



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
&
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΡΕΥΝΑ ΣΤΗ ΓΥΝΑΙΚΕΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ»

- Διπλωματική εργασία -

«Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα LRP5 σε πλακούντα
γυναικών με διαβήτη κύησης»

Γιώργος Κανελλόπουλος

**Απόφοιτος τμήματος Βιολογίας, προπτυχιακός φοιτητής τμήματος
Ιατρικής**

A.M. : 20150204

Τριμελής Εξεταστική επιτροπή

- 1) Μαστοράκος Γεώργιος : Επιβλέπων**
- 2) Βαλσαμάκης Γεώργιος**
- 3) Παπαευαγγέλου Βασιλική**

Αθήνα, 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια μεταβολική νόσος με χρόνια εξέλιξη και σοβαρές επιπλοκές για την υγεία του ατόμου. Μια ειδική κατηγορία του διαβήτη, είναι η μορφή που εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και ονομάζεται διαβήτης κύησης. Το μόριο LRP5 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στο μορφογενετικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης.

Η διπλωματική εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης LRP5 σε πλακούντα γυναικών με διαβήτη κύησης. Για το σκοπό αυτό έγινε απομόνωση πρωτεϊνών από πλακούντες υγιών γυναικών και γυναικών με διαβήτη κύησης και ανάλυση πρωτεϊνών με την μέθοδο Western-Blot. Επίσης έγινε συλλογή σωματομετρικών χαρακτηριστικών των μητέρων και των νεογνών από τους ιατρικούς φακέλους. Οι πληθυσμοί της μελέτης, είτε νεογνά είτε μητέρες, δεν διέφεραν σημαντικά στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά με εξαίρεση την γλυκόζη ομφάλιου λώρου. Η πρωτεΐνη LRP5 βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα των γυναικών με διαβήτη κύησης συγκριτικά με την ομάδα των υγιών γυναικών. Δεν υπάρχουν στην βιβλιογραφία άλλες μελέτες σχετικά με την έκφραση του μορίου αυτού στον πλακούντα με διαβήτη κύησης.

ABSTRACT

PLACENTAL EXPRESSION OF LRP5 PROTEIN ON WOMEN WITH GESTATIONAL DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease with serious health complications for patients. There is a special category in diabetes which appears for the first-time during pregnancy, called gestational diabetes mellitus. LRP5 is a transmembrane protein and a co-receptor in canonical Wnt pathway.

The aim of this study is to compare the expression of LRP5 in placental tissue of women with gestational diabetes mellitus (GDM). The experimental part involves protein isolation of the placentas of both healthy women and with GDM and Western- Blot analysis. Somatometric characteristics are also included in this study, from both women and their infants. There was no significant difference found in these characteristics between healthy and women with GDM. Infant body measurements also presented no significant difference between groups but umbilical glucose was found higher in the GDM group compared with healthy group. LRP5 protein was found significantly higher in women with GDM in comparison with healthy group. There are no other studies found about LRP5 expression in gestational diabetes mellitus

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. LRP5 και το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt.....	6
1.1.1. LRP5 και βιταμίνη D	10
1.1.2. Βιοχημικό μονοπάτι του LRP5.....	13
1.1.3. Σχέση του LRP5 με τα οστά	17
1.1.4. Ο ρόλος της σκληροστίνης	19
1.2. Πλακούντας	21
1.2.1. Ανατομία και προέλευση πλακούντα.....	21
1.2.2. Λειτουργία πλακούντα	24
1.3. Διαβήτης κύησης	27
1.3.1. Συμπτώματα και διάγνωση του διαβήτη κύησης	28
1.3.2. Παθοφυσιολογία διαβήτη κύησης	30
1.3.3. Θεραπεία	33

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από πλακούντα γυναικών με διαβήτη κύησης και από γυναίκες χωρίς διαβήτη κύησης.....	38
2.2. Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης.....	40
2.3. Western Blot Analysis.....	41

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	44
----------------------------	-----------

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
---------------------------	-----------

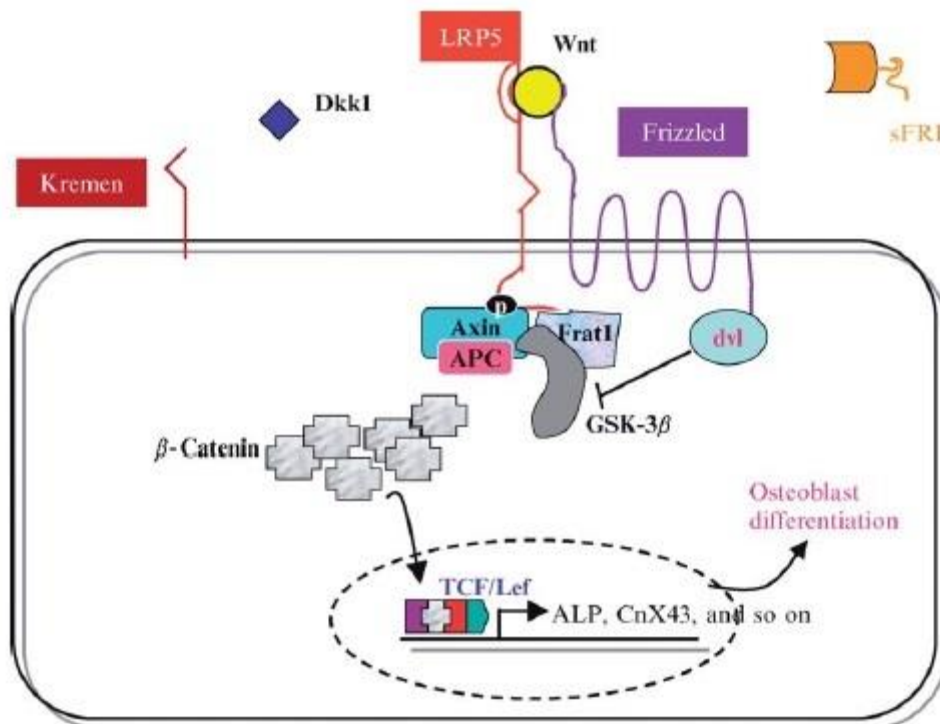
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
-----------------------	-----------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	60
---------------------------	-----------

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο υποδοχέας LRP5 και το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt

Οι LRP5/6 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικών υποδοχέων. Οι LRP5/6, όπως και οι ομόλογοι υποδοχείς στην *Drosophila* (Arrow), είναι απαραίτητοι για το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης (Mao et al., 2002 in Baron et al., 2006). Οι LRP5/6 δρουν συνεργατικά με τους υποδοχείς Fzς έτσι ώστε να γίνει πρόσδεση των Wnt και να ενεργοποιηθεί αργότερα ένας καταρράκτης χημικών αντιδράσεων μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων (Holmen et al., 2002). Οι υποδοχείς Frizzled είναι επταμερείς διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που είναι δομικά ομόλογοι με τους υποδοχείς που συνδέονται με G - πρωτεΐνες (GPCR), αλλά δεν είναι πλήρως αποδεδειγμένο πως το κανονικό μονοπάτι που προάγουν, γίνεται μέσω των G - πρωτεϊνών. Στο αμινοτελικό άκρο των Fz πρωτεϊνών, υπάρχει μια ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (cysteine - rich domain, CRD) που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του Wnt και στην οποία μπορεί να προσδεθεί και ο αναστολέας του Wnt μονοπατιού, μια απ' την οικογένεια πρωτεϊνών Dickkopf (Dkk) ή απ την οικογένεια των SFRP (secreted Frizzled-related proteins) (Bhanot et al., 1996 in Baron et al., 2006).



Εικόνα 1: Το ενεργοποιημένο κανονικό Wnt μονοπάτι, από Baron et al, 2006.

Η οικογένεια των πρωτεϊνών Wnt περιλαμβάνει εκκρινόμενες, πλούσιες σε κυστεΐνη γλυκοπρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών όπως καθορισμό της 'τύχης' των αρχέγονων κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, μετανάστευση και απόπτωση (Moon and Shah, 2002). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Wnt είναι πρωτεϊνικά μονοπάτια, όπου σήματα μεταφέρονται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια. Γνωρίζουμε 3 διαφορετικά μονοπάτια Wnt:

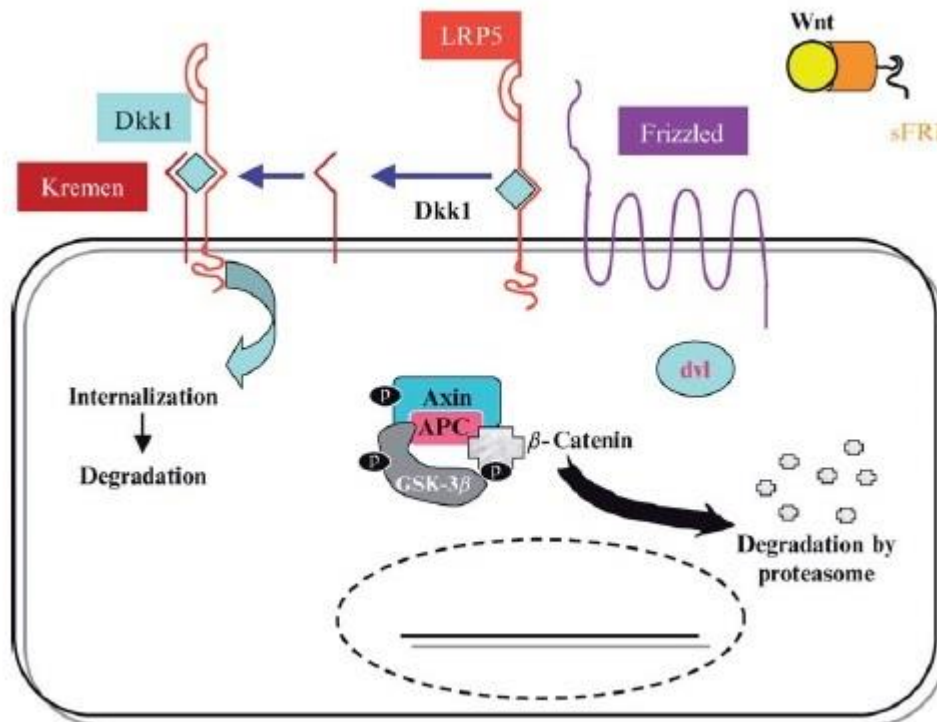
- ❖ Κανονικό Wnt μονοπάτι : αποσκοπεί στην ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων και ρυθμίζεται αρνητικά μερικώς από το SPATS1 γονίδιο.
- ❖ Μη κανονικό Wnt μονοπάτι επίπεδης κυτταρικής πολικότητας: ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό που ευθύνεται για το σχήμα του κυττάρου.
- ❖ Μη κανονικό Wnt /Ca μονοπάτι : Το μη κανονικό Wnt /Ca μονοπάτι ρυθμίζει το ασβέστιο (Ca) εντός του κυττάρου.

