχιου χώρου (103).

Η τάση του οξυγόνου στο μεσολάχινο χώρο μέχρι τις 10 εβδομάδες κύησης είναι περίπου 20 mmHg (104).

Αυτό το σχετικά υποξικό περιβάλλον μετατρέπεται σε περιβάλλον φυσιολογικής οξυγόνωσης καθώς το μητρικό αίμα παρέχει οξυγόνο στο μεσολάχινο χώρο. Οι τάσεις του οξυγόνου τριπλασιάζονται με υψηλότερα επίπεδα στις περιφερικές περιοχές του πλακούντα και χαμηλότερα προς το κέντρο. Η μέγιστη μερική τάση του οξυγόνου είναι περίπου 60mmHg στις 16 εβδομάδες κύησης. Η αύξηση των επιπέδων του οξυγόνου συμβάλλει τόσο στην ανάπτυξη του εμβρύου όσο και στη σύνδεση της τροφοβλάστης στο φθαρτό. Η ελλειμματική παροχή οξυγόνου συνεπάγεται παρατεταμένη υποξία με επιβλαβείς δράσεις στο σχηματισμό της πλακουντικής αγγείωσης.

Ανώμαλη πλακουντοποίηση συμβαίνει σε προεκλαμπτικές ασθενείς όπως φαίνεται από ρηχό ή απώντα ανασχηματισμό των μητρικών σπειροειδών αρτηριών.

Οι ιστολογικές μελέτες έχουν δείξει πως ο φυσιολογικός ανασχηματισμός των σπειροειδών αρτηριών είναι ατελής (105,106).

Οι σπειροειδείς αρτηρίες του μυομητρίου διατηρούν το ενδοθήλιό τους και τα μυικά τοιχώματα. Η αποτυχία του αγγειακού ανασχηματισμού ίσως αποτελεί την αρχική αιτία της παθογένεσης της προεκλαμψίας. Είναι πιθανόν τα φθαρτικά φυσικά κυτταροκτόνα (natural killer) κύτταρα ή ενεργοποιημένα μακροφάγα ίσως να παίζουν ρόλο στον αγγειακό ανασχηματισμό κατά εγκυμοσύνη και αυτή η διαδικασία ίσως μεταβάλλεται στην προεκλαμψία (107).

4. ΣΗΜΑΣΙΑ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΥΗΣΗ

Η οικογένεια του VEGF περιλαμβάνει τους VEGF-A, PlGF, VEGF-C, VEGF-D και δύο που δεν εκφράζονται στα θηλαστικά (VEGF-E, VEGF-F).

Οι υποδοχείς του VEGF (VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk1), VEGFR-3) είναι tyrosine kinase υποδοχείς. Λειτουργούν με έναν ειδικό τρόπο μέσω φωσφορυλίωσης του υποστρώματος για τον ερεθισμό της κυτταρικής απάντησης. Μόνο ο VEGF-A αλληλεπιδρά με τον VEGFR-2, ενώ οι VEGF-C, VEGF-D αλληλεπιδρούν με τον VEGFR-3, που εκφράζεται κυρίως στο λεμφικό ενδοθήλιο.

Η ενδογλίνη είναι επιφανειακός κυτταρικός υποδοχέας για την οικογένεια του TGF (transforming growth factor). Αυτοί οι δύο παράγοντες είναι ισχυροί καταστολείς τροφοβλαστικής διαφοροποίησης (108).

Μία από τις υποθέσεις για ανάπτυξη προεκλαμψίας είναι η ανισορροπία των αγγειογενετικών παραγόντων, κυρίως υψηλά επίπεδα sFlt1 και sEng με χαμηλά επίπεδα των ελεύθερων PlGF και VEGF, οδηγώντας σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που εκδηλώνεται με τα κλινικά συμπτώματα της προεκλαμψίας. Τα επίπεδα του sFlt-1 είναι υψηλά στον ορό των ασθενών με προεκλαμψία τη στιγμή της κλινικής νόσου και φαίνεται πως είναι υψηλά δύο με πέντε εβδομάδες πριν την κλινική εμφάνιση (109).

Σε διάφορες μελέτες έχει φανεί πως η αύξηση του sFlt1 προηγείται της εμφάνισης της κλινικής νόσου και συνδέεται με τη σοβαρότητα της αυτής. Τα επίπεδα του sFlt1 στον ορό των ασθενών είναι υψηλότερα στη σοβαρή προεκλαμψία, στην πρώιμη εμφάνιση προεκλαμψίας και στην προεκλαμψία που συνδυάζεται με ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση. Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα των ελεύθερων VEGF, PlGF

είναι χαμηλότερες σε γυναίκες με προεκλαμψία σε σχέση με φυσιολογικές ασθενείς (110-112).

Επίσης, γυναίκες με παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση προεκλαμψίας έχουν φανεί πως έχουν υψηλά επίπεδα του υποδοχέα sFlt1. Πιο συγκεκριμένα, γυναίκες με δίδυμες κυήσεις έχουν επίπεδα του υποδοχέα διπλάσια απ' αυτά των γυναικών με μονήρες κυήσεις. Τέλος, τα επίπεδα του sFlt1 είναι υψηλότερα σε γυναίκες με μύλη κύηση (113,114).

Το γονίδιο για τον παράγοντα sFlt1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 και γυναίκες με έμβρυα με τρισωμία 13 έχουν αυξημένο κίνδυνο για προεκλαμψία και τα κυκλοφορούντα επίπεδα του sFlt1 είναι υψηλότερα και του PlGF χαμηλότερα σε ασθενείς των οποίων η εγκυμοσύνη επιπλέκεται με τρισωμία 13 (115).

Σε μελέτες *in vitro*, ο sFlt1 προκαλεί αγγειοσυστολή και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Πρόσφατα, φάνηκε πως το κλάσμα του VEGF, PlGF προς τον sFlt1 είναι χαμηλότερο σε εκχυλίσματα πλακούντα που προέρχονται από προεκλαμπτικούς ασθενείς. Τα υψηλά επίπεδα του υποδοχέα σε αντίθεση με αυτά των αγγειογενετικών παραγόντων οδηγούν σε αντιαγγειογενετική κατάσταση (116).

Η αύξηση του κλάσματος sFlt1/PlGF αποτελεί δείκτη αντιαγγειογενετικής δραστηριότητας που αντικατοπτρίζει αλλαγές και στους δύο δείκτες και αποτελεί καλύτερο προβλεπτικό παράγοντα για προεκλαμψία απ' ό,τι μία απλή μέτρηση.

Μία πρόσφατη μελέτη, έδειξε πως ο συνδυασμός ανώμαλου μητρικού αρτηριακού Doppler με χαμηλά επίπεδα του παράγοντα PlGF στο δεύτερο τρίμηνο, συνδεόταν στενά με πρόωμη εκδήλωση και σοβαρή προεκλαμψία (118).

Ένας ακόμα παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν κατά τη διάρκεια της πλακουντικής αγγείωσης είναι η δράση του τοπικού οξυγόνου κατά την εγκυμοσύνη. Το οξυγόνο αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ισορροπίας μεταξύ της λειτουργίας των VEGF και PlGF. Η υποξία έχει φανεί πως ανάγει την έκφραση του VEGF στους καρκίνους. Σε πλακουντικούς και χοριοαλλαντοϊκούς ιστούς, ο VEGF ευοδώνεται κατά την υποξία και καταστέλλεται στην υπεροξία.

Μία πετυχημένη πλακουντοποίηση εμπλέκει την ανάπτυξη χαμηλής αντίστασης μητροπλακουντική κυκλοφορία μετά από τροφοβλαστική εισβολή και μετατροπή του μητρικού ενδομυομητρικού τμήματος των σπειροειδών αρτηριών.

Η πρόωμη πλακουντική ανάπτυξη (στο πρώτο τρίμηνο) συμβαίνει σε συνθήκες σχετικής υποξίας (με έλλειψη αιματικής κυκλοφορίας), που ερεθίζει τον κυτταροτροφοβλαστικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την τροφοβλαστική

εισβολή. Πραγματική μεσολάχνια αιματική ροή εγκαθίσταται περίπου στις 10 με 12 εβδομάδες κύησης και καθώς ο πλακούντας εξελίσσεται κατά το δεύτερο τρίμηνο, η μητρική αιματική ροή ξεκινά και η μερική τάση του οξυγόνου αυξάνεται. Αυτή η σημαντική αύξηση στη μερική τάση του οξυγόνου, ίσως αποτελεί το ερέθισμα για την τροφοβλάστη να αλλάξει από την πολλαπλασιαστική της κατάσταση σε διεισδυτική εξωλάχνια τροφοβλάστη και την εγκατάσταση μητροπλακουντικής κυκλοφορίας χαμηλής αντίστασης. Όπως έχει προαναφερθεί, η αιμοχοριακή πλακουντοποίηση εξαρτάται από την εγκαθίδρυση και διατήρηση ενός εμβρυοπλακουντικού αγγειακού δικτύου μέσω της διακλαδωτικής αγγειογένεσης (πρώτου τριμήνου) και της μη διακλαδωτικής αγγειογένεσης (δεύτερου και τρίτου τριμήνου).

Στην προεκλαμψία και σε κάποιες περιπτώσεις ενδομήτριας υπολειπόμενης αύξησης, τα μητρικά αιματικά αγγεία δεν υφίστανται την κατάλληλη αγγειακή μετατροπή και έτσι ο ρυθμός μεταφοράς οξυγονωμένου αίματος στο έμβρυο μειώνεται. Αυτή η μητροπλακουντική ανεπάρκεια οδηγεί στην έννοια της πλακουντικής υποξίας σε αυτές τις δύο παθήσεις. Απόδειξη πλακουντικής υποξίας βασίζεται στην ιστολογική παρατήρηση παθολογικού πλακούντα με αύξηση του μιτωτικού δείκτη των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων και μειωμένο πάχος συγκιτιοτροφοβλάστης.

Σε εγκυμοσύνες με υπολειπόμενη αύξηση και μειωμένη ή απύουσα τελοδιαστολική ροή, η εικόνα του μειωμένου κυτταροτροφοβλαστικού πολλαπλασιασμού, αυξημένων συγκυτιακών πυρήνων και φτωχής πλακουντικής αιματικής ροής υποδηλώνει αυξημένο ρυθμό τροφοβλαστικού πολλαπλασιασμού και αδυναμία πλακουντιακής αγγειογένεσης. Από τη στιγμή που η υποξία υποβοηθά την αγγειογένεση, έχει υποτεθεί πως τα σχετικά υψηλά επίπεδα στο μεσολάχνιο χώρο σε συνάρτηση με πλακουντιακές λάχνες με ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση, θα περιορίσει την αγγειογένεση (118,119).

Η ανισοροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων όπως έχει προαναφερθεί παίζει ρόλο στους μηχανισμούς των νόσων και επιπλοκών της εγκυμοσύνης. Περίσσεια αντιαγγειογενετικών παραγόντων έχει αναφερθεί σε ασθενείς με προεκλαμψία, πλακουντιακή αποκόλληση, σύνδρομο HELLP, ανεξήγητο εμβρυικό θάνατο καθώς και σε γυναίκες με εμβρυική υπολειπόμενη αύξηση ή σε αυτές που γεννούν χαμηλού βάρους νεογνά. Αντίθετα, αυξημένη συγκέντρωση των αγγειογενετικών παραγόντων και κυρίως του VEGF έχει περιγραφεί στο σύνδρομο της υπερδιέγερσης των ωοθηκών κατά τη διάρκεια της

εγκυμοσύνης, που αφορά το 2,4% των εγκυμοσυνών μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση (120,121).

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η ατοκία, η δίδυμη κύηση, το κάπνισμα, αυξάνουν ή μειώνουν τον κίνδυνο προεκλαμψίας μπορεί να εξηγηθεί στη βάση των αλλαγών στη συγκέντρωση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων στον μητρικό ορό (122-125). Παρ' όλα αυτά, η αγγειογενετική ανισορροπία ίσως να μην είναι απαραίτητη ή αρκετή για την ανάπτυξη αυτής της επιπλοκής διότι δεν παρατηρούνται υψηλά επίπεδα αντιαγγειογενετικών παραγόντων σε όλους τους ασθενείς με προεκλαμψία (126).

Επίσης, οι αγγειογενετικές ανισορροπίες δεν περιορίζονται στους ασθενείς με προεκλαμψία ή με ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση. Πιο συγκεκριμένα, υψηλές συγκεντρώσεις των sVEGFR-1 ή s-Eng έχουν αναφερθεί σε ασθενείς με σύνδρομο της μετάγγισης από δίδυμο σε δίδυμο (128).

Αλλαγές των αγγειογενετικών παραγόντων στο μητρικό ορό συμβαίνουν ως γνωστό πριν την εμφάνιση της προεκλαμψίας. Πράγματι, υψηλές συγκεντρώσεις στον ορό/ πλάσμα των αντιαγγειογενετικών παραγόντων έχουν αναφερθεί στο πρώτο και δεύτερο τρίμηνο σε ασθενείς με προεκλαμψία. Επίσης, ο καθορισμός των αγγειογενετικών παραγόντων σε συνδυασμό με τη μέτρηση Doppler της μητρικής αρτηρίας παίζει σπουδαίο ρόλο στην αναγνώριση των ασθενών που δύνανται να εμφανίσουν προεκλαμψία. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός χαμηλής συγκέντρωσης στο πλάσμα της μητέρας του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα με ανώμαλο αρτηριακό Doppler στο δεύτερο τρίμηνο, αποτελεί μεγάλο κίνδυνο για την ανάπτυξη πρόωρης προεκλαμψίας (πριν τις 34 εβδομάδες).

Σε κλινικές και πειραματικές μελέτες, φαίνεται πως η υποξία / ισχαιμία ίσως να προάγει την πλακουντική υπερέκφραση και απελευθέρωση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων κατά την εγκυμοσύνη. Στο σύνδρομο μετάγγισης από δίδυμο σε δίδυμο η έκφραση του VEGFR-1 mRNA βρίσκεται στον δότη πλακούντα και στις λάχνες που παρουσιάζουν ισχαιμικές αλλαγές (128).

Στους ασθενείς με προεκλαμψία, όσο υψηλότερη είναι η αντίσταση της αιματικής ροής στις μητριάιες αρτηρίες, τόσο υψηλότερη η συγκέντρωση των αντιαγγειογενετικών παραγόντων στο πλάσμα της μητέρας. Παρ' όλα αυτά, άλλοι μηχανισμοί εκτός από την υποξία ίσως να εμπλέκονται στη διαδικασία μέσω της οποίας η τροφοβλαστική ισχαιμία βοηθά στην απελευθέρωση αντιαγγειογενετικών παραγόντων (129).

Σε ασθενείς με εμβρυική υπολειπόμενη αύξηση έχει παρατηρηθεί αυξημένη συγκέντρωση αντιαγγειογενετικών παραγόντων στο μητρικό πλάσμα. Επίσης, το εύρος της αγγειογενετικής διαταραχής συνδέεται με την σοβαρότητα της μητροπλακουντικής ισχαιμίας. Έχει βρεθεί πως ανάμεσα στις γυναίκες που γεννούν μικρά σε σχέση με την ηλικία εγκυμοσύνης νεογέννητα (SGA), όσο υψηλότερη είναι η αντίσταση στην αιματική ροή στις μητριάιες αρτηρίες, τόσο μεγαλύτερη είναι η πλασματική συγκέντρωση του VEGFR-1 στη μητέρα.