Και τα 3 μονοπάτια ξεκινούν από την πρόσδεση κάποιας πρωτεΐνης Wnt σε έναν υποδοχέα της οικογένειας Frizzled και έτσι το βιολογικό μήνυμα μεταδίδεται σε ενδοκυττάριας πρωτεΐνες. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια Wnt έχουν παρακρινή ή και αυτοκρινή δράση. Είναι εξελικτικά συντηρημένα ανάμεσα στα ζώα και αυτό

συνεπάγεται πως είναι παρόμοια από την φρουτόμυγα (*Drosophila melanogaster*) μέχρι τον άνθρωπο (Nusse & Varmus, 1992).

Στην κυτταρική επιφάνεια, οι πρωτεΐνες Wnt δεσμεύονται σε 2 οικογένειες υποδοχέων έτσι ώστε να ξεκινήσει το κανονικό μονοπάτι. Η πρώτη είναι η οικογένεια των LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) ή LRP6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) και η δεύτερη είναι οι Frizzled (Fz) υποδοχείς (Tamai et al, 2004).

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι Wnts ενεργοποιούν διάφορους βιοχημικούς καταρράκτες, ανάμεσα στους οποίους είναι και το πιο καλά μελετημένο κανονικό μονοπάτι, που οδηγεί στη συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα (Clevers & Nusse, 2012). Η β-κατενίνη δεν συσσωρεύεται υπο κανονικές συνθήκες, φαινόμενο που αποτρέπει από ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστροφής της. Το μονοπάτι αυτό ξεκινά με την πρόσδεση μιας πρωτεΐνης Wnt στο σύμπλοκο υποδοχέων Frizzled και LRP5/6. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού, οδηγεί στη φωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής περιοχής του LRP5 ή LRP6, δημιουργώντας μια θέση σύνδεσης για την πρωτεΐνη αξίνη (axin) (MacDonald et al, 2009). Η αξίνη φυσιολογικά βρίσκεται σε αυτό το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιέχει και την APC (adenomatosis polyposis coli) και την GSK3 (glycogen synthase kinase 3). Κατά την απουσία του σήματος Wnt, η GSK3 φωσφορυλιώνει κατάλοιπα κοντά στην αμινοτελική περιοχή της β-κατενίνης έτσι ώστε να οδηγηθεί σε ουβικουϊτινίωση στο πρωτεάσωμα.



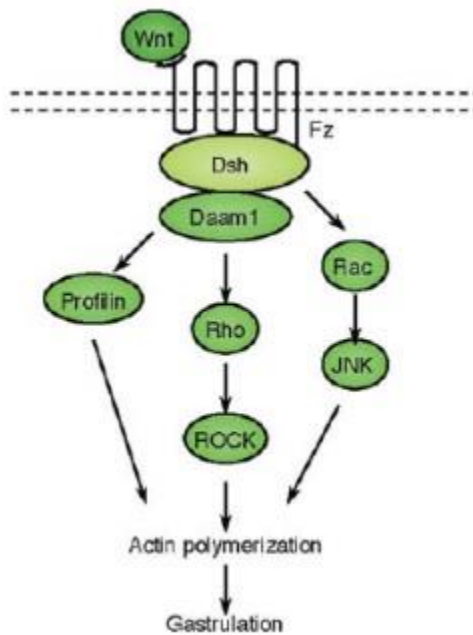
Εικόνα 2: Αναστολή του κανονικού μονοπατιού Wnt από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που επάγει την ουβικουϊτίνωση της β-κατενίνης στο πρωτεύσωμα, από Baron et al, 2006

Η πρόσδεση της αξίνης στο φωσφορυλιωμένο άκρο του LRP5/6 αναστέλει την δράση της GSK3 στην β-κατενίνη (και ίσως την ουβικουϊτίνωση ειδικότερα του μορίου αυτού) με άμεση συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Η συσσώρευση της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στην μεταφορά της στον πυρήνα και συγκεκριμένα στην πρόσδεση της σε μέλη της οικογένειας LEF/TCF που είναι πρωτεΐνες που προσδένονται με την σειρά τους στο DNA και επάγουν την μεταγραφή κάποιων γονιδίων. Πρόσφατα από μια μελέτη προτάθηκε πως το κανονικό Wnt μονοπάτι καταλήγει στην δημιουργία ενός συμπλόκου β-κατενίνης/ενεργοποιητή TAZ και εισέρχονται και οι 2 στον πυρήνα και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων μέσω των πρωτεϊνών TCF/LEF (Azzolin et al, 2012).

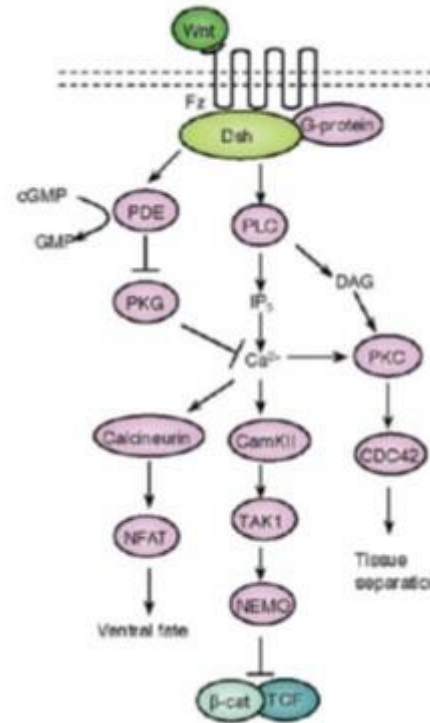
Έγινε αναλυτική περιγραφή του κανονικού μονοπατιού Wnt διότι με αυτό σχετίζεται ο υποδοχέας LRP5 που αφορά την εργασία αυτή. Όμως τα άλλα 2 μονοπάτια Wnt δεν χρησιμοποιούν το LRP5 και γι' αυτό δεν θα αναλυθούν περαιτέρω. Πολύ συνοπτικά μπορούμε να πούμε αρχικά πως και τα 2 αυτά μονοπάτια δεν περιλαμβάνουν την β-κατενίνη. Το μη κανονικό PCP (planar cell polarity) μονοπάτι δεν περιλαμβάνει ως υποδοχέα το LRP-5/6 και θεωρείται πως αντί αυτού περιλαμβάνει μόρια όπως

τα NRH1, Ryk, PTK7 or ROR2 και καταλήγει στην ενεργοποίηση του παράγοντα Rho. Κατ' επέκταση ενεργοποιείται η κινάση ROCK (Rho-associated kinase) που είναι πολύ σημαντικός ρυθμιστής του κυτταροσκελετού. Ενεργοποίηση μορίων όπως το Dsh/Rac1 επιδρούν στον πολυμερισμό της ακτίνης. Αυτό συνεπάγεται την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, μια διαδικασία που συμβαίνει κατά την γαστριδίωση για παράδειγμα.

A)



B)

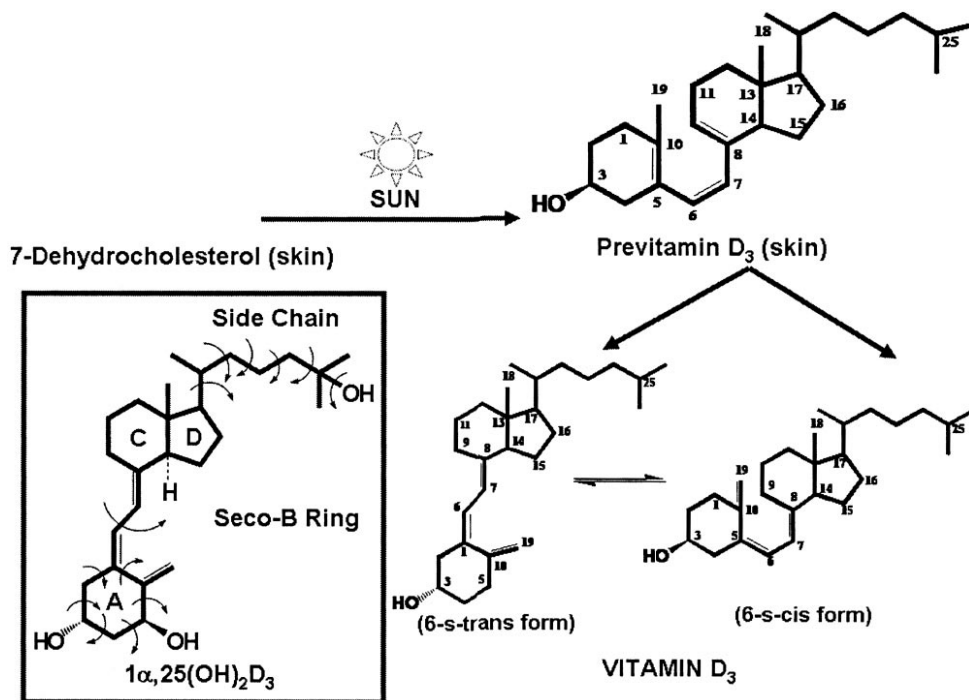


Εικόνα 3: Συνοπτική εικονική αναπαράσταση των βιοχημικών μονοπατιών A) Μη κανονικό Wnt PCP μονοπάτι, B) Μη κανονικό Wnt/Ca μονοπάτι, από Komiyama & Habas, 2008.