Έτσι, είναι πιθανό πως μία ανώμαλη τροφοβλαστική διείσδυση των σπειροειδών αρτηριών μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια τροφοβλαστική ισχαιμία, που μπορεί να περιορίσει την εμβρυική αύξηση και να προάγει αγγειογενετικές διαταραχές (130).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ

1. ΟΡΙΣΜΟΣ - ΣΥΣΤΑΣΗ

Στην αρχή της εγκυμοσύνης, το αμνιακό υγρό συνιστά διήθηση του μητρικού πλάσματος. Από την αρχή του δευτέρου τριμήνου, αποτελείται κυρίως από εξωκυττάριο υγρό, που διαχέεται μέσω του εμβρυικού δέρματος, και έτσι αντικατοπτρίζει την σύσταση του εμβρυικού πλάσματος. Μετά τις 20 εβδομάδες, ωστόσο η κερατινοποίηση του δέρματος εμποδίζει αυτή τη διάχυση και το αμνιακό υγρό παράγεται από τους εμβρυικούς νεφρούς. Οι εμβρυικοί νεφροί παράγουν ούρα από την 12η εβδομάδα και στις 18 εβδομάδες παράγουν 7-14 ml την ημέρα.

Τα εμβρυικά ούρα περιέχουν περισσότερη ουρία, κρεατινίνη και ουρικό οξύ απ' ότι το εμβρυικό πλάσμα. Είναι υπότονα με αποτέλεσμα τη μειωμένη ωσμωτικότητα του αμνιακού υγρού με την πάροδο της εγκυμοσύνης. Το αμνιακό υγρό εξάλλου περιέχει αποφολιδωμένα εμβρυικά κύτταρα, σμήγμα και διάφορες εκκρίσεις του εμβρυικού δέρματος. Τέλος, στη δημιουργία του αμνιακού υγρού συμβάλλουν ελάχιστα μεν το πνευμονικό υγρό περισσότερο δε η διήθηση υγρού μέσω του πλακούντα (131).

2. ΡΟΛΟΣ ΑΜΝΙΑΚΟΥ ΥΓΡΟΥ – ΟΓΚΟΣ ΑΝΑ ΗΛΙΚΙΑ ΚΥΗΣΗΣ

Το έμβρυο αναπτύσσεται μέσα στο αμνιακό υγρό, που του επιτρέπει να κινείται ενεργά αλλά και να προφυλάσσεται από πιθανό τραυματισμό. Η έλλειψη αμνιακού υγρού επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου και μπορεί να προκαλέσει παραμόρφωση των ώτων (Potter facies), ή και των άκρων. Ακόμη, δυσκολεύει τη θωρακική έκπτυξη και τις αναπνευστικές κινήσεις με συνέπεια την υποπλασία των πνευμόνων και ίνωση αυτών. Αυτά συνεπάγονται αναπνευστική δυσχέρεια και θάνατο.

Άλλες ιδιότητες του αμνιακού υγρού είναι η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στο περιβάλλον του εμβρύου αλλά και η προστασία του σε κάποιο βαθμό χάρη στις αντιβακτηριακές ιδιότητές του (132).

Όπως προαναφέρθηκε, η παραγωγή του αμνιακού υγρού κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης προέρχεται από τη διήθηση του μητρικού πλάσματος μέσω του συνδετικού ιστού στον αμνιοχοριακό χώρο. Έτσι, η αμνιακή κοιλότητα έχει υγρό

ακόμη και σε περιπτώσεις κνήματος με απουσία εμβρύου, καταστάσεις που ασφαλώς οδηγούνται στην αποβολή του κνήματος.

Κατά το δεύτερο τρίμηνο εγκαθίσταται ο λεγόμενος κύκλος του αμνιακού υγρού. Το αμνιακό υγρό αποτελείται κυρίως από τα ούρα των εμβρυικών νεφρών και λιγότερο από τα εκκρίματα των εμβρυικών πνευμόνων. Η μείωσή του επιτυγχάνεται με την εμβρυική κατάποση. Η ισορροπία του συστήματος αυτού προϋποθέτει φυσιολογική ανατομία και λειτουργικότητα τόσο του ουροποιητικού συστήματος όσο και του πεπτικού. Έτσι, σε έμβryo 28 εβδομάδων με σταθερή κατάποση αλλά με παραγωγή 1 ml ούρων την ώρα, το αμνιακό υγρό θα μειωθεί κατά 300 ml σε 3 εβδομάδες. Εξάλλου, έμβryo με απουσία φυσιολογικής κατάποσης ή εντερικής διέλευσης (π.χ. ατρησία οισοφάγου ή δωδεκαδακτύλου) μπορεί να συσσωρεύσει αμνιακό υγρό οδηγώντας σε πολυδράμιο.

Εδώ κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν παθολογικές καταστάσεις, που αφορούν το αμνιακό υγρό. Ο όγκος του συνδέεται άμεσα με την περιγεννητική θνησιμότητα, που έχει σαν αιτία εμβρυικές ανωμαλίες (νεφρική αγενεσία με ολιγουδράμιο, ατρησία δωδεκαδακτύλου ή οισοφάγου αλλά και σοβαρές νευρολογικές παθήσεις με πολυδράμιο). Το παθολογικό σωματικό βάρος του εμβρύου συνδυάζεται με ανωμαλίες του αμνιακού υγρού (ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση με ολιγουδράμιο, διαβητική μακροσωμία με πολυδράμιο).

Η παθολογία του αμνιακού υγρού έχει μεγάλη κλινική σημασία. Τα προαναφερθέντα αναλύονται στη συνέχεια.

Φυσιολογικά το αμνιακό υγρό αυξάνεται περίπου στο 1 λίτρο στις 36 εβδομάδες και μειώνεται στα 100-200 ml μετά τις 40 εβδομάδες κύησης. Μειωμένος όγκος υγρού λέγεται ολιγουδράμιο. Περισσότερο από 2 λίτρα αμνιακού υγρού αποτελεί ανωμαλία και λέγεται πολυδράμιο. Σε σπάνιες περιπτώσεις, η μήτρα μπορεί να περιέχει υπερβολική ποσότητα υγρού μέχρι και 15 λίτρα. Σε περίπτωση οξέος πολυδραμνίου, η μήτρα μπορεί να διαταθεί σημαντικά μέσα σε λίγες μέρες.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες υπερηχογραφικές μέθοδοι για τη μέτρηση του αμνιακού υγρού. Ο δείκτης αμνιακού υγρού είναι η πιο διαδεδομένη. Με αυτήν υπολογίζεται το άθροισμα των βαθύτερων τμημάτων σε καθένα από τα 4 τεταρτημόρια. Σαν σημαντικό πολυδράμιο χαρακτηρίζεται όποιο παρουσιάζει δείκτη άνω των 24 cm. Το πολυδράμιο απαντάται σε 1% των κνήσεων. Ο βαθμός του πολυδραμνίου καθώς και η πρόγνωσή του συνδέεται συχνά με την αιτία που το προκάλεσε. Σε παθολογικό πολυδράμιο, συνυπάρχουν

εμβρυικές ανωμαλίες κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος και του γαστρεντερικού συστήματος, π.χ. στις μισές περιπτώσεις ανεγκεφαλίας και ατρησίας του οισοφάγου παρατηρείται πολυυδράμνιο. Σε περιπτώσεις ηπίου πολυυδραμνίου η αιτία βρίσκεται μόνο στο 15% των περιπτώσεων. Αντίθετα σε σοβαρό πολυυδράμνιο η αιτία αποκαλύπτεται στο 90% των περιπτώσεων. Πιθανές αιτίες πολυυδραμνίου είναι επίσης ο μη ανοσολογικός ύδρωπας και χρωμοσομικές ανωμαλίες (ανευπλοειδία). Η παρουσία δείκτη αμνιακού υγρού άνω του 25 συνεπάγεται αύξηση της περιγεννητικής θνησιμότητας.

Σε περίπτωση αρύθμιστου σακχαρώδη διαβήτη στην κύηση το αυξημένο βάρος του νεογνού εμφανίζει γραμμική σχέση με τον όγκο του αμνιακού υγρού καταστάσεις που αυξάνουν τον κίνδυνου πρόωρου τοκετού, της δυστοκίας των ώμων, της ανώμαλης προβολής λόγω της υπερκινητικότητας του εμβρύου και της πρόωρης αποκόλλησης του πλακούντα από απότομη αποσυμπίεση της μήτρας. Όλα αυτά επιβάλλουν την άμεση αποπεράτωση του τοκετού με καισαρική τομή. Τέλος, στις επιπλοκές του πολυυδραμνίου συγκαταλέγεται και η ατονία της μήτρας μετά τον τοκετό που μπορεί να οδηγήσει σε κατακλυσμιαία αιμορραγία.

Θεραπευτικές μέθοδοι για την αντιμετώπιση του πολυυδραμνίου είναι η αμνιομείωση και η χρήση ινδομεθακίνης χωρίς όμως αυτές να έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα. Με την αφαίρεση του αμνιακού υγρού μπορούν να δημιουργηθούν βλάβες του κεντρικού νευρικού συστήματος αλλά και καρδιακά επεισόδια.

Η μειωμένη ποσότητα αμνιακού υγρού μπορεί να οφείλεται είτε στη μειωμένη παραγωγή είτε σε απώλεια. Το υπερηχογράφημα θα αποκαλύψει αν υπάρχουν εμβρυικοί νεφροί και λειτουργούν φυσιολογικά. Ακόμη, θα διαγνωστεί αν το ολιγουδράμνιο οφείλεται σε συνεχή απώλεια υγρού από πρόωμη ρήξη υμένων. Στη διάγνωση της τελευταίας επιπλοκής συμβάλλει και ο έλεγχος της αλκαλικότητας των κολπικών εκκρίσεων.

Στο ολιγουδράμνιο, τα υπερηχογραφικά ευρήματα είναι ασαφή λόγω έλλειψης εμβρυικής κινητικότητας και φωτεινής αντίθεσης. Το χρόνια ολιγουδράμνιο, που οφείλεται στην πρόωρη ρήξη των υμένων προκαλεί ανεπιθύμητες καταστάσεις στο έμβρυο όπως υποπλασία πνευμόνων αλλά και ανιούσα λοίμωξη από κολπική επιμόλυνση. Για το δεύτερο ειδικά η επιβάρυνση της κατάστασης επιδεινώνεται τόσο από την ποσότητα του υγρού που χάνεται όσο και από τον χρόνο που διαρκεί η ρήξη των υμένων.

Το oligουδράμνιο στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης επιβάλλει εγρήγορση. Όταν ο δείκτης αμνιακού υγρού είναι μικρότερος των 2 εκατοστών η άμεση πρόκληση του τοκετού αποτελεί την ενδεδειγμένη λύση. Χαμηλή συγκέντρωση του αμνιακού υγρού σε αυτή τη φάση μπορεί να οδηγήσει σε εμβρυική δυσχέρεια στον τοκετό με χαμηλό βαθμό Apgar, χαμηλό pH και κατά συνέπεια πολλές νεογνολογικές επιπλοκές ακόμη και ενδομήτριο θάνατο. Η αμνιοέγχυση βοηθά με την αποσυμπίεση του ομφαλίου λώρου στην αποτροπή επιβραδύνσεων των καρδιακών παλμών (καλύτερη οξυγόνωση του εμβρύου) και κατά το δυνατόν απρόσκοπτη πρόοδο του τοκετού. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η προσφυγή στην καισαρική τομή σε πολλές περιπτώσεις (133).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ - ΜΕΛΕΤΕΣ

Η παρουσία των αγγειογενετικών παραγόντων στο αμνιακό υγρό έχει αποδειχτεί με πρόσφατες μελέτες. Τόσο οι αγγειογενετικοί παράγοντες όσο και οι υποδοχείς τους στο αμνιακό υγρό έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές κυήσεις.

Στόχος μίας πρόσφατης μελέτης (134) ήταν η μέτρηση των VEGF, PlGF στο αμνιακό υγρό και στον ορό κατά την εγκυμοσύνη και ο προσδιορισμός των διαφόρων παραγόντων που πιθανόν να ρυθμίζουν τη λειτουργία τους.

Με τη μέθοδο ELISA μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις των VEGF και PlGF καθώς και των δεσμευτικών παραγόντων τους στον ορό του αίματος 22 μη εγκύων γυναικών και 55 εγκύων. Επίσης, μετρήθηκαν στο αίμα από ομφαλικές αρτηρίες και φλέβα καθώς και στο αμνιακό υγρό στις έγκυες γυναίκες.

Στη συγκεκριμένη μελέτη ο VEGF δεν ανιχνεύθηκε στον μητρικό ορό στην αρχή και στο τέλος της εγκυμοσύνης, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωσή του μετά τον τοκετό. Επίσης, προσθήκη VEGF στον ορό δεν ανιχνεύθηκε σε επόμενη μέτρηση γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία ενός παράγοντα που πιθανώς να δεσμεύει τον VEGF. Αυτή η δραστηριότητα παρατηρήθηκε επίσης και στο αμνιακό υγρό.

Στην έναρξη της εγκυμοσύνης η ικανότητα δέσμευσης του VEGF ήταν 50 φορές υψηλότερη στο αμνιακό υγρό απ'ότι στον μητρικό ορό. Επίσης, η δεσμευτική ικανότητα στο αμνιακό υγρό στο τέλος της εγκυμοσύνης ήταν διπλάσια αυτής του δευτέρου τριμήνου. Φαίνεται πως η δεσμευτική ικανότητα αυτού του παράγοντα συνδέεται με την ηλικία κύησης. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του δεσμευτικού αυτού παράγοντα στο αμνιακό υγρό υποδεικνύουν πως αυτός προέρχεται από το αμνιακό υγρό.

Φαίνεται λοιπόν πως μία ετεροδιμερής δεσμευτική πρωτεΐνη του VEGF εντοπίζεται τόσο στον μητρικό ορό όσο και στο αμνιακό υγρό. Οι συγκεντρώσεις της εξαρτώνται από την ηλικία κύησης, εξαφανίζεται μετά τον τοκετό και δεν ανιχνεύεται στον ομφάλιο λώρο. Δε δεσμεύει τον PlGF και δε φαίνεται να είναι ο γνωστός υποδοχέας του VEGF (134).

Σε μία άλλη μελέτη (135), μετρήθηκαν τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα VEGFR-1 του VEGF στο αμνιακό υγρό σε φυσιολογικές και επιπλεγμένες εγκυμοσύνες, όπως η προεκλαμψία, ο διαβήτης κύησης καθώς και η εμβρυική υπολειπόμενη αύξηση.

Σε φυσιολογικές κυήσεις με τη μέθοδο ELISA, η μέση τιμή του VEGFR-1 στο αμνιακό υγρό ήταν για το δεύτερο τρίμηνο 22 ng/ml (2.3-29.5ng/ml) υψηλότερη από εκείνη του τρίτου τριμήνου που ήταν 13ng/ml (0.5-32ng/ml, $P<0.05$). Σε διαβητικές γυναίκες, τα επίπεδα του VEGFR-1 στο αμνιακό υγρό εμφανίζονταν χαμηλότερα απ' ό τι σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες αλλά η διαφορά δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Επίσης, στο μητρικό πλάσμα του αίματος δε βρέθηκε συσχετισμός ανάμεσα στα επίπεδα στο μητρικό πλάσμα του διαλυτού υποδοχέα του VEGF και την σοβαρότητα του διαβήτη.

Σε γυναίκες με προεκλαμψία, τα επίπεδα του διαλυτού υποδοχέα του VEGF ήταν υψηλότερα απ' ό τι σε υγιείς εγκυμοσύνες ή σε διαβητικές κυήσεις ($P<0.05$, $P<0.001$) αντίστοιχα.

Σε εγκυμοσύνες με εμβρυική υπολειπόμενη αύξηση τα επίπεδα του VEGFR-1 στο αμνιακό υγρό ήταν ελαφρώς υψηλότερα απ' ό τι σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες. Τέλος, τα επίπεδα του VEGFR-1 δε συνδέονταν με την ηλικία κύησης, το εμβρυικό βάρος και το πλακουντιακό βάρος.