Το μη κανονικό Wnt/Ca μονοπάτι δεν περιλαμβάνει επίσης την β-κατενίνη και αποσκοπεί στην ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου που απελευθερώνεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) προκειμένου να ελεγχθεί η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Το μονοπάτι αυτό μέσω των IP3/DAG ενεργοποιεί το Cdc42. Το μόριο αυτό εμπλέκεται στη διαμόρφωση του κοιλιακού προτύπου κατά την εμβρυική ζωή, στην ενεργοποίηση της καλσινευρίνης και της κινάσης CaMKII. Η CaMKII επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFAT, που ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση και διαχωρισμό των ιστών. Η καλσινευρίνη ενεργοποιεί τους TAK1 και την κινάση NLK, που εμπλέκεται με το κανονικό μονοπάτι Wnt και την οικογένεια TCF/β-Catenin (Komiyama & Habas, 2008).

1.1.1. LRP5 και βιταμίνη D

Η βιταμίνη D είναι καθοριστικός ρυθμιστής της ομοιόστασης του ασβεστίου. Οι βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D συμβαίνουν μόνο όταν μετατραπεί μέσω μεταβολικών διεργασιών σε ένα μόριο που παράγεται στους νεφρούς και ονομάζεται 1,25-δihydroξυ-βιταμίνη D₃ [1,25-(OH)₂D₃]. Θεωρείται πως η [1,25-(OH)₂D₃] είναι μια στεροειδής ορμόνη και ότι δρα σαν αυτές μέσω αλληλεπίδρασης με εκλεκτικό υποδοχέα για την βιταμίνη D, τον VDR (Vitamin D receptor). Η βιταμίνη D δεν πρέπει να θεωρείται τυπικά βιταμίνη καθώς δεν προέρχεται από την διατροφή αλλά μια προορμόνη που παράγεται φωτοχημικά στο δέρμα από την 7-δihydroχοληστερόλη. Η μοριακή δομή της είναι αρκετά παρόμοια με αυτή των κλασσικών στεροειδών ορμονών όπως για παράδειγμα οιστραδιόλη, κορτιζόλη, αλδοστερόνη καθώς φέρουν παρόμοιο δακτύλιο (Norman, A. W., 2008).



Οι δράσεις της 1,25-(OH)₂D₃ στο έντερο, νεφρούς και οστά είναι ζωτικής σημασίας για την διατήρηση των επιπέδων του ασβεστίου και φωσφόρου. Η ομοιόσταση των στοιχείων αυτών έχει μεγάλη σημασία για τον σκελετό των σπονδυλωτών θηλαστικών (Sutton & MacDonald, 2003). Η 1,25-(OH)₂D₃ εισέρχεται στα κύτταρα

και προσδέεται στον υποδοχέα VDR. Οι υποδοχείς VDR ανήκουν στην υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών-θυρεοειδικών ορμονών και εκφράζονται στα περισσότερα όργανα όπως για παράδειγμα στον εγκέφαλο, καρδιά, δέρμα, προστάτης, γονάδες, μαστοί. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών στο έντερο, οστά, νεφρούς και στους παραθυρεοειδείς αδένες στοχεύει στην διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων ασβεστίου και φωσφόρου στο αίμα (μια δράση που επιτελείται κυρίως από τις ορμόνες καλσιτονίνη και παραθορμόνη) και επηρεάζουν στον οστικό μεταβολισμό (Holick M. F., 2004). Η βιταμίνη D γνωρίζουμε πως επιδρά στους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες και επιπροσθέτως εμπλέκεται στον έλεγχο της λειτουργίας των ώριμων οστεοβλαστών και συγκεκριμένα στην έκκριση μορίων του οστικού στρώματος καθώς και στην ενεργοποίηση της ασβεστοποίησης των οστών (Aubin, & Heersche, 2005). Οι δράσεις της στους οστεοβλάστες είναι αρκετά πολύπλοκη καθώς επιδρά στον πολλαπλασιασμό και στην διαφοροποίηση τους και «κατευθύνει» προγονικά κύτταρα να γίνουν οστεοβλάστες (Ducy al, 1997).

Το κανονικό Wnt μονοπάτι παίζει κρίσιμο ρόλο στον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και φαίνεται να επιδρά καθοριστικά στην διαμόρφωση των οστών κατά την ανάπτυξη του οργανισμού. Έχει δειχθεί πως η 1,25-(OH)₂D₃ επάγει την έκφραση του LRP5 στα κύτταρα των οστών με κύριο στόχο τους οστεοβλάστες και τα οστεοπρογονικά κύτταρα (Hartmann C., 2006). Ο μηχανισμός θετικής ρύθμισης του LRP5 οφείλεται σε 3 περιοχές ελέγχου στο γονίδιο του, μια τουλάχιστον απ' τις οποίες περιέχει ένα συγκεκριμένο στοιχείο VDRE (Vitamin D response element) αλληλουχία DNA που βρίσκεται στον υποκινητή γονιδίων που ρυθμίζονται από την βιταμίνη D. Γνωρίζουμε πως η 1,25-(OH)₂D₃ μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα της, στοχεύει τις περιοχές VDRE και επάγει τελικά την τροποποίηση της δομής της χρωματίνης και την προσπέλαση από την RNA πολυμεράση II. Φαίνεται πως η 1,25-(OH)₂D₃ ρυθμίζει θετικά το LRP5 γιατί επάγει την μεταγραφή του γονιδίου του αλλά αυξάνει και τον αριθμό του ενδογενούς LRP5 mRNA (Fretz et al, 2006). Σε μια μελέτη των Papathanasiou et al, (2010), χορηγήθηκε 1,25-(OH)₂D₃ σε ασθενείς με οστεοαρθρίτιδα και φάνηκε πως διεγείρει την μεταγραφή του LRP5 mRNA στα χονδροκύτταρα των ασθενών. Η δράση αυτή ήταν δόσοεξαρτώμενη και επηρεάζεται από το διάστημα χορήγησης. Η ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης βέβαια έδειξε πως ο υποκινητής του LRP5 στα γονίδια των ασθενών δεν περιέχει διατηρημένα στοιχεία VDRE για το κανονικό

μονοπάτι Wnt, υποδεικνύοντας έναν έμμεσο και πιο σύνθετο τρόπο επαγωγής του LRP5. Βέβαια το συμπέρασμα της μελέτης ήταν πως η θετική ρύθμιση του LRP5 mRNA και η ανάλογη αυξημένη έκφραση του LRP5 στα χονδροκύτταρα των ασθενών με οστεοαρθρίτιδα οδήγησε σε αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνης στη νόσο.

1.1.2. Βιοχημικό μονοπάτι του LRP5

Το γονίδιο της πρωτεΐνης LRP5 [low-density-lipoprotein (LDL) receptor related protein-5] στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και μάλιστα στην περιοχή 11q13.2 και αποτελείται από 28 εξώνια.

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη-υποδοχέα που δεσμεύει και εισάγει μόρια-προσδέματα στο κύτταρο με μια διαδικασία που ονομάζεται ενδοκυττάρωση. Η πρωτεΐνη LRP5 λειτουργεί και σαν συν-υποδοχέας μαζί με την οικογένεια πρωτεϊνών Frizzled για την μεταγωγή σημάτων μέσω του μονοπατιού Wnt. Αρχικά είχε μελετηθεί για την σχέση της με την εμφάνιση διαβήτη τύπου 1 στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα το ανθρώπινο γονίδιο LRP5 βρίσκεται στην περιοχή IDDM4 (η οποία έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με διαβήτη τύπου I) στο χρωμόσωμα 11q13 (Twells et al, 2003). Πολυμορφισμοί στο LRP5 σχετίζονται για παράδειγμα με παχυσαρκία και άλλες μεταβολικές νόσους (Jin, T., 2008)

Έχει καταλυτικό ρόλο στην ομοίωση των οστών και έχει βρεθεί πως πολλές διαταραχές οστικής πυκνότητας σχετίζονται με μεταλλάξεις του γονιδίου του LRP5 (Gong et al., 2001, Boyden et al., 2002, Norwitz et al., 2019, Van Wesenbeeck et al., 2003, Fujino et al., 2003).

Μεταλλάξεις του γονιδίου του LRP5 προκαλούν οικογενή εξιδρωματική υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια. Μάλιστα αν το γονίδιο αυτό υποβληθεί σε εναλλακτικό μάτισμα (splicing) τότε μπορεί να προκύψουν πολλαπλές παραλλαγές της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση δυσλειτουργίες (RefSeq, May 2014).

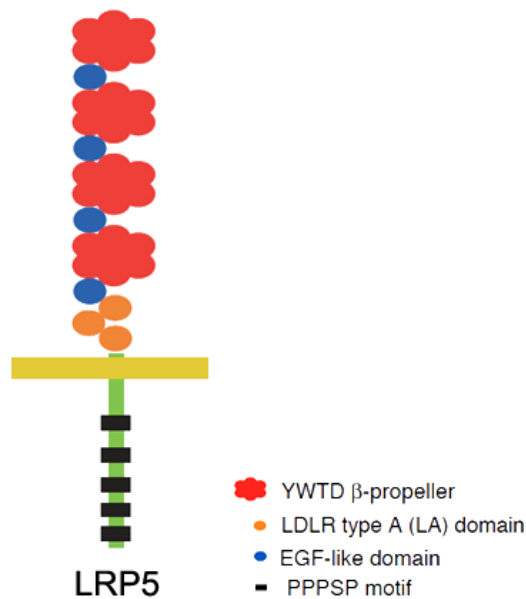


Figure 1: Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της πρωτεΐνης LRP5, από He et al, 2004

Η LRP5 περιέχει μια μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή που καλύπτει περίπου το 85% από τα 1600 αμινοξέα της πρωτεΐνης. Στην αμινοτελική περιοχή στην εξωκυτταρική πλευρά υπάρχουν 4 περιοχές διαμόρφωσης β-προπέλας (4-8 β-φύλλα τοποθετημένα σπειροειδώς γύρω από έναν κεντρικό άξονα) και 4 επαναλήψεις EGF που σχηματίζουν την περιοχή πρόσδεσης για τα εξωκυτταρικά σήματα. Οι περιοχές αυτές συνεχίζουν με 3 περιοχές LDLR τύπου A. Ενδοκυτταρικά υπάρχουν 5 περιοχές PPPSP οι οποίες όταν φωσφορυλιωθούν μέσω του Wnt μονοπατιού, προσδένεται η αξίνη (Axin) (Zhong & Williams, 2011).

Η LRP5 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς του σώματος και εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες. Μάλιστα στη βιβλιογραφία (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000162337-LRP5/tissue>) υπάρχει σχηματική αναπαράσταση των ιστών αυτών που έχει βρεθεί η πρωτεΐνη LRP5 ενώ παρατηρούμε πως δεν αναγράφονται κάποιοι όπως για παράδειγμα ο πλακούντας. Γνωρίζουμε πως το LRP5 είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών (Gong et al., 2001) , ενώ ρυθμίζει την κατανομή του λίπους στο σώμα μέσω επίδρασης στα πρόδρομα λιποκύτταρα (Loh et al, 2015).

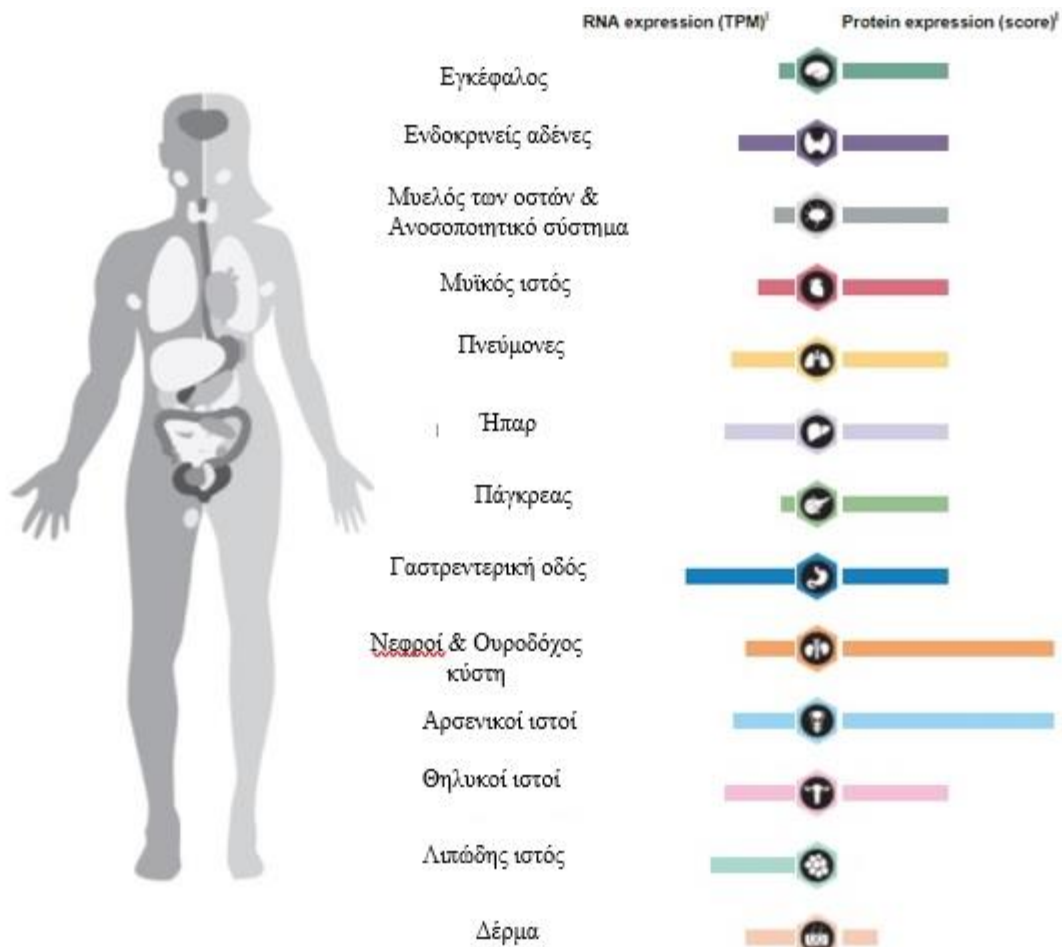


Figure 2: Επεξεργασμένη εικόνα κατανομής πρωτεΐνης LRP5 στους ιστούς του ανθρώπου, από <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000162337-LRP5/tissue>

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το γονίδιο LRP5 έχει εμπλακεί στην παθογένεια κάποιων διαταραχών. Περιληπτικά μπορούμε να αναφέρουμε πως έχει ενοχοποιηθεί για :

- ❖ Σύνδρομο Οστεοπόρωσης-Ψευδογλοιώματος (OPPG): Τα παιδιά με το αυτοσωμικό υποτελές αυτό σύνδρομο έχουν πολύ χαμηλή οστική πυκνότητα και είναι επιρρεπή σε κατάγματα και οστικές παραμορφώσεις. Εκτός από το σκελετικό φαινότυπο, υπάρχουν και περιστατικά με οφθαλμικά συμπτώματα όπως το rphthisis bulbi (συρρικνωμένος και μη λειτουργικός οφθαλμός). Η μελέτη των Ai et al. κατέδειξε πως μεταλλάξεις στο LRP5 είναι αυτές που επάγουν υαλοειδοαμφιβληστροειδική παθολογία και σκελετική ευθραυστότητα, μέσω δυσλειτουργίας των σηματοδοτικών μονοπατιών των

Wnt & Norrin και οδηγούν στην εμφάνιση του συνδρόμου OPPG (Ai et al, 2005).

- ❖ Οικογενής εξιδρωματική υαλοειδοαμφιβληστροειδοπάθεια (FEVR): Η νόσος αυτή αφορά μια κληρονομική διαταραχή των αγγείων του οφθαλμού κατά την ανάπτυξη. Παρουσιάζει 100% διεισδυτικότητα αλλά τα κλινικά συμπτώματα μέσα στις οικογένειες εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια. Φαίνεται πως μεταλλάξεις του LRP5 και ειδικότερα της περιοχής EVR1, προκαλούν FEVR, σε ένα 15% των ασθενών, αναδεικνύοντας την σημασία της πρωτεΐνης ακόμη και για την νόσο αυτή (Toomes et al, 2004).
- ❖ Καρκίνο του μαστού: Μετάλλαξη δίχως νόημα (μειωμένο μέγεθος πρωτεΐνης γιατί ένα αμινοξύ μετατρέπεται σε κωδικόνιο λήξης με αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό σύνθεσης της) στην πρωτεΐνη LRP5 βρέθηκε σε περισσότερο από 58% ασθενών με καρκίνο μαστού διαφόρων σταδίων, μεταξύ των οποίων στο μεταστατικό καρκίνωμα και στο *in situ* καρκίνωμα (Björklund et al, 2009).
- ❖ Τα επίπεδα του LRP5 φαίνεται να είναι ένας νέος και ιδιαίτερα αξιόπιστος δείκτης εξέλιξης του οστεοσαρκώματος (Guo et al, 2008).
- ❖ High bone mass (HBM): Το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt δεν είναι απαραίτητο μονάχα στην εμβρυογένεση αλλά και για την ανάπτυξη και ομοιόσταση των οστών. Μελέτες όπως αυτή των Gong et al., 2001 δείχνουν πως μεταλλάξεις του LRP5 μπορεί να είναι η αιτία για περιπτώσεις οικογενούς οστεοπόρωσης, διαταραχές οστικής πυκνότητας και οφθαλμικές διαταραχές. Γνωστές πια μεταλλάξεις όπως η G171V έδωσαν πληροφορίες για την μεγάλη σημασία της πρωτεΐνης για την οστική πυκνότητα. Μεταλλάξεις που σταματούν την λειτουργία του LRP5 οδηγούν σε μειωμένη οστική πυκνότητα, ενώ μεταλλάξεις που κάνουν το LRP5 "υπερδραστήριο", την αυξάνουν (Babij et al., 2003).
- ❖ Παχυσαρκία: Ολοένα και μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των παχύσαρκων ανθρώπων με την πάροδο των ετών, οδηγώντας τους ασθενείς αυτούς σε διαβήτη, καρδιοπάθειες και υπέρταση. Το LRP5 μεταξύ των πολλών ιστών που εκφράζεται, βρίσκεται ιδιαίτερα αυξημένο στα ηπατοκύτταρα και στα β-παγκρεατικά κύτταρα. Από δεδομένα μελετών γνωρίζουμε πως μπορεί να δεσμεύσει την απολιποπρωτεΐνη E (apoE), επιδρώντας στην ηπατική κάθαρση της. Από πειράματα σε ποντίκια με ανεπάρκεια LRP5 έχει φανεί πως όταν η