Φαίνεται λοιπόν πως τα επίπεδα του υποδοχέα του VEGF μπορεί να αποτελούν ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο της προεκλαμψίας (135). Φάνηκε επίσης πως ο πλακούντας είναι η πηγή του διαλυτού υποδοχέα του VEGF χωρίς όμως να μπορεί να πιστοποιηθεί πως εκκρίνεται στο αμνιακό υγρό ή πως είναι η μοναδική πηγή προέλευσής του. Οι εμβρυικές μεμβράνες ή τα ούρα ίσως αποτελούν πιθανές πηγές.

Όπως έχει προαναφερθεί, η φυσιολογική αγγειογένεση ρυθμίζεται από τη μερική τάση του οξυγόνου και από τους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο VEGF. Η χαλαρωτική δράση στον αρτηριακό τόνο επιτυγχάνεται μέσω σύνθετης αλληλεπίδρασης πολλών αγγειοενεργών ουσιών. Έχει περιγραφεί πως η αυξημένη ενδοθηλιακή παραγωγή των αγγειοδιασταλτικών ουσιών, όπως το μονοξείδιο του αζώτου από το ενδοθήλιο στην εγκυμοσύνη ίσως είναι υπεύθυνο για την απώλεια της αγγειακής απάντησης σε ισχυρές αγγειοσυσπαστικές ουσίες. Πιθανή διαταραχή των αγγειοενεργών ουσιών μπορεί να καταστείλει την φυσιολογική αγγειογένεση και να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις.

Σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη (136), εξετάστηκε κατά πόσο οι συγκεντρώσεις του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και του VEGF στα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης

συνδέονται με την εκδήλωση προεκλαμψίας. Εξετάστηκαν οι VEGF και NO στο δεύτερο τρίμηνο στο αμνιακό υγρό 15 φυσιολογικών γυναικών και 15 γυναικών με προεκλαμψία. Στις γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία οι συγκεντρώσεις του VEGF (213.19+-78.42pg/ml) και του NO (4.31+-1.02 μ mol/mgcreatinine) ήταν σημαντικά χαμηλότερες απ' ό τι στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες (P<0.05).

Έχει παρατηρηθεί ότι το μονοξειδίο του αζώτου και η δυσλειτουργική παραγωγή του είναι χαρακτηριστική των προεκλαμπτικών γυναικών με ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση και επόμενη αγγειοσύσπαση προκαλώντας ελάττωση στην μητροπλακουντική κυκλοφορία (137,138).

Στη μελέτη των Tranquilli et al (136), παρατηρείται ελάττωση των NO, VEGF στο δεύτερο τρίμηνο στο αμνιακό υγρό σε γυναίκες που στη συνέχεια εμφάνισαν προεκλαμψία, αλλά που είχαν φυσιολογική αρτηριακή πίεση τη στιγμή της λήψης του αμνιακού υγρού, στα πρώτα στάδια της τροφοβλαστικής ανάπτυξης. Είναι γνωστό πως η ανεπαρκής τροφοβλαστική διείσδυση των μητρικών σπειροειδών αρτηριών συμβάλλει στην ανάπτυξη της προεκλαμψίας.

Το NO είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση χαμηλών αντιστάσεων στον πλακούντα, επιτρέποντας μία φυσιολογική ανταλλαγή οξυγόνου/διοξειδίου του άνθρακα και θρεπτικών ουσιών μεταξύ μητέρας και εμβρύου.

Διαταραχή της παραγωγής του NO, του VEGF ή και των δύο στην αρχή της εγκυμοσύνης, δύναται να οδηγήσει σε ανώμαλη πλακουντιακή ανάπτυξη και λειτουργία και σχετικές νόσους. Μπορεί επίσης να υποτεθεί πως ο VEGF, εκτός από τη δράση του στην αγγειακή διαπερατότητα και πολλαπλασιασμό, έχει και αγγειοδιασταλτική δράση που ευνοείται από την συνθήκη του NO μέσω αύξησης του ενδοθηλιακού ενδοκυτταρικού ασβεστίου (137,138).

Στην πρώιμη φάση της εγκυμοσύνης, χαμηλές συγκεντρώσεις του NO αντιπροσωπεύουν μειωμένη αγγειογένεση που μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη πλακουντοποίηση. Στη μελέτη αυτή ωστόσο έχει σημασία να αναφερθεί πως ο πληθυσμός αφορούσε γυναίκες ηλικίας άνω των 35 ετών, στοιχείο που από μόνο του αποτελεί κίνδυνο προεκλαμψίας (138).

Ως γνωστόν όταν η αγγειογένεση υπολείπεται μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη πλακουντοποίηση και εμβρυικό θάνατο. Σε συνέχεια της προαναφερθείσας μελέτης, μελετήθηκαν οι VEGF και NO και κατά πόσο αυτοί συνδέονται με τον εμβρυικό θάνατο (139). Αναδρομικά εξετάστηκαν το NO και ο VEGF στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου σε 7 γυναίκες που παρουσίασαν εμβρυικό θάνατο πριν από τις 20

εβδομάδες και συγκρίθηκαν με 14 φυσιολογικές γυναίκες. Όλες οι γυναίκες υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση λόγω ηλικίας. Όλες ήταν στις 16 εβδομάδες κύησης. Σε καμία απ' αυτές το έμβρυο δεν εμφάνισε χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Στις γυναίκες με εμβρυικό θάνατο παρουσιάστηκαν επίπεδα NO σημαντικά χαμηλότερα απ' ότι σε γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη. Επίσης, τα επίπεδα του VEGF στο αμνιακό υγρό ήταν χαμηλότερα σε γυναίκες με εμβρυικό θάνατο σε σχέση με φυσιολογικές γυναίκες, αλλά αυτά τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά (139).

Συμπερασματικά, πρόωρη μείωση τόσο του NO όσο και του VEGF ίσως είναι υπεύθυνες για τη δυσλειτουργία της πλακουντιακής αγγειακής ανάπτυξης και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας που μπορεί να οδηγήσει σε εμβρυικό θάνατο (139).

Η προεκλαμψία, ως γνωστόν σαν πολυσυστηματική διαταραχή χαρακτηρίζεται από υπέρταση και πρωτεϊνουρία και προκαλείται από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και ενδοαγγειακή φλεγμονή. Πλακουντιακοί παράγοντες απελευθερώνονται στην κυκλοφορία της μητέρας προκαλώντας ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Ο sFlt-1, καταστολέας του VEGF και του PlGF εμπλέκεται στην παθογένεση της προεκλαμψίας.

Σε άλλη μελέτη (140), καθορίστηκε αν υψηλή συγκέντρωση του παράγοντα sFlt-1 στο μητρικό πλάσμα και στο αμνιακό υγρό τη στιγμή της αμνιοκέντησης στο δεύτερο τρίμηνο αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση προεκλαμψίας.

Μελετήθηκαν 32 ασθενείς με προεκλαμψία (18 από τους οποίους με σοβαρή προεκλαμψία) και 128 φυσιολογικές εγκυμοσύνες. Ασθενείς με ανώμαλο εμβρυικό καρύοτυπο, πολύδυμες κυήσεις, χρόνια υπέρταση, διαβήτη και νεφρική νόσο αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Η μέση συγκέντρωση του παράγοντα sFlt-1 στο μητρικό πλάσμα και όχι στο αμνιακό υγρό σε ασθενείς που εμφάνισαν προεκλαμψία ήταν σημαντικά υψηλότερη απ' ότι σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες ($P < 0.05$). Επίσης, η μέση πλασματική συγκέντρωση του sFlt-1 ήταν υψηλότερη σε περιπτώσεις σοβαρής προεκλαμψίας σε σχέση με αυτές με ήπια προεκλαμψία χωρίς όμως να υπάρχει στατιστική σημασία ($P = 0.07$). Ωστόσο, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στη μέση τιμή του sFlt-1 στο αμνιακό υγρό ($P = 0.45$).

Τέλος, η τιμή της συγκέντρωσης του υποδοχέα στο μητρικό πλάσμα άνω των 700pg/mL αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση προεκλαμψίας μετά από αμνιοκέντηση. Το μέσο διάστημα από την αμνιοπαρακέντηση μέχρι τη διάγνωση της

προεκλαμψίας σε ασθενείς με συγκεντρώσεις του sFlt-1 στο μητρικό πλάσμα άνω των 700pg/ml ήταν 117 ημέρες (140).

Η μέση τιμή του παράγοντα αυτού στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν χαμηλότερη απ' ό,τι σε μία μελέτη των Levine et al (141). Χαρακτηριστικά φυσιολογικών εγκύων γυναικών ανάμεσα σ' αυτή τη μελέτη και σ' εκείνη του Levine διέφεραν, όσον αφορά την ηλικία της μητέρας και το δείκτη μάζας σώματος.

Βρέθηκε πως η μέση τιμή της συγκέντρωσης του sFlt-1 στο πλάσμα του αίματος στο δεύτερο τρίμηνο κύησης σε γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία είναι υψηλότερη σε σχέση με τις γυναίκες που είχαν φυσιολογική εγκυμοσύνη (141).

Η τρισωμία 21 χαρακτηρίζεται από τροφοβλαστική υποπλασία και υποαγγείωση. Έτσι, σε μία μελέτη (142), εξετάστηκαν οι VEGF, PlGF και συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις τους στον μητρικό ορό και σε πλακουντιακά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα και συγκρίθηκαν ανάμεσα σε εγκυμοσύνες με σύνδρομο Down και ευπλοειδικές φυσιολογικές εγκυμοσύνες.

Μητρικός ορός συλλέχτηκε από 102 ευπλοειδικές εγκυμοσύνες και 24 με τρισωμία 21 μεταξύ 15 και 20 εβδομάδων κύησης και ελέγχθηκαν για αυτούς τους δύο παράγοντες με τη μέθοδο ELISA. Επίσης, ελέγχθηκαν πλακουντιακά εκχυλίσματα από 15 φυσιολογικές εγκυμοσύνες και 6 με τρισωμία 21.

Ο VEGF δε βρέθηκε στον μητρικό ορό ενώ ο PlGF βρέθηκε να αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία κύησης. Επίσης, τόσο ο VEGF όσο και ο PlGF ανιχνεύθηκαν στα πλακουντιακά εκχυλίσματα χωρίς μεταβολή ανάλογα με την ηλικία κύησης. Οι πλακούντες των γυναικών με σύνδρομο Down εμβρύου είχαν μικρότερη συγκέντρωση PlGF σε σχέση με τους φυσιολογικούς πλακούντες, ωστόσο δε βρέθηκε διαφορά στον VEGF του πλακούντα.

Οι μειωμένες συγκεντρώσεις του PlGF σε εγκυμοσύνες με σύνδρομο Down συμβάλλουν στις ιστοπαθολογικές ανωμαλίες που χαρακτηρίζουν τον πλακούντα στην τρισωμία 21.

Στη μελέτη αυτή εκφράζεται η υπόθεση πως οι χαμηλές συγκεντρώσεις του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αγγειακή διαπερατότητα των εμβρυικών πλακουντιακών αγγείων και έτσι να παίξουν ρόλο στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό οδηγώντας σε ορμονικές αλλαγές στον ορό γυναικών με τρισωμία 21. Ο PlGF θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο μητρικό βιοδείκτη στον ορό για το σύνδρομο Down (142).

Γυναίκες που εμφάνισαν εγκυμοσύνη με σύνδρομο Down έχουν μελετηθεί ως προς τους αγγειογενετικούς παράγοντες και στο αμνιακό υγρό (143). Οι Tranquilli et al. ερεύνησαν τον VEGF και το NO σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες και σε εγκυμοσύνες που επιπλέκονται με τρισωμία 21. Πιο συγκεκριμένα, σε μία αναδρομική εργασία μελετήθηκε το αμνιακό υγρό δευτέρου τριμήνου 15 γυναικών με σύνδρομο Down και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με 15 φυσιολογικές γυναίκες. Στις εγκυμοσύνες με τρισωμία 21, τα επίπεδα του NO ήταν σημαντικά υψηλότερα απ' ότι σε φυσιολογικές γυναίκες ($P < 0.001$) ενώ τα επίπεδα του VEGF ήταν σημαντικά χαμηλότερα απ' ότι στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες ($P < 0.05$). Φαίνεται λοιπόν πως τα ψηλά επίπεδα του NO και τα χαμηλά επίπεδα του VEGF στο αμνιακό υγρό κύησης με σύνδρομο Down ίσως να αποτελεί σημείο διαταραχής πλακουντιακής αγγείωσης και αλλοίωσης της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Υπερπαραγωγή του NO οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, διαδικασία που έχει φανεί σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (143).

Η προεκλαμψία αποτελεί μία κατάσταση που περιλαμβάνει ρηχή πλακουντοποίηση με ανώμαλη μητροπλακουντιακή ανάπτυξη (144). Οι αντιαγγειογενετικές πρωτεΐνες sFlt-1 και endoglin είναι οι πιθανοί παράγοντες που απελευθερώνονται σε περίσσεια από τον πλακούντα στην προεκλαμψία (141,145). Ο sFlt-1 συνδέεται και μειώνει τα επίπεδα των ελεύθερα κυκλοφορούντων αγγειογενετικών παραγόντων VEGF και PlGF. Η περίσσεια του s-Eng καταστέλλει τις αγγειογενετικές δράσεις του b-TGF. Και οι δύο αντιαγγειογενετικοί αυτοί παράγοντες διακόπτουν την ενδοθηλιακή λειτουργία καταστέλλοντας την αγγειοδιαστολή. Στην προεκλαμψία, διαταραχή των μητρικών αγγειογενετικών παραγόντων προκαλεί ανάπτυξη υπέρτασης και λευκωματουρίας μέσω ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Οι αγγειογενετικοί παράγοντες μπορούν να προβλέψουν την κλινική εμφάνιση της προεκλαμψίας και συνδέονται με τη σοβαρότητα της ασθένειας και την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Οι συγκεντρώσεις του αγγειογενετικού παράγοντα PlGF είναι ψηλότερες, ενώ οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες sEng και sFlt-1 και το κλάσμα sFlt-1/PlGF είναι συχνά χαμηλότερο σε φυσιολογικές απ' ότι σε προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες.

Επίσης, έχει υποτεθεί πως άλλα χαρακτηριστικά της μητέρας, του εμβρύου και της κύησης ίσως συνδέονται με το μητρικό αντιαγγειογενετικό προφίλ.

Σε άλλη μελέτη (147), αναλύθηκαν η σχέση των χαρακτηριστικών της κύησης και των συγκεντρώσεων του αγγειογενετικού παράγοντα PlGF στο μητρικό ορό, και των αντιαγγειογενετικών παραγόντων sFlt-1 και sEng καθώς και τα κλάσματα sFlt-

1/PIGF και (sFlt-1+sEng)/PIGF σε 43 φυσιολογικές και σε 44 προεκλαμπτικές εγκυμοσύνες.

Στις προεκλαμπτικές γυναίκες, βρέθηκε πως οι αντιαγγειογενετικοί παράγοντες και τα κλάσματα που προαναφέρθηκαν ήταν υψηλά σε συγκέντρωση ενώ ο PIGF ήταν μειωμένος σε σχέση με τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες. Επίσης, σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες η αυξανόμενη ηλικία μητέρας βρέθηκε να συνδέεται με ένα αντιαγγειογενετικό προφίλ, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις του PIGF και υψηλότερο κλάσμα (sFlt-1+sEng)/PIGF ($P<0.05$). Στην προεκλαμψία, μικρότερη διάρκεια εγκυμοσύνης και χαμηλότερο βάρος γέννησης συνδεόταν με αντιαγγειογενετικό προφίλ (146).

Όπως έχει φανεί και από άλλες μελέτες, το κλάσμα sFlt-1/PIGF είναι δείκτης αντιαγγειογενετικής δραστηριότητας και αντικατοπτρίζει τόσο την αυξημένη συγκέντρωση του sFlt-1 όσο και τη μειωμένη συγκέντρωση του PIGF και φαίνεται πως μπορεί να προβλέψει την προεκλαμψία (146,147). Από τα στοιχεία αυτής της μελέτης φαίνεται πως υπάρχει συσχετισμός ανάμεσα στην μητρική ηλικία και το αντιαγγειογενετικό προφίλ σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες αλλά αυτός ο συσχετισμός δε βρέθηκε όσον αφορά τις εγκυμοσύνες που χαρακτηρίζονται από μικρότερη διάρκεια κύησης και χαμηλότερο βάρος νεογνού.

Στις φυσιολογικές κυήσεις, το αντιαγγειογενετικό προφίλ στον μητρικό ορό δε βρέθηκε να συνδυάζεται με το βάρος νεογνού. Αυτό δείχνει πως οι μητρικές αγγειογενετικές μεταβολές έχουν ίσως μικρή επίδραση στην περιγενετική υγεία. Ωστόσο, το υλικό ήταν σχετικά μικρό για να εξεταστεί μία τέτοια πιθανή σχέση (147).

Τα στοιχεία της μελέτης δείχνουν πως σε προεκλαμπτικές γυναίκες επικρατεί ένα αντιαγγειογενετικό προφίλ με κλινικά χαρακτηριστικά σοβαρής νοσηρότητας.

Ο διεισδυτικός πλακούντας είναι μία επιπλοκή της εγκυμοσύνης που χαρακτηρίζεται από μητροπλακουντιακή νεοαγγείωση που μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για τη ζωή. Ως γνωστόν, οι VEGF, PIGF και οι υποδοχείς VEGFR παίζουν σημαντικό ρόλο στον αγγειακό ανασχηματισμό. Σε μία μελέτη (148), ερευνήθηκε η διαφορική έκφραση αυτών των πρωτεϊνών σε συμφυτικούς πλακούντες και σε φυσιολογικούς. Η έκφραση του υποδοχέα VEGFR-2 στην συγκιτιοτροφοβλάστη ήταν σημαντικά χαμηλότερη στις περιπτώσεις συμφυτικού πλακούντα τόσο στο δεύτερο όσο και στο τρίτο τρίμηνο. Επίσης, με τη μέθοδο ELISA στον πλακούντα, γυναίκες με συμφυτικό πλακούντα παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις VEGF και

χαμηλότερες VEGFR-2 απ' ότι γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη. Αντίθετα, οι PlGF και VEGFR-1 δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή στις δύο ομάδες μελέτης. Παρατηρήθηκε λοιπόν αυξημένη έκφραση του VEGF καθώς και ελάττωση των ειδικών υποδοχέων VEGFR-2 σε εγκυμοσύνες με συμφυτικό πλακούντα. Η μελέτη δείχνει πως η μητροπλακουντιακή νεοαγγείωση, χαρακτηριστική του συμφυτικού πλακούντα συνδέεται με αυτές τις μοριακές μεταβολές (148).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δημιουργία αγγειακού συμπλέγματος είναι βασική για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των οργάνων κατά την εμβρυογένεση καθώς και για τη φυσιολογική πλακουντοποίηση. Η αγγειογένεση ελέγχεται σε τοπικό επίπεδο από αγγειογενετικούς και αντιαγγειογενετικούς παράγοντες, που δρουν με παρακρινή ή αυτοκρινή δράση.

Μεταξύ των αγγειογενετικών παραγόντων εξέχουσα θέση κατέχει ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (PIGF).

Συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό και στην ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα των νεοσχηματισμένων αγγείων. Οι αγγειογενετικοί παράγοντες έχουν βρεθεί στον ορό του αίματος αλλά και στο αμνιακό υγρό.

Σε σημαντικές παθήσεις της κύησης όπως προεκλαμψία και ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση που χαρακτηρίζονται από ελάττωση της μητροπλακουντικής κυκλοφορίας, παρατηρείται διαταραχή στην έκφραση αυτών των παραγόντων.

Ο PIGF έχει μελετηθεί στο δεύτερο τρίμηνο φυσιολογικών κυήσεων στον ορό του αίματος των γυναικών σε σχέση με τον δείκτη μάζας σώματος, τον αριθμό προηγηθείσων κυήσεων, την εθνικότητα και το βάρος νεογνού (147).

Ο καθορισμός των επιπέδων αναφοράς των προς μελέτη παραγόντων στο αμνιακό υγρό δευτέρου τριμήνου και η πιθανή συσχέτισή τους με μητρικά και νεογνολογικά χαρακτηριστικά σε φυσιολογικές κυήσεις πιθανώς να φανούν χρήσιμα στην έγκαιρη διάγνωση και πρόληψη παθολογικών κυήσεων στο μέλλον.

II. ΥΠΟΘΕΣΗ-ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διατριβή έχει σκοπό να αναδείξει τις τιμές αναφοράς των παραγόντων VEGF και PIGF στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου κύησης και πιθανούς συσχετισμούς των συγκεντρώσεών τους με μητρικά χαρακτηριστικά, όπως δείκτης μάζας σώματος, τρόπος ζωής, εθνικότητα καθώς και με μαιευτικές και νεογνολογικές παραμέτρους. Η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για τη σύγκριση των τιμών των παραγόντων αυτών με τις αντίστοιχες παθολογικών κυήσεων. Η ομάδα

μελέτης αποτελείται από φυσιολογικές τελειόμηνες εγκυμοσύνες, ώστε να αποκλειστούν οι συχνές επιπλοκές που συνδέονται με διαταραχή της αγγειογενετικής κατάστασης.

III. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Η επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Αρεταίειου Νοσοκομείου ενέκρινε το πρωτόκολλο της διατριβής, που έγινε σε συνεργασία με το Μαιευτήριο «Λητώ», στο οποίο συλλέχθηκε το υλικό της μελέτης. Επιπλέον, γραπτή συγκατάθεση λήφθηκε από όλες τις γυναίκες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη.

Σε μία περίοδο 16 μηνών πραγματοποιήθηκε αμνιοπαρακέντηση σε 227 γυναίκες με μονήρεις κυήσεις για εμβρυικό γενετικό έλεγχο, κυρίως λόγω ηλικίας και οικογενειακού ιστορικού γενετικών διαταραχών.

Οι γυναίκες που πληρούσαν τα κριτήρια της μελέτης είχαν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- 1) Διάρκεια κύησης άνω των 37 εβδομάδων
- 2) Γέννηση νεογνού φυσιολογικού βάρους για την ηλικία κύησης (βάρος γέννησης μεταξύ της 11ης και της 90ής προσαρμοσμένης εκατοστιαίας θέσης) σε σχέση με τους παράγοντες που καθορίζουν το ενδογενές δυναμικό αύξησης, δηλ. το μητρικό ύψος, το βάρος στην αρχή της εγκυμοσύνης, την εθνικότητα, τον τόκο, την ηλικία κύησης, το βάρος γέννησης και το φύλο.
- 3) Απουσία υπέρτασης, διαβήτη, ή άλλων ιατρικών ή μαιευτικών επιπλοκών, όπως ενεργός κολπική αιμορραγία, χρόνια νεφρική, καρδιακή ή ηπατική νόσος, χρόνια αναπνευστική ανεπάρκεια, θυροειδικές και ανοσολογικές νόσοι και συγγενείς ή επίκτητες θρομβοφιλικές διαταραχές.
- 4) Πολύδυμες κυήσεις και κυήσεις με ανώμαλο καρυότυπο αποκλείστηκαν επίσης από τη μελέτη.

Δημογραφικοί και ανθρωπομετρικοί παράγοντες, καθώς και τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής και το ατομικό ιστορικό ελήφθησαν από όλες τις γυναίκες. Σχετικά με το κάπνισμα πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός σε ομάδες που περιελάμβαναν γυναίκες που δεν κάπνισαν ποτέ, γυναίκες που κάπνισαν στο παρελθόν και το διέκοψαν πριν

την τελευταία έμμηνο ρύση προ της κύησης, γυναίκες που κάπνιζαν λιγότερο από 10 τσιγάρα την ημέρα και τέλος γυναίκες που κάπνιζαν πάνω από 10 τσιγάρα την ημέρα. Το ύψος και το βάρος των γυναικών πριν την κύηση χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του δείκτη μάζας σώματος και βάσει αυτού οι γυναίκες κατηγοριοποιήθηκαν σε λιπόσαρκες, φυσιολογικές, υπέρβαρες και παχύσαρκες.

Η ηλικία κύησης υπολογίσθηκε με βάση την τελευταία έμμηνο ρύση και επιβεβαιώθηκε με υπερηχογραφική μέτρηση της αμφιβρεγματικής διαμέτρου και του μήκους του μηριαίου οστού.

Αμνιοπαρακέντηση υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση για κλασσικές γενετικές ενδείξεις πραγματοποιήθηκε υπό άσηπτες συνθήκες. Ελήφθησαν κατά μέσο όρο 20ml αμνιακού υγρού και κανένα από τα δείγματα δεν περιείχε μητρικό αίμα. Το αμνιακό υγρό χωρίστηκε σε 3 τμήματα. Το μεγαλύτερο μέρος (15ml) χρησιμοποιήθηκε για τον καρυότυπο. Το δεύτερο τμήμα (περίπου 2 ml), ελέγχθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για το Mycoplasma Hominis, το Chlamydia Trachomatis και για την καλλιέργεια αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων. Το τρίτο τμήμα (περίπου 3 ml) φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στους 4 βαθμούς Κελσίου. Το υπερκείμενο υγρό αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια πολυπροπυλαινίου στους - 80 βαθμούς Κελσίου.

Ο καθορισμός των συγκεντρώσεων των VEGF και PlGF πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA (Orgenium Laboratories, Tiilite 3 FIN-07120, Vantaa, Finland και DRG Instruments, Frauenberstr 18 D-35039, Marburg, Germany, αντίστοιχα).

Οι ελάχιστες ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις intra και inter assay coefficients of variation ήταν < 5pg/ml, <6% και 10% για τον VEGF, <1.062 pg/ml, 2,83% και 4.10% για τον PlGF αντίστοιχα.

IV. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα δεδομένα σχετικά με τους παράγοντες VEGF και PlGF παρουσίαζαν μη φυσιολογική κατανομή και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές διαδικασίες (Kolmogorov-Smirnov test).

Το Mann Whitney U τεστ χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσει την επίδραση της ηλικίας της μητέρας και της ηλικίας κύησης τόσο κατά την αμνιοπαρακέντηση όσο και κατά

τον τοκετό, του βάρους του εμβρύου και των άλλων προαναφερθέντων παραγόντων στις συγκεντρώσεις των VEGF και PlGF. Ο συντελεστής συσχετισμού Spearman χρησιμοποιήθηκε για να εξετασθούν πιθανοί θετικοί ή αρνητικοί συσχετισμοί.

Τιμές $P < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 11.5.

V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Είκοσι μία γυναίκες αποκλείστηκαν από τη μελέτη, λόγω αδυναμίας εκπλήρωσης των απαραίτητων κριτηρίων. Έτσι, ο προς μελέτη πληθυσμός αποτελείτο από 206 συμμετέχουσες. Τα χαρακτηριστικά αυτού του πληθυσμού φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 1.

Τα επίπεδα αναφοράς (μέση τιμή) ήταν 126.56 (45.30-518.92) pg/ml και 18.81 (5.61-168.61) pg/ml για τις συγκεντρώσεις των VEGF και PlGF αντίστοιχα. Η κατανομή των συγκεντρώσεων των VEGF και PlGF στο αμνιακό υγρό στο δεύτερο τρίμηνο φαίνονται στις εικόνες 1 και 2.

Οι συγκεντρώσεις τόσο του VEGF όσο και του PlGF στο αμνιακό υγρό αυξάνονταν με την αύξηση της ηλικίας κύησης ($r=0.173$, $p=0.013$ και $r=0.255$, $p<0.001$ αντίστοιχα) κατά τη στιγμή της αμνιοκέντησης.

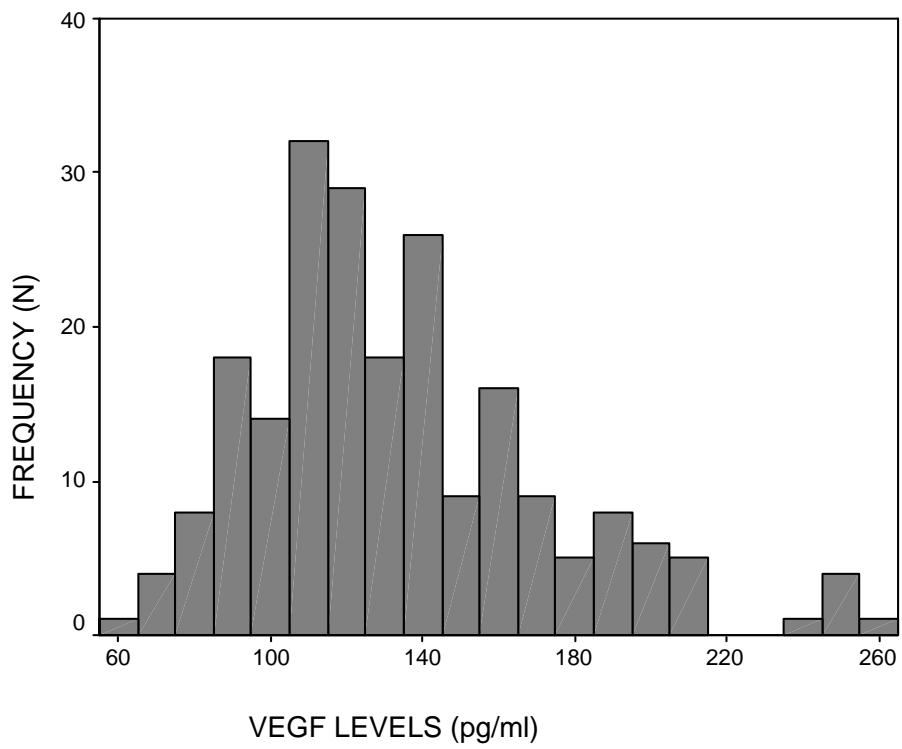
Επίσης, οι συγκεντρώσεις του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα (PlGF) παρουσίαζαν θετικό συσχετισμό με το βάρος γέννησης ($r=0.154$, $p=0.027$).

Η επίδραση της μητρικής ηλικίας και του βάρους, του δείκτη μάζας σώματος, της φυλής, του τόκου, του καπνίσματος και του είδους τοκετού καθώς και του εμβρυικού φύλου στις συγκεντρώσεις των παραγόντων αυτών στο αμνιακό υγρό, δεν ήταν σημαντική.