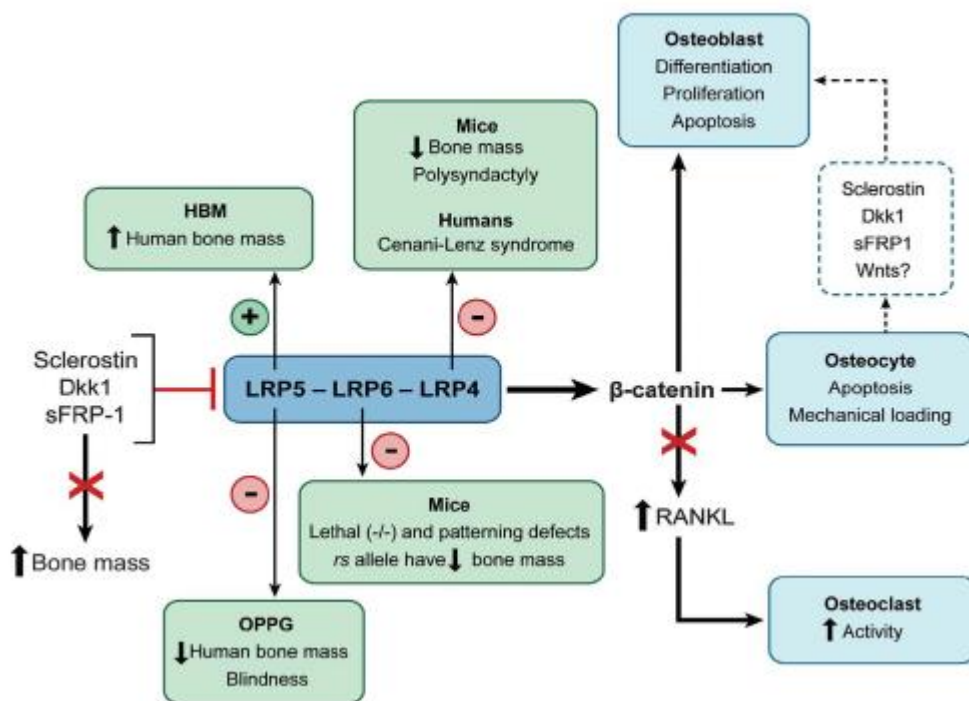
διατροφή τους είναι πλήρης και φυσιολογική, υπάρχει διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη. Τα κύτταρα από τα νησίδια Langerhans των ποντικών βρέθηκε να έχουν σημαντικά μειωμένα επίπεδα ενδοκυττάρου ATP και ιόντων ασβεστίου (Ca^{+2}) αναλογικά με την ποσότητα γλυκόζης που λάμβαναν από την διατροφή τους, αλλά και η έκκριση ινσουλίνης για τα επίπεδα αυτά ήταν επίσης μειωμένη (Magoori et al, 2003).

1.1.3. Σχέση του LRP5 με τα οστά

Η εμπλοκή της πρωτεΐνης LRP5 σε διάφορες παθολογίες είναι πια επιστημονικά τεκμηριωμένη (Van Wesenbeeck et al, 2003, Saarinen et al, 2007, Balemans et al, 2007, Laine et al, 2011). Μετά από τις παρατηρήσεις και τα πρώτα συμπεράσματα για τον ρόλο του LRP5, αναπτύχθηκαν ζωικά πειραματικά μοντέλα (ποντίκια) έτσι ώστε να γίνει πιο εκτενής μελέτη. Στην μελέτη των Kato et al, (2002) αναπτύχθηκε ποντίκι στο οποίο είχε γίνει αποσιώπηση των 2 αλληλομόρφων γονιδίων της πρωτεΐνης LRP5 (Lrp5 - / -). Αυτά τα ποντίκια εμφάνισαν χαμηλή οστική μάζα παρόμοια με τον φαινότυπο του συνδρόμου Οστεοπόρωσης-Ψευδογλοιώματος στον άνθρωπο καθώς και αποτυχία σχηματισμού των αιμοφόρων αγγείων του υαλοειδούς σώματος κατά την εμβρυογένεση των οφθαλμών, γεγονός που ίσως εξηγεί την προοδευτική τύφλωση που εμφάνιζαν τα πειραματόζωα. Από την μελέτη αυτή σχετικά με τα κύτταρα των οστών φάνηκε πως υπήρχε μειωμένος ρυθμός σχηματισμού των οστών που εξηγήθηκε από την μειωμένη εναπόθεση μετάλλων σε αυτά. Ενώ λοιπόν παρατηρήθηκε μια ήπια πτώση της οστεογένεσης, το κυριότερο πρόβλημα αφορούσε τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών. Το φαινόμενο αυτό διερευνήθηκε περαιτέρω με απομόνωση και καλλιέργεια οστεοβλαστών, όπου δεν βρέθηκε δομική διαφορά στα κύτταρα αυτά. Έτσι φαίνεται πως ο μειωμένος πολλαπλασιασμός των οστεοβλαστών οφείλεται σε απουσία του LRP5 και κατ' επέκταση διαφορετικά εξωκυττάρια σήματα (Yadav et al, 2008).

Ο ρόλος της πρωτεΐνης LRP5 δεν μπορεί να αποσαφηνιστεί δίχως την εμπλοκή του στο μονοπάτι Wnt – β-κατενίνης που περιγράψαμε παραπάνω. Οι περισσότερες ενδείξεις είναι πως δυσλειτουργία του LRP5 επιδρά, μέσω της β-κατενίνης, διαφορετικά στους μεταγραφικούς παράγοντες Tcf / Icf και FoxO και έτσι απορρυθμίζεται η μεταγραφική δραστηριότητα άλλων γονιδίων (Behrens et al, 1996).

Στο παρακάτω πολύ ενδιαφέρον διάγραμμα φαίνεται πως τα μόρια σκληροστίνη (Sclerostin), Dkk1 και sFRP-1 αναστέλλουν την β – κατενίνη μέσω αλληλεπίδρασης με τα μόρια LRP. Μεταλλάξεις στα ανθρώπινα κύτταρα που παράγουν σκληροστίνη και στα γονίδια Dkk1 οδηγούν σε αυξημένη οστική μάζα. Στα οστικά κύτταρα η β – κατενίνη σηματοδοτεί την ρύθμιση της απόπτωσης και σε απόκριση των μηχανικού φορτίου και μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία των οστεοβλαστών μέσω της παραγωγής της σκληροστίνης, Dkk1, sFRP-1, και άλλων πρωτεϊνών του μονοπατιού Wnt.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του κομβικού ρόλου της πρωτεΐνης LRP5 (και των LRP6, LRP4) και των παθολογικών καταστάσεων που προκύπτουν από την δυσλειτουργία της, από Johnson, M. L., (2012).

Οι γνώσεις μας σχετικά με το LRP5 και την επίδραση του στον οστικό μεταβολισμό εμπλουτίστηκαν περαιτέρω μετά την μελέτη των Yadav et al, (2008) όπου μετά την ανακάλυψη της έκφρασης του στα εντεροχρωμαφινικά κύτταρα, πρότειναν πως ρυθμίζει την οστική πυκνότητα μέσω ενδοκρινικού μηχανισμού που περιλαμβάνει την σεροτονίνη. Παρουσίασαν στοιχεία πως η πρωτεΐνη LRP5 ελέγχει την έκφραση του μορίου Trh1, ενός κύριου ρυθμιστή την σύνθεσης σεροτονίνης. Στο μοντέλο τους το LRP5 φυσιολογικά αναστέλλει το Trh1 και κατ' επέκταση κατευθυνόμενη σύνθεση σεροτονίνης από τα εντεροχρωμαφινικά κύτταρα. Έτσι στην περίπτωση των

Lrp5 – / – ζώων η αναστολή έκφρασης του Tph1 επάγει την αυξημένη σύνθεση σεροτονίνης, η οποία στη συνέχεια προσδένεται στον μεταφορέα σεροτονίνης Htr1b στους οστεοβλάστες. Εκεί αναστέλλεται η έκφραση του γονιδίου Creb που οδηγεί τελικά σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών.

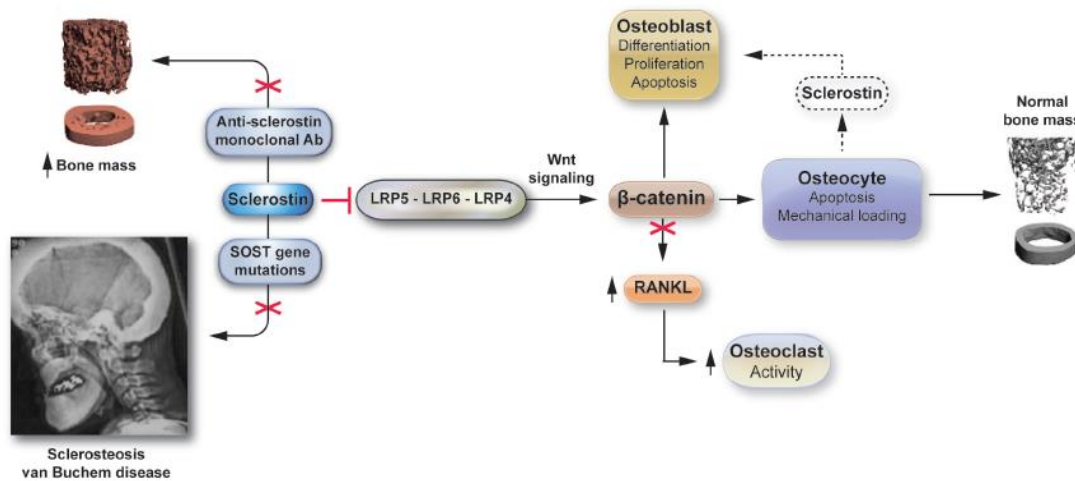
1.1.4.Ο ρόλος της σκληροστίνης (Sclerostin)

Η σκληροστίνη είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο SOST. Είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην υπερικογένεια ανταγωνιστών των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMP). Παράγεται κυρίως από τα οστεοκύτταρα και τα χονδροκύτταρα, αν και εκφράζεται και σε άλλους ιστούς και έχει αντι-αναβολικό ρόλο στον σχηματισμό των οστών (Hernandez et al, 2014) μέσω δράσης στους οστεοβλάστες (Burgers & Williams, 2013). Το γονίδιο SOST εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και συγκεκριμένα στη θέση 17q12–q21 στον άνθρωπο (Van Bezooijen et al, 2005) και αρχικά αναγνωρίστηκε ως ανταγωνιστής των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών. Πρόσφατα έχειδειχθεί πως η σκληροστίνη δεσμεύεται στους υποδοχείς LRP5/6 και αναστέλλει τελικά το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt (Burgers & Williams, 2013). Η αναστολή του μονοπατιού αυτού οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό σχηματισμού των οστών. Δεν είναι σαφώς γνωστοί οι μηχανισμοί αλλά θεωρείται πως ο μειωμένος ρυθμός σχηματισμού των οστών μέσω της σκληροστίνης δεν γίνεται μέσω των πρωτεϊνών BMP αλλά μέσω του μονοπατιού Wnt (Van Bezooijen et al, 2007). Η παραγωγή σκληροστίνης στα οστεοκύτταρα αναστέλλεται από την παραθορμόνη (Bellido et al, 2013), τα μηχανικά φορτία (Robling et al, 2008) και από κυτταροκίνες όπως η προσταγλαδίνη E2 (Genetos et al, 2011), καθώς και άλλα μόρια. Η παραγωγή της διεγείρεται από την καλσιτονίνη (Gooi et al, 2010) Παρ' όλα αυτά η δραστηριότητα των οστεοβλαστών ρυθμίζεται με αρνητικό ανατροφοδοτικό μηχανισμό.

Γενετική εξάλειψη του γονιδίου της σκληροστίνης οδηγεί αυξημένη οστική πυκνότητα λόγω αυξημένου ρυθμού σχηματισμού των οστών σε ποντίκια αλλά και στον άνθρωπο (Li et al, 2008).

Η σκληροστίνη δεσμεύεται στις πρωτεΐνες LRP5/6/4 και αναστέλλει την ικανότητα του ενδοκυτταρικού μέρους του μορίου LRP5 να δεσμεύσει την πρωτεΐνη Αξίνη (Axin) και την β – κατενίνη από το ενδοκυττάριο σύμπλεγμα που βρίσκεται. Αυτές οι

δράσεις οδηγούν στην φωσφορυλίωση της β – κατενίνης και τελικά αποδομείται με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού Wnt (Yanagisawa et al, 2014).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση όπου φαίνεται η αλληλεπίδραση της σκληροστίνης με το LRP5 και κατ' επέκταση ο ρόλος της στην μορφογένεση των οστών, από Yanagisawa et al, (2014).

Επομένως το μόριο LRP5 εμπλέκεται μέσω διαφορετικών και ακόμη όχι καλά διευκρινισμένων οδών σε διάφορες παθολογίες και σύμφωνα με πληθώρα μελετών έχει επίδραση στην ποιότητα των οστών, γεγονός που εμπλέκει και την βιταμίνη D. Επίσης εμπλέκεται στο μονοπάτι Wnt που είναι ένα πολύ καθοριστικό μονοπάτι για την ανάπτυξη και αν δυσλειτουργεί υπάρχουν δυσμενείς επιπτώσεις για την υγεία του ατόμου, μερικές από τις οποίες αναλύθηκαν παραπάνω. Έπειτα γνωρίζουμε πως υπάρχει αυξημένη έκφραση του LRP5 στα παγκρεατικά κύτταρα απ' όπου παράγεται η ινσουλίνη. Επομένως μια διαταραχή που επηρεάζει την παραγωγή ή την δράση της ινσουλίνης ίσως να επηρεάζει και τα επίπεδα έκφρασης του μορίου LRP5. Μια τέτοια παθολογία είναι ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης όπου εμφανίζεται υπεργλυκαιμία χωρίς προηγούμενο ιστορικό διαβήτη στην κυοφορούσα μητέρα. Έχοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα, αλλά και τις μελέτες που αφορούν την έκφραση του LRP5 σε διάφορους ιστούς, εξετάσαμε την έκφραση του LRP5 σε ιστούς πλακούντα από μητέρες με διαβήτη κύησης.

1.2. Πλακούντας

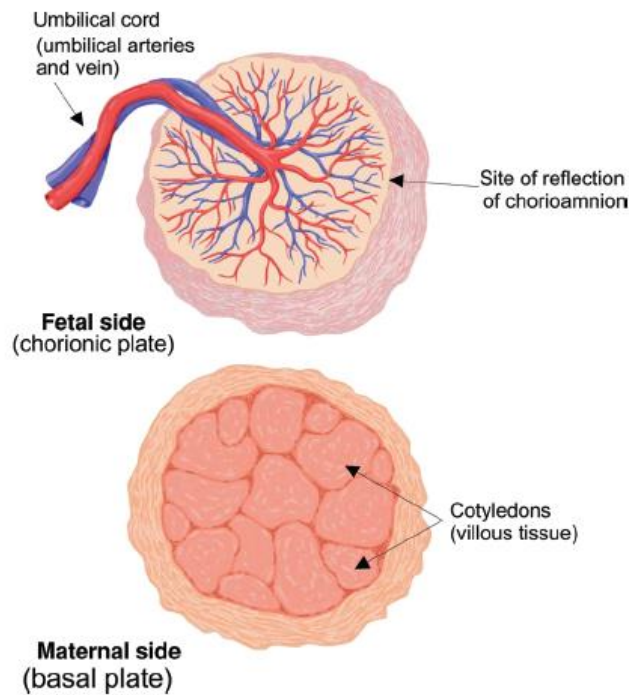
1.2.1. Ανατομία και προέλευση πλακούντα

Ο πλακούντας είναι ένα «προσωρινό» όργανο πρωταρχικής σημασίας για την επιβίωση και εξέλιξη του εμβρύου που εμφανίζει πλήρη λειτουργικότητα από τη 12η εβδομάδα (μετά από την οποία εγκαθίσταται η εμβρυοπλακουντιακή κυκλοφορία) (Burton & Fowden, 2012). Ο πλακούντας αναπτύσσεται διαρκώς μέχρι το τέλος της κύησης με κυτταρικές διαιρέσεις (κυρίως) μέχρι την 34η εβδομάδα και με κυτταρική υπερτροφία (κυρίως) στη συνέχεια. Κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, τα ζωοτόκα θηλαστικά αναπτύσσουν ένα σύστημα μεμβρανών που περιβάλλουν το έμβρυο. Η προσκόλληση αυτών των εμβρυικών μεμβρανών με το βλεννογόνο της μήτρας με σκοπό την ανταλλαγή μορίων μεταξύ εμβρύου και μητέρας, σηματοδοτεί την έναρξη σχηματισμού του πλακούντα. Οι εμβρυικές μεμβράνες υπάρχουν στην μητρική κοιλότητα και έρχονται σε επαφή με σχεδόν ολόκληρη την επιφάνεια του ενδομητρίου. Η περιοχή επαφής μητέρας-εμβρύου που αποτελείται δηλαδή από μεμβράνες και ενδομήτριο, συνιστά τον πλακούντα. Είναι επομένως ο συνδετικός κρίκος μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου που μάλιστα αποτελεί δίοδο αλλά και σημαντικό φραγμό μορίων ανάμεσα τους. Επίσης είναι το μοναδικό όργανο που διαφέρει τόσο πολύ μεταξύ διαφορετικών ειδών. Παρ' όλα αυτά διακρίνουμε ένα δομικό χαρακτηριστικό που υπάρχει σε κάθε τύπο πλακούντα, και αυτό είναι οι 2 ξεχωριστές αιματικές κυκλοφορίες που υπάρχουν, η μητρική και η εμβρυική κυκλοφορία (Gilbert-Barness E., 1996).

Ο πλακούντας σχηματίζεται από την συγχώνευση του χόριου και της αλλαντοΐδας στην αρχή της εγκυμοσύνης και μέχρι την 18^η εβδομάδα κύησης έχει αναπτυχθεί πλήρως. Φυσιολογικά έχει δισκοειδές σχήμα, με διάμετρο: 15-20cm, βάρος: 500-600g, πάχος: 3-4cm. Το βάρος του πλακούντα εξαρτάται από το βάρος του εμβρύου και μάλιστα υπάρχει συγκεκριμένη αναλογία μεγέθους εμβρύου και πλακούντα. Αν η αναλογία αυτή δεν είναι σωστή, τότε υπάρχει υπόνοια παθολογίας (Benirschke et al, 2006). Το άμνιο είναι μια μονή στοιβάδα επιθηλίου που περιβάλλει το έμβρυο και έχει μια υποκείμενη βασική μεμβράνη και ανάγγειο συνδετικό ιστό. Το χόριο αποτελείται από μεσέγγυμα, κυτταροτροφοβλάστη και αγγεία που είναι προέκταση των σπειροειδών αρτηριολίων του βασικού φθαρτού (Aplin & Kimber, 2004).

Κατά την κύηση το ενδομήτριο αποκαλείται φθαρτός και το σημείο σύνδεσης του με τον πλακούντα λέγεται βασικός φθαρτός (αποτελείται από μια στιβάδα μεγάλων κυττάρων που περιέχουν λιπίδια και γλυκογόνο) και μάλιστα συνιστά την μητρική επιφάνεια του πλακούντα. Η επιφάνεια αυτή έχει 10-40 οδοντώσεις που συνιστούν τις κοτυληδόνες. Διακλαδώσεις της ομφαλικής κυκλοφορίας αιματώνουν κάθε κοτυληδόνα και τα όρια κάθε κοτυληδόνας διατηρούνται μέσω των πλακουντιακών διαφραγμάτων (εσολκές του φθαρτού μέσα στον πλακούντα) (Huppertz, B., 2008).