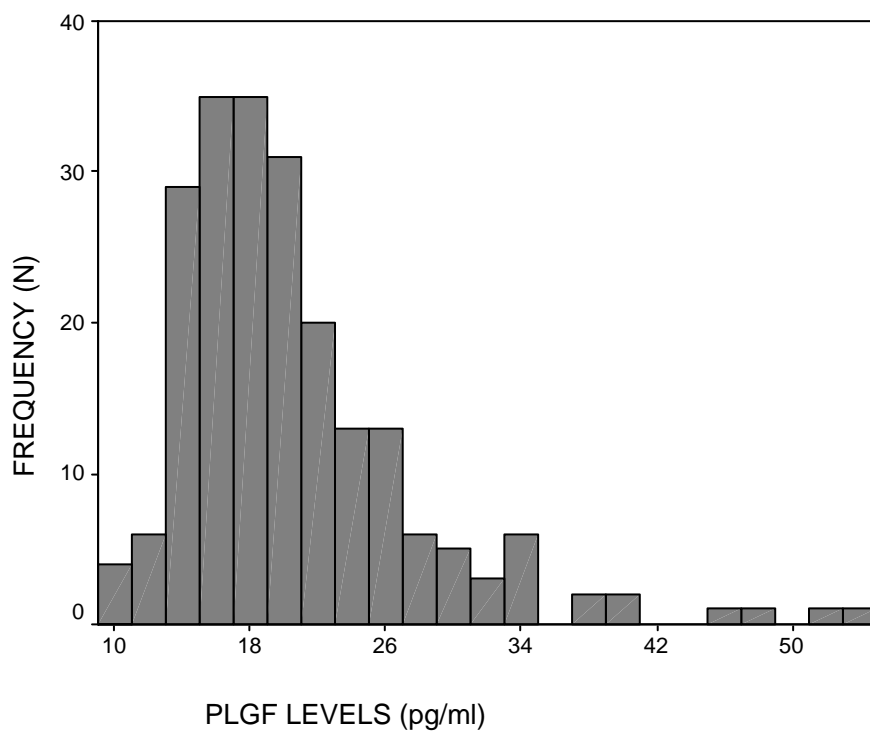
Πιν. 1. Χαρακτηριστικά κυήσεων, μητέρων και νεογνών στον μελετηθέντα πληθυσμό

	Μέση τιμή- Σταθερή απόκλιση
Ηλικία μητέρας(έτη)	37 (21-50)
Βάρος μητέρας (κιλά)	63.78±11.05
Ύψος μητέρας (μέτρα)	1.66±0.13
Δείκτης μάζας σώματος	22.9(16.0-41.2)
Ηλικία κύησης κατά την αμνιοκέντηση (εβδομάδες)	17.56 (14.72-25)
Ηλικία κύησης κατά τον τοκετό (εβδομάδες)	38.53 (37.0-41)
Βάρος γέννησης (γραμμάρια)	3220.39±301.8
Προσαρμοσμένη εκατοστιαία θέση	40 (11-90)
Δείκτης μάζας σώματος (ανά κατηγορία) N (%)	
Λιποβαρείς	6 (2.9)
Φυσιολογικές	143 (69.4)
Υπέρβαρες	47 (22.8)
Παχύσαρκες	10 (4.9)
Εθνικότητα (%)	
Ελληνική	199 (99.6)
Άλλη	7 (3.4)
Τόκος N (%)	
Πρώτος	93 (45.1)
Άλλος	113 (54.9)
Φύλο N (%)	
Άρρεν	112 (54.4)
Θήλυ	94 (45.6)
Είδος τοκετού N (%)	
Κολπικός	93 (45.1)
Καισαρική τομή	113 (54.9)
Κάπνισμα N (%)	
Γυναίκες που δεν κάπνισαν ποτέ	141 (68.5)
Πρώην καπνίστριες	47 (22.8)
Καπνίστριες πριν/κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (<10/μέρα)	5 (3.4)
Καπνίστριες πριν/κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (>10/μέρα)	13 (6.3)

Εικόνα 1. Κατανομή VEGF στο αμνιακό υγρό 2^{ου} τριμήνου κύησης



Εικόνα 2. Κατανομή PLGF στο αμνιακό υγρό 2^ο τριμήνου κύησης



VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα στοιχεία αυτής της μελέτης δείχνουν τιμές αναφοράς στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου των δύο παραγόντων VEGF, PlGF. Επίσης, η παραπάνω μελέτη ερευνά πιθανούς συσχετισμούς ανάμεσα στους γνωστούς παράγοντες κινδύνου για επιπλοκές στην εγκυμοσύνη και συγκεντρώσεις των αγγειογενετικών παραγόντων στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες.

Πιο συγκεκριμένα, τα ευρήματα της μελέτης δείχνουν πως οι συγκεντρώσεις τόσο του VEGF όσο και του PlGF, αυξάνονται με την αύξηση της ηλικίας κύησης. Διάφορες μελέτες που στόχευαν στην εξέταση στη μητέρα αγγειογενετικών δεικτών σε διαφορετικές εβδομάδες κύησης, ανέδειξαν αύξηση του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα (PlGF) στο δεύτερο τρίμηνο κύησης (149,150). Αντίστοιχα, οι συγκεντρώσεις του PlGF στο αμνιακό υγρό βρέθηκαν υψηλότερες στο δεύτερο τρίμηνο απ'ότι στο τέλος της κύησης (151).

Από την άλλη μεριά, έχει αναφερθεί πως η έκφραση του πλακουντιακού VEGF καθώς και οι συγκεντρώσεις του στο αμνιακό υγρό μειώνονται με την πάροδο της εγκυμοσύνης (152).

Συνολικά, και οι δύο αγγειογενετικοί παράγοντες αυξάνονται μεταξύ πρώτου και δευτέρου τριμήνου γεγονός που συνηγορεί με αυξημένο επίπεδο αγγειογένεσης με την ανάπτυξη του πλακούντα.

Επίσης, τα στοιχεία μας, έδειξαν θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση του PlGF στο αμνιακό υγρό και το βάρος γέννησης του νεογνού. Ορισμένοι μελετητές έχουν βρει χαμηλότερα επίπεδα του PlGF σε γυναίκες που δεν εκδήλωσαν προεκλαμψία, αλλά γέννησαν μικρά για την ηλικία κύησης νεογνά (SGA) (153).

Παρ'όλα αυτά, σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες με φυσιολογική αρτηριακή πίεση το αντιαγγειογενετικό προφίλ του ορού της μητέρας δε φάνηκε να συνδέεται με την εκατοστιαία θέση του βάρους του νεογέννητου (147).

Από την άλλη μεριά, τα επίπεδα του PlGF στη μητέρα και στο έμβρυο είναι χαμηλότερα στην ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση, υποδηλώνοντας αντιαγγειογενετική κατάσταση (154).

Σε μία προηγηθείσα μελέτη (155) οι Malamitsi-Puchner et al έδειξαν πως οι συγκεντρώσεις του PlGF στη μητέρα και στο νεογνό συσχετίζονταν θετικά με τις

εκατοστιαίες θέσεις των νεογνών, τόσο σε εγκυμοσύνη με ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση όσο και σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες.

Πιο πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως μειωμένες συγκεντρώσεις του PlGF στη μητρική κυκλοφορία, μπορεί να διαφοροποιήσουν την ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση που οφείλεται σε πλακουντική ανεπάρκεια οδηγώντας σε μικρού βάρους έμβρυα (155). Στα αποτελέσματα της μελέτης μας ωστόσο, φαίνεται πως πιθανόν όχι μόνο τα μητρικά αλλά και τα επίπεδα του PlGF στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου ίσως αποτελούν έναν καλό προβλεπτικό παράγοντα του βάρους γέννησης του νεογνού.

Επίσης, τα δεδομένα μας δείχνουν πως τα επίπεδα των VEGF, PlGF στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου είναι ανεξάρτητα του δείκτη μάζας σώματος και της ηλικίας της μητέρας, καθώς και της εθνικότητας, του καπνίσματος, του είδους τοκετού και του φύλου του εμβρύου.

Συνολικά, οι μελέτες που έχουν εξετάσει το συσχετισμό μεταξύ δείκτη μάζας σώματος και βάρους της μητέρας προ εγκυμοσύνης σε σχέση με τους αγγειογενετικούς παράγοντες, έχουν βρει αντικρουόμενους συσχετισμούς (147,149,156).

Το γεγονός πως ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση προεκλαμψίας, απαιτεί την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των αγγειογενετικών δεικτών και του δείκτη μάζας σώματος.

Η ηλικία της μητέρας και ο τόκος σε σχέση με τους αγγειογενετικούς δείκτες έχουν μελετηθεί σε ορισμένες μελέτες. Συσχετισμοί ανάμεσα στην ηλικία της μητέρας και στα επίπεδα του PlGF στο πρώτο τρίμηνο κύησης δεν έδειξαν αποτελέσματα (157).

Αντίθετα, σχετικά με τα επίπεδά του στον τοκετό, πρόσφατη μελέτη έδειξε πως σε φυσιολογικές νορμοτασικές εγκυμοσύνες, η αυξανόμενη ηλικία της μητέρας συνδέεται με αντιαγγειογενετικό προφίλ, με χαμηλότερες συγκεντρώσεις του PlGF (147). Οι συγγραφείς θεωρούν πως μεγαλύτερο αντιαγγειογενετικό προφίλ με μεγαλύτερη ηλικία μητέρας ίσως υποδηλώνει ένα βιολογικό μηχανισμό, που προάγει τον κίνδυνο προεκλαμψίας. Παρ' όλα αυτά, σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, σε μία πρόσφατη μελέτη, η ηλικία της μητέρας δε συνδεόταν με τις μητρικές συγκεντρώσεις των VEGF ή PlGF στο μέσο της κύησης (149).

Η πρώτη κύηση είναι ο βασικότερος ανεξάρτητος παράγοντας για προεκλαμψία, αλλά ο μηχανισμός αυτού του συσχετισμού είναι άγνωστος (158). Έχει θεωρηθεί πως αυξημένη έκκριση του διαλυτού παράγοντα sFlt-1 στην κυκλοφορία, σαν

καταστολέας των αγγειογενετικών παραγόντων, ίσως συνηγορεί για τον αυξημένο κίνδυνο προεκλαμψίας ανάμεσα σε πρωτοτόκες γυναίκες .

Το αντιαγγειογενετικό προφίλ που παρατηρείται στις πρωτοτόκες γυναίκες ίσως είναι υπεύθυνο για τη σημαντική τάση προεκλαμψίας που μπορεί να συμβεί σε αυτές (153). Όσον αφορά τον μητρικό PlGF, χαμηλότερες συγκεντρώσεις έχουν βρεθεί σε πρωτοτόκες γυναίκες, ανεξαρτήτως εβδομάδων κύησης όπου μετρήθηκε (147,157), ενώ οι Mijal et al δεν παρατήρησαν θετικό συσχετισμό ανάμεσα στην πολυτοκία και τα μητρικά επίπεδα του PlGF στο δεύτερο τρίμηνο κύησης (149).

Παραδόξως, το κάπνισμα έχει βρεθεί πως ελαττώνει τον κίνδυνο προεκλαμψίας. Αυτό το γεγονός έχει πιστοποιηθεί από πολλούς ερευνητές (160) και έχει υποτεθεί πως γυναίκες που καπνίζουν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ίσως έχουν ένα πιο ευνοϊκό αγγειογενετικό προφίλ απ'ότι γυναίκες που δεν καπνίζουν. Πράγματι, τα επίπεδα του PlGF που μετρώνται οποτεδήποτε κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ήταν υψηλότερα ανάμεσα σε γυναίκες που κάπνιζαν στην εγκυμοσύνη σε σχέση με αυτές που δεν κάπνιζαν (149) . Παρ' όλα αυτά, το κάπνισμα στη μητέρα δεν είχε καμία επίδραση στις συγκεντρώσεις του PlGF στο αμνιακό υγρό στην παρούσα μελέτη.

Συμπερασματικά, τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες οι συγκεντρώσεις των παραγόντων VEGF, PlGF στο αμνιακό υγρό δευτέρου τριμήνου κύησης αυξάνονται με την αυξανόμενη ηλικία κύησης. Επίσης, τα επίπεδα του PlGF στο αμνιακό υγρό δευτέρου τριμήνου κύησης συσχετίζονται θετικά με το βάρος των νεογνών.

Ωστόσο, μεγαλύτερες μελέτες απαιτούνται για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων .

VII. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τόσο ο VEGF όσο και ο PlGF ανιχνεύθηκαν στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου όλων των κυήσεων. Τα επίπεδα αναφοράς (μέση τιμή) ήταν 126.56 (45.30-518.92) pg/ml και 18.81 (5.61-168.61) pg/ml για τις συγκεντρώσεις των VEGF και PlGF αντίστοιχα. Ο καθορισμός των συγκεντρώσεων των VEGF και PlGF πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA. Οι τιμές αυτές αναφοράς μπορεί να φανούν

πολύ χρήσιμες αφού μέχρι σήμερα από την βιβλιογραφία δεν προκύπτουν τιμές αναφοράς σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες παρά μόνο συγκριτικές τιμές ανάμεσα σε φυσιολογικές και παθολογικές κύσεις.

2. Οι συγκεντρώσεις τόσο του VEGF όσο και του PlGF στο αμνιακό υγρό αυξάνονταν με την αύξηση της ηλικίας κύησης ($r=0.173$, $p=0.013$ και $r=0.255$, $p<0.001$ αντίστοιχα) κατά τη στιγμή της αμνιοκέντησης. Το γεγονός αυτό συνηγορεί για αυξημένο επίπεδο αγγειογένεσης που οφείλεται στην προοδευτική ανάπτυξη του πλακούντα. Η αύξηση αυτή, σύμφωνα και με μελέτες που έχουν αναφερθεί στο κεφάλαιο της συζήτησης, παρουσιάζεται κυρίως μεταξύ πρώτου και δεύτερου τριμήνου κύησης. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα είναι χρήσιμο αφού σε παθολογικές καταστάσεις όπως προεκλαμψία, παρατηρείται ελάττωση της συγκέντρωσης αυτών των παραγόντων.

3. Οι συγκεντρώσεις του πλακουντιακού αυξητικού παράγοντα (PlGF) παρουσίαζαν θετική συσχέτιση με το βάρος γέννησης ($r=0.154$, $p=0.027$). Γυναίκες που γέννησαν μικρά για την ηλικία κύησης νεογνά (SGA) ή που εμφάνισαν προεκλαμψία, ή συνδυασμό αυτών παρουσίαζαν αντιαγγειογενετικό προφίλ που έρχεται σε αντίθεση με το φυσιολογικό αγγειογενετικό προφίλ που χαρακτηρίζει τις φυσιολογικές κύσεις.

4. Τέλος, η επίδραση της ηλικίας και του βάρους της μητέρας, του δείκτη μάζας σώματος, της φυλής, του τόκου, του καπνίσματος και του είδους τοκετού καθώς και του φύλου του εμβρύου στις συγκεντρώσεις των παραγόντων αυτών στο αμνιακό υγρό, δεν ήταν σημαντική στη μελέτη αυτή.

VIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διατριβή αποτελείται από το **ΓΕΝΙΚΟ** και το **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Το **Γενικό μέρος** περιλαμβάνει τα κεφάλαια:

I. Αγγειογένεση

Γίνεται μία γενική αναφορά στον όρο της αγγειογένεσης και στον ρόλο αυτής σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Στη συνέχεια αναλύεται ο μηχανισμός της αγγειογένεσης και της νεοαγγειογένεσης και τα στάδια τους.

Στο κεφάλαιο της αγγειογένεσης γίνεται εκτεταμένη αναφορά στους σημαντικότερους αγγειογενετικούς παράγοντες και συγκεκριμένα στους : VEGF, FGF, IGF, TGF, PlGF.

Επίσης, αναλύονται τα δύο βασικά είδη αγγειογένεσης δηλαδή η εκβλαστική και η αγγειογένεση με εγκολεασμό. Στο κεφάλαιο της αγγειογένεσης γίνεται αναφορά στις παθολογικές καταστάσεις στις οποίες εμφανίζεται αυτή όπως στον καρκίνο και στο σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών καθώς και στη θεραπευτική αγγειογένεση.

Στη συνέχεια αναλύονται η αγγειογένεση στην εγκυμοσύνη σε όλα τα στάδια από τη σύλληψη ως το τέλος της εγκυμοσύνης καθώς και η δράση των αγγειογενετικών αυξητικών παραγόντων που παίζουν ρόλο σ' αυτήν.