Η εμβρυική επιφάνεια (χοριακή ή αμνιονική) που επενδύει την αμνιακή κοιλότητα και στην οποία συγκλίνουν προς τον ομφάλιο λώρο μεγάλες αρτηρίες και φλέβες, τα χοριακά αγγεία. Ο ομφάλιος λώρος περιέχει 1 φλέβα και 2 αρτηρίες (αφού προέρχονται από τις έσω λαγόνιες αρτηρίες του εμβρύου) που περιβάλλονται και προστατεύονται από μια βλεννώδη ουσία. Η ομφαλική φλέβα περιέχει αρτηριακό (οξυγονωμένο) αίμα, το οποίο μεταφέρει από τον πλακούντα στην πυλαία φλέβα και από εκεί στην κάτω κοίλη φλέβα του εμβρύου. Οι ομφαλικές αρτηρίες περιέχουν φλεβικό (αποξυγονωμένο) αίμα και εκφύονται από την έσω λαγόνιο αρτηρία του εμβρύου αιματώνοντας η κάθε μια το 50% του πλακούντα. Τα σημεία του πλακούντα στα οποία η εμβρυική και η μητρική πλευρά συγκλίνουν, σχηματίζουν το χοριοάμνιο, το οποίο περιέχει το αμνιακό υγρό. Το αμνιακό υγρό, στα πρώτα στάδια της κύησης, σχηματίζεται από την έκκριση και τη διήδρωση υγρού διά μέσου του αμνίου και του εμβρυϊκού δέρματος και αργότερα από την αποβολή των ούρων του εμβρύου μέσα στην αμνιακή κοιλότητα. Όμως, στο σύνολό της, η ακριβής προέλευση του αμνιακού υγρού είναι ακόμα αδιευκρίνιστη (Bali & Mukhopadhyay, 2004).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της διαφορετικής μορφολογικής και κατ' επέκταση λειτουργικής δομής του πλακούντα, από Rampersad et al, 2011.

Η χοριακή λάχνη αποτελεί τη λειτουργική μονάδα του πλακούντα. Η συνολική έκταση των χοριακών λαχμών στο τέλος της κύησης ξεπερνά τα 12 m². Οι λάχνες με τις πολλαπλές διακλαδώσεις τους έρχονται σε επαφή με τη μητρική κυκλοφορία και αποτελούν την επιφάνεια ανταλλαγής αερίων και ουσιών μεταξύ του μητρικού και του εμβρυϊκού οργανισμού, που εξασφαλίζει την αναπνοή και τη διατροφή του εμβρύου. Η μητρική και εμβρυϊκή κυκλοφορία χωρίζονται από την πλακουντιακή μεμβράνη και η ανταλλαγή αερίων και ουσιών γίνεται διά μέσου της πλακουντιακής μεμβράνης, που λειτουργεί επιλεκτικά επιτρέποντας ή εμποδίζοντας τη διέλευση ουσιών. Στη διάρκεια των συστολών, φαίνεται ότι υπάρχει μεγαλύτερη διαθέσιμη ποσότητα αίματος για ανταλλαγή (Kiserud T., 2005).

1.2.2. Λειτουργία πλακούντα

Όπως είδαμε ο πλακούντας είναι ένα πολύ σύνθετο δομικά όργανο το οποίο ρυθμίζει την επικοινωνία μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Εκτός από δομική πολυπλοκότητα όμως, το όργανο αυτό συντελεί σε πολλές λειτουργίες οι οποίες παρατίθενται συνοπτικά ως εξής:

- **Ανταλλαγή αερίων** όπως O₂, CO₂, CO
- **Εξισορρόπηση υγρών και pH:** Τα απόβλητα από το έμβρυο όπως ουρία, ουρικό οξύ και κρεατινίνη μεταφέρονται στο μητρικό αίμα μέσω του πλακούντα.
- **Συνθετικές και εκκριτικές λειτουργίες:** παραγωγή ορμονών όπως προγεστερόνη, οιστρογόνα, ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη, σωματομαμοτροπίνη, σωματοστατίνη, ανασταλτίνη.
- **Μεταβολισμός ουσιών και θρέψη εμβρύου:** Υποβοηθούμενη διάχυση γλυκόζης και ενεργητική μεταφορά μεγάλων μορίων, αμινοξέων, βιταμινών, σιδήρου.
- **Καταβολισμός και απορρόφηση**
- **Διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας**
- **Ανοσολογικές ρυθμίσεις:** Τα IgG αντισώματα μπορούν να διέλθουν μέσω του πλακούντα προστατεύοντας το έμβρυο μέσα στην μήτρα. Η διαδικασία αυτή ξεκινά περίπου την 20^η εβδομάδα κύησης. Τα αντισώματα της μητέρας μένουν στο σώμα του εμβρύου για αρκετούς μήνες μετά τον τοκετό προσφέροντας χυμική ανοσία όμοια με την δική της. Βέβαια τα IgM αντισώματα δεν μπορούν να περάσουν μέσω του πλακούντα και γι' αυτό κάποιες λοιμώξεις κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να είναι ιδιαίτερα βλαπτικές για το έμβρυο.
- Ο πλακούντας λειτουργεί σαν **εφεδρεία αίματος** για το έμβρυο, καθώς σε περίπτωση υπότασης για παράδειγμα του παρέχει το αίμα για να αντιμετωπίσει την κατάσταση αυτή.

Γενικά, ο πλακούντας συμπεριφέρεται σαν ημιδιαπερατή μεμβράνη μεταξύ της εμβρυϊκής και της μητρικής κυκλοφορίας επιτρέποντας τη δίοδο θρεπτικών κυρίως ουσιών με απλή διάχυση, ενεργητική μεταφορά ή φαγοκυττάρωση. Ο πλακούντας, ενώ αποτελεί φραγμό για πολλές ουσίες και παθογόνα βακτηρίδια, μπορεί να είναι διαπερατός από άλλες, λιποδιαλυτές κυρίως, ουσίες (π.χ. οινόπνευμα, νικοτίνη, οπιούχα) και διάφορους μικροοργανισμούς (π.χ. τους ιούς: ερυθράς-έρπητα-HIV, το τοξόπλασμα, την ωχρά σπειροχάιτη κ.λπ.) που περνούν από τη μητρική στην εμβρυϊκή κυκλοφορία. Ο πλακούντας χρησιμοποιεί, για τον δικό του μεταβολισμό, το 50% περίπου των θρεπτικών στοιχείων που προσφέρονται από τη μητρική κυκλοφορία (δεσμεύοντας π.χ. περισσότερο από το 50% της μητρικής γλυκόζης). Ο πλακούντας μπορεί να συνθέσει ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία επαρκούν για το έμβρυο τουλάχιστον μέχρι και το δεύτερο τρίμηνο της κύησης. Στο τρίτο τρίμηνο, φαίνεται ότι το έμβρυο αναλαμβάνει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων διότι αυξάνουν οι απαιτήσεις για τη σύνθεση του υποδόριου λίπους του (Ιατράκης, 2009).

Ο πλακούντας είναι, επίσης, ένα είδος «ενδοκρινούς αδένου» που παράγει στεροειδείς ορμόνες (οιστραδιόλη, οιστρόνη, οιστριόλη, προγεστερόνη κ.λπ.), όμοιες με αυτές της ωοθήκης ή των επινεφριδίων, και πρωτεϊνικές ορμόνες (χοριακή γοναδοτροπίνη, πλακουντιακό γαλακτογόνο κ.ά.) από τη συγκυτιακή τροφοβλάστη, ενώ η κυτταροτροφοβλάστη (σαν είδος «υποθαλάμου-υπόφυσης») είναι υπεύθυνη για την έκκριση των εκλυτικών παραγόντων των ορμονών αυτών. Ο πλακούντας προμηθεύεται τις πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση των ορμονών αυτών από το έμβρυο και τη μητέρα ενώ δεν διαθέτει όλα τα απαραίτητα ένζυμα για τα πρώτα στάδια της στεροειδογένεσης. Η αλληλεξάρτηση μεταξύ εμβρύου και πλακούντα συνθέτει την έννοια της «εμβρυοπλακουντιακής» μονάδας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γεγονός ότι ο πλακούντας έχει ανάγκη τη συμμετοχή του εμβρύου για τη σύνθεση των οιστρογόνων. Αρχικά, τα οιστρογόνα (όπως και η προγεστερόνη) παράγονται από το ωχρό σωματίο (μέχρι την 8η εβδομάδα της κύησης) και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης, προκαλώντας αύξηση της τοπικής αιμάτωσης. Σε πειραματόζωα, φάνηκε ότι η αυξημένη σύνθεση λιπιδίων είναι μια από τις πρώτες και πιο δραματικές αντιδράσεις της μήτρας στα οιστρογόνα (Aizawa & Mueller, 1961). Αργότερα, τη σύνθεση των οιστρογόνων αναλαμβάνει η εμβρυοπλακουντιακή μονάδα, με κύρια μεταβολική οδό εκείνη των C19 στεροειδών. Από τη θεική δεϋδροεπιανδροστερόνη

(DeHydroEpiAndrosterone Sulfate/DHEA-S), που παράγεται από τα επινεφρίδια του εμβρύου και της μητέρας, προέρχεται η Δ4-ανδροστενδιόνη και η τεστοστερόνη που μετατρέπονται σε οιστρόνη και οιστραδιόλη αντίστοιχα υπό την επίδραση αρωματασών. Μετά τη 12η εβδομάδα της κύησης, παρατηρείται μεγάλη αύξηση της οιστριόλης (που αποτελεί το 90% των οιστρογόνων στην κύηση) που οφείλεται στη συμμετοχή της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας (Ιατράκης, 2011). Ο πλακούντας επιδρά, επίσης, στον υποθάλαμο-υποφυσιακό-θυρεοειδικό άξονα του εμβρύου με μεταφορά ουσιών που ρυθμίζουν τη θυρεοειδική του λειτουργία (Βιτωράτος & Ιατράκης 2003).