II. Παθολογία αγγειογένεσης

Σ' αυτό το δεύτερο κεφάλαιο της παθολογίας της αγγειογένεσης γίνεται εκτεταμένη αναφορά στην παθολογία της κύησης και την αγγειογένεση. Πιο συγκεκριμένα προσδιορίζονται τα χαρακτηριστικά της αγγειογένεσης σε παθολογία της κύησης όπως η προεκλαμψία και η ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση και οι διαφορές της σε σχέση με τη φυσιολογική αγγειογένεση σε φυσιολογικές κύσεις. Επίσης, μέσα από μελέτες όπου εξετάστηκαν οι αγγειογενετικοί παράγοντες σε παθολογικές κύσεις, γίνεται εκτεταμένη αναφορά στις μεταβολές των συγκεντρώσεών τους στο πλάσμα του αίματος ανάλογα με την ηλικία κύησης και την σοβαρότητα της παθολογίας που

τη χαρακτηρίζει. Πιο συγκεκριμένα, τονίζεται η αντιαγγειογενετική κατάσταση που χαρακτηρίζει τις κύσεις που επιπλέκονται από προεκλαμψία, ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση ή και εμβρυικό θάνατο.

III. Αμνιακό Υγρό

Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται εκτενής αναφορά στο αμνιακό υγρό και στο ρόλο του καθώς και στις διαταραχές του και τη μεταβολή του όγκου του κατά τη διάρκεια μίας φυσιολογικής ή παθολογικής κύησης.

IV. Αγγειογένεση και Αμνιακό Υγρό

Στο τελευταίο κεφάλαιο του Γενικού Μέρους, γίνεται αναφορά στην παρουσία των αγγειογενετικών παραγόντων και των υποδοχέων τους στο αμνιακό υγρό. Καταγράφονται μελέτες στις οποίες αποδεικνύεται η παρουσία τους στο αμνιακό υγρό καθώς και οι μεταβολές των συγκεντρώσεων κατά τη διάρκεια μίας φυσιολογικής εγκυμοσύνης αλλά και σε παθολογικές κύσεις που χαρακτηρίζονται από προεκλαμψία ή ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση.

Το **Ειδικό Μέρος** περιλαμβάνει:

I. Την υπόθεση και τον σκοπό της μελέτης

Η υπόθεση της μελέτης αφορά την πιθανότητα συσχετισμών των συγκεντρώσεων του VEGF και του PlGF στο αμνιακό υγρό δευτέρου τριμήνου κύησης, με τα μητρικά χαρακτηριστικά αλλά και με μαιευτικές και νεογνολογικές παραμέτρους. Σύμφωνα με τη μελέτη των Mijal et al, παρατηρήθηκαν μεταβολές στις συγκεντρώσεις τους στον ορό του αίματος της μητέρας σε σχέση με το δείκτη μάζας σώματος, τον τρόπο ζωής, το είδος τοκετού και το βάρος του νεογνού. Έχει λοιπόν υποθεθεί πως αυτές οι μεταβολές πιθανόν να διαφαίνονται και στις συγκεντρώσεις των παραγόντων αυτών στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου κύησης. Επίσης, η μελέτη αποσκοπεί στον

καθορισμό των επιπέδων αναφοράς των αγγειογενετικών παραγόντων στο δεύτερο τρίμηνο κύησης.

II. Το υλικό και τη μέθοδο της διατριβής

Αναλύεται ο αριθμός των γυναικών που πήραν μέρος στη μελέτη και υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση δευτέρου τριμήνου. Επίσης, καταγράφονται τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία επιλέχθηκαν οι προς μελέτη ασθενείς. Το αμνιακό υγρό χωρίστηκε σε 3 τμήματα. Το μεγαλύτερο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του καρυοτύπου. Το δεύτερο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τη διενέργεια αντίδρασης PCR για *Mycoplasma Hominis* και *Chlamydia Trachomatis* καθώς και για την καλλιέργεια αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων. Το τρίτο τμήμα του αμνιακού υγρού που συλλέχθηκε κατά την αμνιοπαρακέντηση φυγοκεντρήθηκε στους 4 βαθμούς Κελσίου, ενώ το υπερκείμενο υγρό αποθηκεύτηκε σε σωληνάρια πολυπροπυλαινίου στους -80 βαθμούς Κελσίου. Με τη μέθοδο ELISA, καθορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των VEGF, PlGF.

III. Αποτελέσματα

Τα επίπεδα αναφοράς (μέση τιμή) ήταν 126.56 (45.30-518.92) pg/ml και 18.81 (5.61-168.61) pg/ml για τις συγκεντρώσεις των VEGF και PlGF αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις των δύο παραγόντων αυξάνονταν με την ηλικία κύησης κατά τη στιγμή της αμνιοπαρακέντησης. Ο PlGF παρουσίαζε θετική συσχέτιση με το βάρος γέννησης, ενώ η ηλικία της μητέρας, ο δείκτης μάζας σώματος, η φυλή, ο τόκος, το είδος τοκετού καθώς και το φύλο του εμβρύου δεν επηρέαζαν τις συγκεντρώσεις των VEGF, PlGF στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου κύησης.

IV. Συμπεράσματα

Η μελέτη αυτή μας παρέχει χρήσιμες τιμές αναφοράς των VEGF, PlGF στο αμνιακό υγρό του δευτέρου τριμήνου κύησης σε φυσιολογικές κυήσεις. Μέχρι σήμερα, από τη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία για τη συγκέντρωση αυτών των παραγόντων σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες στο δεύτερο τρίμηνο κύησης.

Φαίνεται πως και οι δύο παράγοντες αυξάνονται με την ηλικία κύησης, γεγονός που αποδεικνύει αυξημένο επίπεδο αγγειογένεσης με την ανάπτυξη του πλακούντα.

Επίσης, φάνηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στη συγκέντρωση του PIGF στο αμνιακό υγρό και του βάρους γέννησης του νεογνού.

IX. SUMMARY

This thesis consists of two parts, the **GENERAL** and the **SPECIFIC**

The **General Part** includes the following chapters:

I. Angiogenesis

In this first chapter, the role of angiogenesis in physiological and pathological conditions is explained. The mechanism of angiogenesis and vasculogenesis as well as their stages are also cited. This chapter describes the main angiogenic factors: VEGF, PIGF, FGF, IGF, TGF, PIGF.

The two main types of angiogenesis are also described. These are the sprouting angiogenesis and the intussusceptive angiogenesis. The importance of angiogenesis in pathological conditions in cancer and in the ovarian hyperstimulation syndrome as well as the role of therapeutic angiogenesis is also highlighted in this chapter.

Finally, angiogenesis in pregnancy in all stages from conception until term as well as the role of the main angiogenic factors are discussed.

II. Pathological Angiogenesis

This chapter refers to angiogenesis which characterizes pathological pregnancies. In specific, the characteristics of angiogenesis in pregnancies complicated by preeclampsia or IUGR and the differences compared with normal pregnancies and physiological angiogenesis are highlighted.

III. Amniotic Fluid

In this chapter, the role of amniotic fluid and its abnormalities in normal and pathological pregnancies are discussed.

IV. Angiogenesis and Amniotic Fluid

This chapter analyzes the presence of the angiogenic factors and their receptors in the amniotic fluid. Several studies, which prove their presence in amniotic fluid and changes in their concentrations during normal and pathological pregnancies are stated.

The **Specific part** includes the following:

I. Hypothesis and Aim

This study was based on the hypothesis of a possible relation between angiogenic factors (VEGF, PlGF) in the second trimester amniotic fluid and maternal, gestational and neonatal characteristics. This relation has been proved studying these factors in maternal plasma compared with the above parameters by Mijal et al. The aim of the study was also the determination of reference values of VEGF and PlGF in midtrimester amniotic fluid, which has not been investigated until today according to the literature, to the best of our knowledge.

II. Subjects and methods

The Ethics Committee of our teaching hospital approved the study protocol. Written informed consent was obtained by all participants. Two hundred and twenty-seven Greek women with singleton pregnancies, who underwent amniocentesis at a median (range) gestational age of 17.56 (14.72-25) for standard genetic indications during a period of 16 months, were prospectively recruited. The amniotic fluid was separated in 3 parts. The biggest part was used for the determination of the karyotype. The second part was tested with PCR for *Mycoplasma Hominis* and *Chlamydia Trachomatis* as well as the culture of aerobic and anaerobic bacteria. The third part was collected and centrifuged and the supernatant and fluid was stored at -80 Celsius. ELISA was used for the determination of the concentrations of VEGF and PlGF.

III. Results

Reference values (median {range}) were 126.56 (45.30-518.92) pg/ml and 18.81 (5.61-168.61) pg/ml for amniotic fluid VEGF and PIGF respectively. Amniotic fluid concentrations of both VEGF and PIGF increased with increasing gestational age at the time of amniocentesis. Furthermore, amniotic fluid concentrations of PIGF positively correlated with birth-weight. The effect of maternal age and weight, BMI, race, parity, smoking, delivery mode and fetal gender on amniotic fluid concentrations of VEGF and PIGF was not significant.

IV. Conclusions

The data of this study provide a useful set of VEGF and PIGF reference values in midpregnancy amniotic fluid. The study also investigates possible associations among established risk factors for adverse pregnancy outcomes and concentrations of second trimester amniotic fluid angiogenic factors in normal pregnancies.

The concentrations of both factors increase with increasing gestational age. Overall and according to other studies, both angiogenic factors increase between the first and second trimester, consistent with an increased level of angiogenesis as the placenta develops.

Furthermore, our data suggest a positive correlation between amniotic fluid PIGF concentrations and neonatal birthweight. In some studies, lower levels of PIGF have been reported in women who delivered small-for-gestational-age infants, suggesting an antiangiogenic state.

Advantages of this study include the prospective collection of amniotic fluid samples in a clearly defined population, the use of an uncomplicated pregnancy group and the exploration of little-studied characteristics.

X. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Conway E.M, Collen D, Carmeliet P et al. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Review. *Cardiovascular Research* 2001;49: 507–521.
2. Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *Journal of Pediatric Surgery* 2007;42:1-11.
3. Jain R. Angiogenesis and tumour pathophysiology. *European Journal of Cancer Supplements*. 2003;1 : S25.
4. Papetti, M. Herman I. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282: C947-C970
5. Topper JN, Gimbrone MA Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol. Med. Today*. 1999; 5: 40-46.
6. Semenza GL, HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001; 13: 167-171.
7. Xu L, Fukumura D. Jain R. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:11368-11374.
8. Drake C J, LaRue A, Ferrara N, Little C D. VEGF Regulates Cell Behavior during Vasculogenesis. *Developmental Biology* 2000; 224: 178–188.
9. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995; 146:1029–1039
10. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*. 2003; 9: 653-660.
11. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 2003; 10: 83-97 .
12. Wilting J, Christ B. Embryonic angiogenesis: a review. *Naturwissenschaften* 1996;83: 153-64
13. Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *Journal of Cellular Biochemistry* 2002;85:357-68.
14. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding

- growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161:851–858
15. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255:989–991.
 16. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1579–1586.
 17. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen 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; 52:5738–5743.
 18. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992; 89:244–25.
 19. Quinn TP, Peters KG, de Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:7533–7537.
 20. Peters KG, de Vries C, Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:8915–8919
 21. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269:26988–26995.
 22. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:3566–3570.
 23. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-9.

24. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 2010; 477:258–262.
25. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273:30336–30343.
26. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-induced angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843–845
27. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY, Persico MG. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993; 8:925–931.
28. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2576–2581.
29. Khaliq A, Li XF, Shams M, et al. Localisation of placenta growth factor in human term placenta. *Growth Factors* 1996 ; 13 : 243-250.
30. Osol, G., Celia, G., Gokina, N., Barron, C., Chien, E., Mandala, M., Luksha, L., and Kublickiene, K. Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance veins. *Am.J.Physiol* 2008;294: H1381-H1387.
31. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001; 3: 3005.1-3005.12.
32. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 2001; 72:835–846.
33. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376(6535):70–4.
34. Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res* 1999;58(3):224–37.

35. Giudice LC, Irwin JC. Roles of the insulin like growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidual: trophoblast interface. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1999; 17: 13±21.
36. Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320:584–588.
37. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 1990; 228: 35–45.
38. Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* 1993; 216: 154–64.
39. Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: Tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 315–26.
40. Horowitz A, Simons M. Branching morphogenesis. *Circ Res* 2008; 103: 784–95,
41. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: From form to function. *News Physiol Sci* 2003; 18: 65–70.
42. Djonov VG, Kurz H, Burri PH. Optimality in the developing vascular system: Branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn* 224: pp. 391–402, 2002.
43. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004; 231: 474–88.
44. Hall PA, Going JJ. Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies. *Histopathology* 1999, 35:48.
45. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995, 146: 1029–1039.
46. Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1996, 15:165–176
47. Rhee J, Hoff PM. Angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2005;6:1701-11.
48. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.

49. Sierra-Honigsmann M.R, Nath AK, Murakami Cet al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998;281: 1683–1686.
50. Pietrowski D, Szabo L, Sator M, Just A, Egarter C. Ovarian hyperstimulation syndrome is correlated with a reduction of soluble VEGF receptor protein level and a higher amount of VEGF-A. *Human Reprod* 2012; 27: 196-199.
51. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995;1:149–53.
52. Kieran MW, Kalluri R, Cho YJ. The VEGF Pathway in Cancer and Disease: Responses, Resistance, and the Path Forward. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2
53. Nishida N, Hirohisa Y, Takashi N, Kojiro M. *Vasc Health Risk Manag.* 2006 September; 2 : 213–219.
54. Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, et al. Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. *Human Reprod* 2001; 16: 1557-61.
55. Demir R, Yaba A, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Itochemica* 2010; 112:203-214.
56. Gargett CE, Rogers PA. Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 2001;121(2):181–6.
57. Nardo LG. Vascular endothelial growth factor expression in the endometrium during the menstrual cycle, implantation window and early pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17(4):419–23.
58. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, Stavreus- Evers A, Tzonou A, Landgren BM. Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2004;81(5): 1322–7.
59. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-70.
60. Chinni E, Colaizzo D, Tiscia GL, et al. Markers of haemostasis and angiogenesis in placentae from gestational vascular complications: Impairment of mechanisms involved in maintaining intervillous blood flow. *Thrombosis Research* 2010; 125: 267-271.

61. Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *376(6535):66–70.*
62. 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.*
63. Mayhew TM, Jackson MR, Boyd PA. Changes in oxygen diffusive conductances of human placentae during gestation (10–41 weeks) are commensurate with the gain in fetal weight. *Placenta 1993;14:51–61.*
64. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol 1992;80:283–5.*
65. Staun-Ramand E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Obstet Gynecol 1996;110: 445-449.*
66. Todros T, Sciarrone A, Piccoli E, Guiot C, Kaufmann P, Kingdom J. Umbilical Doppler waveforms and placental villous angiogenesis in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Obstet Gynecol 1999;93:499–503.*
67. Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis. Its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res 2000; 86:286–92.*
68. Augustin HG. Tubes, branches, and pillars. The many ways of forming a new vasculature. *Circ Res 2001;89:645–7.*
69. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod 2001;64:1033–40.*
70. Knoth M. Ultrastructure of chorionic villi from a four-somite human embryo. *J Ultrastruct Res 1968;25:423–40.*
71. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat 1989; 136:190–203*
72. Ferriani RA, Ahmed A, Sharkey AM, Smith SK. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3. *Growth Factors 1994;10:259–68.*
73. Shams M, Ahmed A. Localization of mRNA for basic fibroblast growth factor in human placenta. *Growth Factors 1994;11:105–1.*

74. 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.
75. Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fert* 1993;99:609–15.
76. Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rushton DI, Rollason T. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors* 1995;12:235–43.
77. Ahmed A, Whittle MJ, Khaliq A. Differential expression of placenta growth factor (PlGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig* 1997;4:A663.
78. Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placenta throughout gestation. *Placenta* 1994;15:341–53.
79. Shiraishi S, Nakagawa K, Kinukawa N, Nakano H, Sueishi K. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the human placenta. *Placenta* 1996;17:111–21.
80. Khaliq A, Li XF, Shams M, Sisi P, Acevedo CA, Whittle MJ et al. Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors* 1996;13:243–50.
81. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997;76:517–31.
82. Odorisio T, Schietroma C, Zaccaria ML, Cianfarani F, Tiveron C, Tatangelo L et al. Mice overexpressing placenta growth factor exhibit increased vascularization and vessel permeability. *J Cell Sci* 2002; 115:2559–67.
83. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA et al. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1996;271:3154–62.
84. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor

- contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575–83.
85. Zhang EG, Smith SK, Baker PN, Charnock-Jones DS. The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie-2 in normal and pathologic human placentae. *Mol Med* 2001;7:624–35.
 86. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992;80:283–5.
 87. Kaufmann P, Kingdom J. Development of the vascular system in the placenta. In: Risau W, Rubanyi GM, editors. *Morphogenesis of endothelium*. Harwood Academic Publishers; 2000; 255–75.
 88. Velde EA, Exalto N, Hesselting P, van der Linden HC. First trimester development of human chorionic villous vascularization studied with CD34 immunohistochemistry. *Hum Reprod* 1997; 12(7):1577–81
 89. Salafia CM, Pezzullo JC, Lopez-Zeno JA, Simmens S, Minior VK, Vintzileos AM. Placental pathologic features of preterm pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(4):1097–105.
 90. Torry DS, Wang HS, Wang TH, Caudle MR, Torry RJ. Pre-eclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(6 Pt 1):1539–44.
 91. Reuvekamp A, Velsing-Aarts FV, Poulina IE, Capello JJ, Duits AJ. Selective deficit of angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106(10):1019–22
 92. 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 Gynaecol* 1996;103(12):1191–6.
 93. Macara L, Kingdom JCP, 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.
 94. Teasdale F. Idiopathic intrauterine growth retardation: histomorphometry of the human placenta. *Placenta* 1984;5(1):83–92.
 95. Krebs C, Macara LM, Leiser R, Bowman AW, Greer IA, Kingdom JCP. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the

- umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental tree. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1534–42.
96. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3): 353–64.
 97. Bernirschke KKP. Pathology of the Human Placenta, *Science* 1995;110 : 118-22
 98. Kingdom JC & Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* 1997; 18: 613±621
 99. Teasdale F. Histomorphometry of the human placenta in pre-eclampsia associated with severe intrauterine growth retardation. *Placenta* 1987; 8: 119±12
 100. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS et al. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1996; 103: 1191±1196.
 101. Torry D, Wang H, Wang T et al. Preeclampsia is associated with reduced serum levels of placenta growth factor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1998; 179: 1539±1544.
 102. Kendall RL & Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1993; 90: 10 705±10 709.
 103. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997;99(9):2139–51.
 104. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, et al. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000;157(6):2111–22.
 105. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1972;1:177–91
 106. Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 1981;88(9):876–81.
 107. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, et al. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101(8):669–74.

108. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, et al. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction* 2006;132(2):217–32.
109. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350(7):672–83.
110. Wathen KA, Tuutti E, Stenman UH, et al. Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(1):180–4. 98.
111. Hertig A, Berkane N, Lefevre G, et al. Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin Chem* 2004;50(9):1702–3.
112. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, et al. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190(6):1541–7 [discussion: 1547–50].
113. Kanter D, Lindheimer MD, Wang E, et al. Angiogenic dysfunction in molar pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202(2):184, e1–5.
114. Koga K, Osuga Y, Tajima T, et al. Elevated serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) level in women with hydatidiform mole. *Fertil Steril* 2009. 120: 224-226.
115. Bdolah Y, Palomaki GE, Yaron Y, et al. Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. *Am J Obstet Gynecol* 2006 194: 239–245
116. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004;95(9):884–91
117. Espinoza J, Romero R, Nien JK, et al. Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 2007;196(4):326, e1–13.
118. Ahmed A, Perkins J. Angiogenesis and intrauterine growth restriction. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2000; 14: 981-998.
119. Silasi M, Cohen B, Karumanchi S.A., Rana S. Abnormal Placentation, Angiogenic Factors and the Pathogenesis of Preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010 Jun;37(2):239-53

120. Kallen B. Maternal morbidity and mortality in in-vitro fertilization. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2008;22:549-58.
121. Kallen B, Finnstrom O, Nygren KG, Otterblad OP, Wennerholm UB. In vitro fertilisation in Sweden: obstetric characteristics, maternal morbidity and mortality. *BJOG* 2005;112: 1529-35.
122. Wolf M, Shah A, Lam C, et al. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:16-22.
123. Bdolah Y, Lam C, Rajakumar A, et al. Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:428-36.
124. Jeyabalan A, Powers RW, Durica AR, Harger GF, Roberts JM, Ness RB. Cigarette smoke exposure and angiogenic factors in pregnancy and preeclampsia. *Am J Hypertens* 2008;21:943-7.
125. Mehendale R, Hibbard J, Fazleabas A, Leach R. Placental angiogenesis markers sFlt-1 and PlGF: response to cigarette smoke. *Am J Obstet Gynecol* 2007;197:363-5.
126. Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gotsch F, et al. The maternal plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated in SGA and the magnitude of the increase relates to Doppler abnormalities in the maternal and fetal circulation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:25-4
127. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol* 2002;33:1069-77.
128. Espinoza J, Romero R, Mee KY, et al. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med* 2006;34:447-58.
129. Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta* 2006;27: 939-58.
130. Rosenfeld CR, Moriss FH Jr, Makowski EL et al. Circulatory changes in the reproductive tissues of ewes during pregnancy. *Gynecologic Investigation* 1974; 5: 252±268.
131. Modena AB, Fieni S. Amniotic fluid dynamics. 2004;75 Suppl 1:11-3.
132. Lind T, Kendall A, Hytten FE: The role of the fetus in the formation of amniotic

- fluid. *J Obstet Gynaecol* 1972 79: 289.
133. Harman R. Amniotic Fluid Abnormalities. *Semin Perinatol* 2008; 32 :288-294
 134. Vuorela-Vepsäläinen P, Alftan H, Orpana A, Alitalo K, Stenman UH, Halmesmäki E. Vascular endothelial growth factor is bound in amniotic fluid and maternal serum. *Human Reprod* 1999;14 : 1346-51
 135. Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K et al .Amniotic Fluid–Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 95 :353-357
 136. Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Giannubilo SR, Scagnoli C, et al. Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004 ; 113: 17-20
 137. Marinoni E, Di Iorio R, Villaccio B, Alberini A, Rota F, Cosmi EV. Amniotic fluid nitric oxide metabolite levels and nitric oxide synthase localization in fetoplacental tissues are modified in association with human labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;89(1):47–54.
 138. Di Iorio R, Marinoni E, Emiliani S, Villaccio B, Cosmi EV. Nitric oxide in preeclampsia: lack of evidence for decreased production. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;76(1):65–70.
 139. Tranquilli AL, Giannubilo SR, Bezzeccheri V, Ciavattini A, et al .Amniotic levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor in pregnancy with subsequent intrauterine fetal death. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 114:162-65
 140. Park CW, Park JS, Shim SS, Jun JK, et al .An elevated maternal plasma, but not amniotic fluid, soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) at the time of mid-trimester genetic amniocentesis is a risk factor for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005; 193: 984-989
 141. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672-83.
 142. F. Debieve, A. Moiset, K. Thomas, S. Pampfer, C. Hubinont. VEGF, PlGF in Down's Syndrome and control pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:765-770

143. Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic levels of vascular endothelial growth factor and nitric oxide at the second trimester in Down's syndrome. *J Mat Fetal Neonatal Med* 2003; 13: 28-31
144. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-4.
145. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006;12:642-9.
146. Levine RJ, Lam C, Qian C, et al. Soluble endoglin and other circulating anti-angiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006;355:992-1005.
147. Staff AC, Harsem NK, Braekke K, Hyer Met al. Maternal, gestational and neonatal characteristics and maternal angiogenic factors in normotensive pregnancies 2009; 143: 29-33
148. J. J. Tseng, M. M. Chou, Y. T. Hsieh, M. C. Wen, Esther S. C. Hoand S. L. Hsu Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Placenta Growth Factor and Their Receptors in Placentae from Pregnancies Complicated by Placenta Accreta. *Placenta* 2006; 27:70-78
149. Mijal RS, Holzman CB, Rana S, Karumanchi SA, Wang J, Sikorskii A. Midpregnancy levels of angiogenic markers in relation to maternal characteristics. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:244.e1-e12.
150. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:9-23.
151. Seubert DE, Maymon E, Pacora P, Gervasi MT, Berry SM, Torry DS, Romero R. A study of the relationship between placenta growth factor and gestational age, parturition, rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1633-1637.
152. Wathén KA, Stenman UH, Leinonen E, Andersson S, Vuorela P. Concentrations of vascular endothelial growth factor C and D in amniotic fluid and maternal plasma.

153. Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005 ; 193: 16-22
154. Wallner W, Sengenberger R, Strick R, Strissel PL, Meurer B, Beckmann MW, Schlembach D. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clin Sci* 2007;112:51–57.
155. Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Sarandakou A, Makrakis E, Hassiakos D, Creatsas G. Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Intrauterine Growth-Restricted Fetuses and Neonates. *Mediators Inflamm* 2005; 24:293-97
156. Benton SJ, Hu Y, Xie F, Kupfer K, Lee SW, Magee LA, von Dadelszen P. Can placental growth factor in maternal circulation identify fetuses with placental intrauterine growth restriction? *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:163.e1–163.e7.
157. Smith GC, Crossley JA, Aitken DA, Jenkins N, Lyall F, Cameron AD, Connor JM, Dobbie R. Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstet Gynecol* 2007;109:1316–1324.
158. Wa Law L, Sahota DS, Wai Chan L, Chen M, Kin Lau T, Leung TY, Effect of long-term storage on placental growth factor and Fms-like tyrosine kinase 1 measurements in samples from pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23:1475-80.
159. Odegård RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG* 2000;107:1410–1416.
160. Hammoud AO, Bujold E, Sorokin Y, Schild C, Krapp M, Baumann P. Smoking in pregnancy revisited: findings from a large population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1856–62; discussion 1862.

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΔΑΚΤΟΡΙΚΗ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Midtrimester amniotic fluid concentrations of angiogenic factors in relation to maternal, gestational and neonatal characteristics in normal pregnancies

Thalis Papapostolou¹, Despina D. Briana¹, Maria Boutsikou¹, Christos Iavazzo¹, Karl-Phillip Puchner¹, Dimitrios Gourgiotis², Antonios Marmarinos² & Ariadne Malamitsi-Puchner¹

¹Second Department of Obstetrics and Gynecology, Athens University Medical School, Athens, Greece and ²Laboratory of Clinical Biochemistry-Molecular Diagnostics, 2nd Department of Pediatrics, Athens University Medical School, Athens, Greece

Objective: To describe associations among maternal/gestational/neonatal characteristics and midpregnancy amniotic fluid concentrations of the main angiogenic markers vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF). **Methods:** In a cohort of 206 normal full-term pregnancies, midpregnancy amniotic fluid VEGF and PIGF reference values were recorded. Possible associations among the above concentrations and various parameters, such as maternal age and body mass index, race, parity, smoking, gestational age, delivery mode, birth-weight and fetal gender were investigated. **Results:** Midpregnancy amniotic fluid concentrations of both VEGF and PIGF increased with increasing gestational age ($r = 0.173, p = 0.013$ and $r = 0.255, p < 0.001$, respectively), whereas PIGF concentrations positively correlated with birth-weight ($r = 0.154, p = 0.027$). The effect of the other above-mentioned parameters on VEGF and PIGF concentrations was not significant. **Conclusions:** In normal pregnancies, midgestation amniotic fluid VEGF and PIGF concentrations positively correlate with gestational age. Furthermore, midgestation amniotic fluid PIGF concentrations may be a predictor of neonatal birth weight.

Keywords: VEGF, PIGF, angiogenic factors, pregnancy, amniotic fluid

Introduction

Angiogenic factors play a crucial role in the evolution of a normal pregnancy. In this respect, abnormal patterns of angiogenic markers have been linked to pregnancy complications, accounting for significant maternal and fetal morbidity [1,2]. Thus, women with preeclampsia, characterized by maternal hypertension and proteinuria usually after the 20th week of gestation [3], present with an abnormal angiogenesis profile, marked by elevated levels of antiangiogenic proteins and reduced concentrations of the main proangiogenic factors, free vascular endothelial growth factor (VEGF) and free placental growth factor (PIGF), both in serum and amniotic fluid, well before clinical disease onset [2,4,5]. Furthermore, several altered patterns of angiogenic markers have been reported to possibly contribute to restricted fetal growth [2,6], spontaneous preterm birth [7] and fetal death [8].

The angiogenic factors VEGF and PIGF are abundantly expressed by the placenta and several fetal tissues [9], and play key roles in the regulation of effective vasculogenesis, angiogenesis and placental development [10]. Furthermore, both VEGF and PIGF are capable of inducing proliferation, migration and activation of endothelial cells, thus contributing to induction of vascular permeability and maintenance of the integrity of newly formed blood capillaries [11,12]. Failure to achieve the above adaptations may result in reduced fetoplacental perfusion, characterizing disease states such as intrauterine growth restriction (IUGR) [6] and fetal death [8].

In both normal and pathological pregnancies, information is scarce regarding the associations between clinical pregnancy characteristics (including risk factors for adverse pregnancy outcomes) and maternal/amniotic fluid angiogenic profile. Pubmed/Medline was searched by use of the mesh terms “pregnancy characteristics”, “gestational characteristics”, “maternal characteristics”, “angiogenic factors”, “angiogenic markers” and “neonates” in various combinations. The reference lists of the gathered reports were manually searched for additional studies. The search retrieved only a few studies, which have examined associations among maternal concentrations of angiogenic markers and maternal, gestational, as well as neonatal characteristics [13–15]. Furthermore, to the best of our knowledge, correlations of maternal, pregnancy and neonatal variables with second trimester amniotic fluid VEGF and PIGF values, have not been, up to the present, extensively investigated [16]. However, a deeper understanding of these relationships may provide new insights into the underlying mechanisms of adverse pregnancy outcomes and may improve control of confounding in studies testing the screening/diagnostic potential of angiogenic markers.

Therefore, the present study aimed to provide second trimester amniotic fluid VEGF and PIGF reference values, and also describe the potential relationship among the above concentrations and a variety of maternal characteristics (demographic/anthropometric/lifestyle), gestational parameters, as well as neonatal features. The study group comprised of normal full-term pregnancies, in order to exclude the most prevalent complications that are associated with altered angiogenic patterns, thus, permitting a clearer interpretation of the results.

Methods

The Ethics Committee of our teaching hospital approved the study protocol. Written informed consent was obtained by all participants.

Two hundred and twenty-seven Greek women with singleton pregnancies, who underwent amniocentesis at a median (range) gestational age of 17.56 (14.72–25) for standard genetic indications (mostly because of maternal age or family history of genetic disorders) during a period of 16 months, were prospectively recruited.

Eligible women had normal pregnancies, which were defined as (a) term delivery (>37 gestational weeks) (b) delivery of an appropriate-for-gestational-age neonate (birth weights ranged between the 11th and 90th customized centile, controlling for maternal height, booking weight, ethnic group, parity, gestational age, birth weight and neonatal gender) [17] (c) absence of hypertensive disorders, diabetes mellitus and any other obstetrical or medical complications, including active vaginal bleeding, chronic renal, liver or heart diseases, chronic respiratory insufficiency, thyroid and immunological diseases and congenital or acquired thrombophilic disorders. Hypertensive disorders, that were ascertained through review of prenatal and labour records, included diagnosis of chronic hypertension before pregnancy, gestational hypertension (minimal criteria: new-onset hypertension after 20 weeks of gestation with systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and/or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg without any systemic features of preeclampsia and normal blood pressure levels within 3 months postpartum), or preeclampsia (defined as blood pressure augmentation after 20 weeks of gestation to $>140/90$ mmHg on at least two occasions 6h apart in a previously normotensive woman, combined with proteinuria defined as protein dip stick $\geq 1+$ on ≥ 2 midstream urine samples 6 hours apart or a 24-h urine excretion of ≥ 0.3 g protein in the absence of urinary infection) [18]. Furthermore, multiple pregnancies and pregnancies with abnormal karyotype or major fetal anomalies were excluded from the study.

Maternal demographic, anthropometric and lifestyle characteristics, as well as a detailed obstetrical and personal medical history were obtained by interview at enrolment. Smoking was grouped as follows: never smoked, smoked but quit when pregnancy confirmed, smoked less than 10 cigarettes/day before and during pregnancy, and smoked more than 10 cigarettes/day before and during pregnancy. Pre-pregnancy weight and maternal height were used to calculate pre-pregnancy body mass index (BMI), which was grouped according to the Centers for Disease Control guidelines into underweight, normal, overweight and obese [19]. The gestational age was calculated from the last menstruation and was confirmed by ultrasound measuring of the biparietal diameter and the femur length.

Ultrasound-guided transabdominal amniocentesis for standard genetic indications was performed under sterile conditions. An average of 20 ml of amniotic fluid was obtained and none of the samples were contaminated by maternal blood. The amniotic fluid was separated in 3 parts. The biggest part (about 15 ml) was used for karyotype determination. The second part (about 2 ml) was transferred to sterile vacuum containers, in order to be tested by polymerase chain reaction (PCR) for *Mycoplasma hominis* and *Chlamydia trachomatis* and be cultured for standard aerobic and anaerobic bacteria. The third part (about 3 ml) was refrigerated at $+4^{\circ}\text{C}$ and centrifuged the next 6h for 10 min. The supernatant fluid was stored in polypropylene tubes at -80°C .

The determination of amniotic fluid VEGF and PlGF concentrations was performed by ELISA (Orgenium Laboratories,

07120, Vantaa, Finland and DRG Instruments, 35039, Marburg, Germany, respectively).

The minimum detectable concentrations, intra- and interassay coefficients of variation were <5 pg/ml, $<6\%$ and $<10\%$ for VEGF and <1.062 pg/ml, 2.83% and 4.10% for PlGF, respectively.

Statistical analysis

Data regarding both VEGF and PlGF were not normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test); thus non parametric procedures were used in the analysis. Mann–Whitney *U* test was applied to examine the effect of maternal age and weight, BMI, race, parity, smoking, gestational age, spontaneous rupture of membranes, delivery mode, birth weight and fetal gender on VEGF and PlGF levels, while Spearman's correlation coefficient was used to examine any relative positive or negative correlations. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. SPSS 11.5 statistical package was used for the analysis.

Results

Twenty one women were excluded, due to failure meeting the inclusion criteria. Thus, the study population comprised of 206 participants. The characteristics of the study population are shown in Table I.

Reference values (median [range]) were 126.56 (45.30–518.92) pg/mL and 18.81 (5.61–168.61) pg/mL for amniotic fluid VEGF and PlGF concentrations, respectively. Distribution of second trimester amniotic fluid VEGF and PlGF concentrations in our population are shown in Figures 1 and 2.

Amniotic fluid concentrations of both VEGF and PlGF increased with increasing gestational age ($r = 0.173$, $p = 0.013$ and $r = 0.255$, $p < 0.001$, respectively), at the time of amniocentesis. Furthermore, amniotic fluid PlGF concentrations positively correlated with birth-weight ($r = 0.154$, $p = 0.027$). The effect of maternal age and weight, BMI, race, parity, smoking, delivery mode and fetal gender on amniotic fluid VEGF and PlGF concentrations was not significant.

Discussion

The data of this study provide a useful set of VEGF and PlGF reference values in midpregnancy amniotic fluid. Furthermore, the present report investigates associations among established risk factors for adverse pregnancy outcomes and concentrations of second trimester amniotic fluid VEGF and PlGF in normal pregnancies.

More specifically, our findings indicate that second trimester amniotic fluid concentrations of both VEGF and PlGF increase with increasing gestational age. Studies investigating maternal circulating angiogenic markers at different gestational weeks have noted a rise in PlGF levels at midpregnancy [2,15]. Similarly, amniotic fluid PlGF concentrations were found to be significantly higher in midtrimester pregnancy than at term [16]. On the other hand, placental VEGF expression as well as amniotic fluid VEGF concentrations reportedly decline as pregnancy advances [20]. Overall, both angiogenic factors increase between the first and second trimesters, consistent with an increased level of angiogenesis as the placenta develops [21].

Furthermore, our data suggest a positive correlation between amniotic fluid PlGF concentrations and neonatal birthweight. Some investigators have reported lower PlGF levels in women who did not experience preeclampsia, but delivered small-for-gestational-age infants [2,22]. However, in normotensive

Table I. Maternal, gestational and neonatal characteristics of the study population.

	Mean ± SD/median (range)
Maternal age (years)	37 (21–50)
Maternal weight (kg)	63.78 ± 11.05
Maternal height (m)	1.66 ± 0.13
BMI (kg/m ²)	22.9 (16.0–41.2)
Gestational age at amniocentesis (weeks)	17.56 (14.72–25)
Gestational age at delivery (weeks)	38.53 (37.0–41.0)
Birth weight (g)	3220.39 ± 301.8
Customized centile	40 (11–90)
BMI (categorical) N (%)	
Underweight	6 (2.9)
Normal	143 (69.4)
Overweight	47 (22.8)
Obese	10 (4.9)
Ethnicity N (%)	
Greek	199 (96.6)
Other	7 (3.4)
Parity N (%)	
First	93 (45.1)
Other	113 (54.9)
Gender (N%)	
Male	112 (54.4)
Female	94 (45.6)
Mode of Delivery N (%)	
Vaginal	93 (45.1)
Cesarean section	113 (54.9)
Smoking N (%)	
Never smoked	141 (68.5)
Ex-Smoker	47 (22.8)
Smoking before/during pregnancy (<10 cigarettes per day)	5 (3.4)
Smoking before/during pregnancy (>10 cigarettes per day)	13 (6.3)

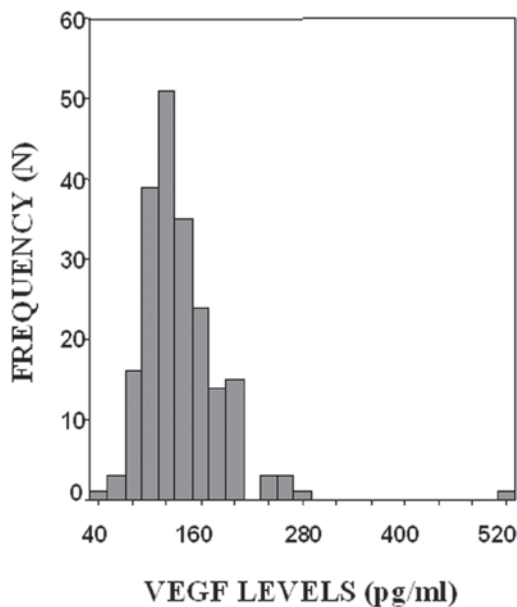


Figure 1. Distribution of second trimester amniotic fluid vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations.

pregnancies, antiangiogenic maternal serum profile at delivery did not appear to be associated with neonatal weight percentile [13]. The authors speculate that maternal angiogenic alterations at the level observed in otherwise uncomplicated pregnancies may have little effect on perinatal health [13].

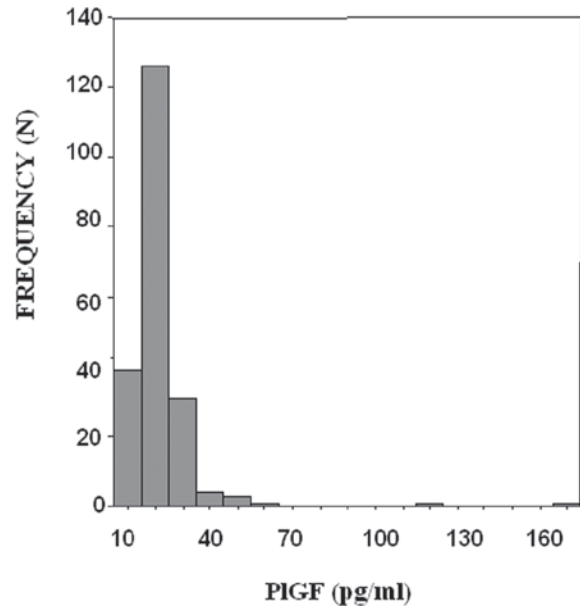


Figure 2. Distribution of second trimester amniotic fluid placental growth factor (PIGF) concentrations.

On the other hand, maternal and fetal PIGF levels are lower in IUGR, suggesting the formation of an antiangiogenic state [23]. In accordance, maternal and neonatal PIGF concentrations positively correlated with the infants' customized centiles in both IUGR and normal pregnancies in a previous study from our group [24]. Most recent preliminary data also suggest that decreased concentrations of PIGF in maternal circulation may differentiate IUGR due to placental insufficiency from constitutionally small fetuses [25]. Nevertheless, our results possibly suggest that not only maternal, but also midpregnancy amniotic fluid PIGF levels may be a good indicator of neonatal birth weight.

Moreover, our data suggest that midpregnancy amniotic fluid VEGF and PIGF levels are independent of maternal BMI and age, parity, race, smoking, delivery mode and fetal gender.

Overall, studies that have examined the association between maternal pre-pregnancy BMI/weight and angiogenic markers have found inverse relations, although findings have not been consistent [13,15,26]. Given that high BMI is a risk factor for preeclampsia [27], the relationship among angiogenic markers, BMI and pregnancy outcome requires further investigation.

Maternal age and parity with respect to angiogenic markers have been examined in a few studies. Associations between maternal age and first-trimester levels of PIGF have been inconsistent [28], whereas for levels at delivery a recent report demonstrated that in normotensive pregnancies, increasing maternal age is associated with a more antiangiogenic profile, including lower PIGF concentrations [13]. The authors suggest that a greater antiangiogenic profile with older maternal age may suggest a biological mechanism which mediates this preeclampsia risk factor [13]. Nevertheless, in line with our results, maternal age was not associated with maternal VEGF or PIGF concentrations at midpregnancy in a large recent study [15].

Nulliparity is the predominant independent risk factor for preeclampsia, but the mechanism of this association is unknown [29]. It has been suggested that increased secretion of circulating soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1), an inhibitor of PIGF and VEGF in first versus second pregnancies, may in part account for the increased risk of preeclampsia among nulliparous women [14]. The authors speculate that the relative antiangiogenic profile

observed in nulliparous women may be responsible for the remarkable tendency of preeclampsia to occur in these women [14]. As far as maternal PlGF is concerned, lower concentrations have been demonstrated in nulliparous women, irrespective of gestational weeks at measurement [13,21,28], while Mijal et al did not observe a positive association between multiparity and maternal PlGF levels at midpregnancy [15].

Paradoxically, it has been noted that cigarette smoking reduces the risk of preeclampsia. This effect has been verified by a number of investigators [30] and it has been hypothesized that women who smoke during pregnancy may have a more favorable angiogenic profile than women who do not. Indeed PlGF levels measured anytime during pregnancy were higher among women who smoked during pregnancy compared with those who did not [15]. However, maternal smoking did not have any effect on amniotic fluid PlGF concentrations in the present study.

Finally, differences in angiogenic marker levels by race/ethnicity have been documented in a small number of reports [15].

Advantages of the present study include the prospective collection of amniotic fluid samples in a clearly defined population, the use of an uncomplicated pregnancy group and the exploration of little-studied characteristics.

In conclusion, our findings suggest that in normal pregnancies, midpregnancy amniotic fluid VEGF and PlGF concentrations increase with increasing gestational age. Furthermore, second trimester amniotic fluid PlGF concentrations positively correlate with neonatal birth weight. Larger studies are needed to confirm these findings and their etiological implications, as well as further investigate their relevance for the short and long-term health of the mother and offspring.

Declaration of Interest: The authors report no declarations of interest.

References

- Boutsikou T, Malamitsi-Puchner A, Economou E, Boutsikou M, Puchner KP, Hassiakos D. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in intrauterine growth restricted fetuses and neonates. *Early Hum Dev* 2006;82:235–239.
- Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:9–23.
- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592–1594.
- Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, Kim GJ, Kim MR, Espinoza J, Bujold E, et al. Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005;17:3–18.
- Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, Takeda S, et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2348–2351.
- Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review. *Placenta* 2000;21 Suppl A:S16–S24.
- Chaiworapongsa T, Romero R, Tarca A, Kusanovic JP, Mittal P, Kim SK, Gotsch F, et al. A subset of patients destined to develop spontaneous preterm labor has an abnormal angiogenic/anti-angiogenic profile in maternal plasma: evidence in support of pathophysiologic heterogeneity of preterm labor derived from a longitudinal study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:1122–1139.
- Tranquilli AL, Giannubilo SR, Bezeccheri V, Ciavattini A, Scagnoli C, Mazzanti L. Amniotic levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor in pregnancy with subsequent intrauterine fetal death. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;114:162–165.
- Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, Kaipainen A, Joukov V, Persico MG, Alitalo K, Halmesmaki E. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997;56:489–494.
- Ong S, Lash G, Baker PN. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:969–980.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669–676.
- Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997;76:517–531.
- Staff AC, Harsem NK, Braekke K, Hyer M, Hoover RN, Troisi R. Maternal, gestational and neonatal characteristics and maternal angiogenic factors in normotensive pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;143:29–33.
- Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Smirnakis KV, Epstein FH, Taylor RN, et al. Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:16–22.
- Mijal RS, Holzman CB, Rana S, Karumanchi SA, Wang J, Sikorskii A. Midpregnancy levels of angiogenic markers in relation to maternal characteristics. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:244.e1–244.12.
- Seubert DE, Maymon E, Pacora P, Gervasi MT, Berry SM, Torry DS, Romero R. A study of the relationship between placenta growth factor and gestational age, parturition, rupture of membranes, and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1633–1637.
- Gardosi J, Chang A, Kalyan B, Sahota D, Symonds EM. Customised antenatal growth charts. *Lancet* 1992;339:283–287.
- American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 33: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 2002;99:159–167.
- Division of Nutrition, Physical Activity and Obesity, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Centers for Disease Control and Prevention. About BMI for Adults, 2009 (vol 2010). Available at: http://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult_bmi/index.html.
- Wathén KA, Stenman UH, Leinonen E, Andersson S, Vuorela P. Concentrations of vascular endothelial growth factor C and D in amniotic fluid and maternal plasma. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009;88:629–634.
- Jackson MR, Carney EW, Lye SJ, Ritchie JW. Localization of two angiogenic growth factors (PDECGF and VEGF) in human placenta throughout gestation. *Placenta* 1994;15:341–353.
- Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:177–182.
- Wallner W, Sengenberger R, Strick R, Strissel PL, Meurer B, Beckmann MW, Schlembach D. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clin Sci* 2007;112:51–57.
- Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Sarandakou A, Makrakis E, Hassiakos D, Creasas G. Vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in intrauterine growth-restricted fetuses and neonates. *Mediators Inflamm* 2005;2005:293–297.
- Benton SJ, Hu Y, Xie F, Kupfer K, Lee SW, Magee LA, von Dadelszen P. Can placental growth factor in maternal circulation identify fetuses with placental intrauterine growth restriction? *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:163.e1–163.e7.
- Smith GC, Crossley JA, Aitken DA, Jenkins N, Lyall F, Cameron AD, Connor JM, Dobbie R. Circulating angiogenic factors in early pregnancy and the risk of preeclampsia, intrauterine growth restriction, spontaneous preterm birth, and stillbirth. *Obstet Gynecol* 2007;109:1316–1324.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785–799.
- Law LW, Sahota DS, Chan LW, Chen M, Lau TK, Leung TY. Effect of long-term storage on placental growth factor and fms-like tyrosine kinase 1 measurements in samples from pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23:1475–1480.
- Odegård RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG* 2000;107:1410–1416.
- Hammoud AO, Bujold E, Sorokin Y, Schild C, Krapp M, Baumann P. Smoking in pregnancy revisited: findings from a large population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1856–62; discussion 1862.