Όπως αναλύσαμε και παραπάνω ο πλακούντας αποτελεί ένα ενδοκρινές όργανο κατά την κύηση, παράγοντας ορμόνες αναγκαίες για την διατήρηση της. Δυσλειτουργία του πλακούντα επιφέρει δυσμενείς συνέπειες για το έμβρυο οι οποίες καθορίζονται από το είδος και την δυνατότητα αντιμετώπισης τους από τους ειδικούς. Στον διαβήτη ο πλακούντας υφίσταται λειτουργικές και δομικές αλλαγές. Το διαβητικό περιβάλλον σημαίνει πως υπάρχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις ορμονών, θεραπευτικών συστατικών και κυτταροκινών (Desoye et al, 2003). Η βαρύτητα των αλλαγών αυτών σχετίζεται με την ικανότητα ελέγχου του γλυκαιμικού δείκτη σε κρίσιμες περιόδους για την ανάπτυξη του. Επίσης αν δεν διαγνώστηκε ο διαβήτης κύησης στην αρχή της εγκυμοσύνης σημαντικός παράγοντας είναι ο χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ της αρχής της εγκυμοσύνης και της αποκατάστασης του μεταβολικού προφίλ της μητέρας από την θεραπεία για τον διαβήτη.

Η ύπαρξη μη ρυθμισμένου διαβήτη πριν την έναρξη της εγκυμοσύνης φαίνεται να έχει συνέπειες για την ανάπτυξη του εμβρύου. Παρ' όλα αυτά η προσπάθεια του πλακούντα να προσαρμοστεί στο διαβητικό προφίλ της μητέρας μέσω ρύθμισης της προσληφθείσας γλυκόζης αλλά και αύξησης των αγγειακών αντιστάσεων μπορεί να οδηγήσουν σε περιορισμό της εμβρυικής ανάπτυξης μέσα σε μη παθολογικά πλαίσια. Αν όμως η διάρκεια ή η βαρύτητα του διαβητικού προφίλ (υπεργλυκαιμία, υπερινσουλιαιμία ή δυσλιπιδαιμία) υπερβαίνει την αντισταθμιστική ικανότητα του πλακούντα, τότε υπάρχουν σίγουρα επιδράσεις στην εμβρυική ανάπτυξη. Εμφάνιση διαβήτη σε μετέπειτα στάδια της κύησης όπως για παράδειγμα στο διαβήτη κύησης, θα οδηγήσει σε μεταβολικές αλλαγές σε μόρια που επιδρούν στην έκφραση γονιδίων (Radaelli et al, 2003).

1.3. Διαβήτης Κύησης

Ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης είναι μια παθολογική κατάσταση στην οποία μια γυναίκα χωρίς ιστορικό διαβήτη, αποκτά υψηλά επίπεδα γλυκόζης αίματος στην αρχή ή κατά τη διάρκεια της κύησης. Συγκεκριμένα αφορά σε :

- Γλυκόζη νηστείας: 5.1-6.9 mmol/l (92 -125 mg/dl)
- Γλυκόζη πλάσματος 1 ώρα μετά την λήψη 75g γλυκόζης ≥ 10.0 mmol/l (180 mg/dl)
- Γλυκόζη πλάσματος 2 ώρες μετά την λήψη 75g γλυκόζης: 8.5 – 11.0 mmol/l (153-199 mg/dl)

Χαρακτηρίζεται επίσης από μειωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Ο διαβήτης της κύησης είναι αναστρέψιμος και υποχωρεί μετά τον τοκετό, μπορεί όμως να προκαλέσει περιγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία μητέρας και νεογνού (American Diabetes Association,2014).

Η πρόληψη συνίσταται σε διατήρηση φυσιολογικού βάρους σώματος και άσκησης πριν την εγκυμοσύνη. Ο διαβήτης κύησης αντιμετωπίζεται με διαβητική δίαιτα, γυμναστική, ίσως και λήψη φαρμακευτικού σκευάσματος ινσουλίνης. Οι περισσότερες γυναίκες ρυθμίζουν τα επίπεδα σακχάρου αίματος μόνο με την δίαιτα και την άσκηση. Το 90% των πασχόντων μητέρων από διαβήτη κύησης θα θεραπευτεί από αυτή την παθολογία μετά το πέρας της εγκυμοσύνης αλλά φαίνεται πως υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για τις μητέρες να αναπτύξουν διαβήτη τύπου 2 (Donovan & McIntyre, 2010).

Είναι αρκετά δύσκολο να προσδιοριστεί ο πραγματικός επιπολασμός του διαβήτη κύησης. Ο επιπολασμός ποικίλει σε παγκόσμια κλίμακα καθώς οι προληπτικές ιατρικές εξετάσεις στις εγκύους δεν είναι ίδιες καθώς και τα διαγνωστικά κριτήρια παρουσιάζουν διαφορές. Για παράδειγμα υπάρχουν περισσότερα δεδομένα για τις χώρες του δυτικού κόσμου ενώ είναι διάσπαρτα τα στοιχεία από τις αναπτυσσόμενες χώρες. Από μια πρόσφατη μελέτη των Jiwani et al, (2012) έγινε προσπάθεια εκτίμησης του ποσοστού που πάσχουν από διαβήτη κύησης σε παγκόσμια κλίμακα ακόμη και σε αναπτυσσόμενες χώρες. Το ποσοστό εκτιμήθηκε περίπου λιγότερο από

5% σε χώρες όμως Πακιστάν, Βέλγιο, Δανία, Εσθονία, Ιρλανδία, Νότια Κορέα, Νότια Αφρική και Ηνωμένο Βασίλειο. Το ποσοστό βρέθηκε λιγότερο από 10% στην Ιταλία, Τουρκία, Βραζιλία, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και Αυστραλία και φτάνει έως το 20% στο Νεπάλ. Η πρόσφατη έκθεση από το Διεθνές συμβούλιο για το διαβήτη (International Diabetes Federation) έδειξε πως 16% των μητέρων που γέννησαν το έτος 2013 έπασχαν από υπεργλυκαιμία κατά τη διάρκεια της κύησης καθώς και πως το ποσοστό αυτό θα είναι αυξημένο στο μέλλον λόγω της αύξησης των παραγόντων κινδύνου όπως η παχυσαρκία και η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας (Diabetes Atlas International Diabetes Federation).

1.3.1. Συμπτώματα και διάγνωση του διαβήτη κύησης

Ο διαβήτης κύησης έχει επιπτώσεις στην μητέρα αλλά και στο έμβρυο. Οι εμβρυικές επιπλοκές περιλαμβάνουν την μακροσωμία, νεογνική υπογλυκαιμία, υπερλιπιδαιμία, υπασβαιστιαίμια, πολυκυτταραιμία, σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, πολυϋδράμνιο, περιγεννητική θνησιμότητα. Επίσης μπορεί να προκύψουν πρόωρος τοκετός (πριν τις 37 εβδομάδες κύησης), προεκλαμψία, νεογνό με χαμηλή γλυκόζη αίματος ή ίκτερο. Αναφορικά αναγράφεται πως έχοντας διαβήτη κύησης υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 στο μέλλον (Schmidt et al, 2001, Brody et al, 2003). Η μακροσωμία είναι το πιο συχνό εύρημα που βρίσκεται στο 20-30% των νεογνών, των οποίων οι μητέρες είχαν διαβήτη κύησης (Kjos, S. L., & Buchanan, T. A., 1999). Η νεογνική υπογλυκαιμία συνήθως φαίνεται λίγες ώρες μετά τον τοκετό και προκύπτει από την μητρική υπεργλυκαιμία που προκαλεί με την σειρά της υπερινσουλιναίμια.

Ο διαβήτης κύησης είναι μια συχνή παθολογία της εγκυμοσύνης και σε αυτό συντελούν παράγοντες κινδύνου της μητέρας όπως: Ηλικία μητέρας (>37 ετών), εθνικότητα, βάρος πριν την εγκυμοσύνη >80 kg ή BMI>28 kg/m², Οικογενειακό ιστορικό διαβήτη σε συγγενείς πρώτου βαθμού, προηγούμενη εγκυμοσύνη με μακροσωμία ή πολυϋδράμνιο, προηγούμενος ανεξήγητος θάνατος εμβρύου στο τρίτο τρίμηνο, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Karoor et al, 2007).

Ο διαβήτης κύησης δεν παρουσιάζει συνήθως κανένα σύμπτωμα για την έγκυο γυναίκα. Τις περισσότερες φορές διαγιγνώσκεται τυχαία στον έλεγχο επιπέδων γλυκόζης αίματος που είναι καθιερωμένο στην εγκυμοσύνη (8-12 εβδομάδες

κύησης). Συμπτώματα ίσως εμφανιστούν αν η υπεργλυκαιμία γίνει αρκετά σοβαρή και τέτοια είναι δίψα, συχνοουρία, ξηρότητα στόματος και κούραση (Brody et al, 2003). Τα συμπτώματα όμως αυτά είναι συχνά συνηθισμένα στην εγκυμοσύνη οπότε δεν αποτελούν ένδειξη πως υπάρχει κάποια παθολογία. Κατά κανόνα οι γυναίκες που πάσχουν αλλά βρίσκονται υπό τακτική ιατρική παρακολούθηση, έχουν φυσιολογική εγκυμοσύνη και γεννούν υγιή παιδιά.

Ο έλεγχος του διαβήτη κύησης περιλαμβάνει ένα τεστ ανοχής γλυκόζης (OGTT), που διαρκεί περίπου 2 ώρες. Αρχικά λαμβάνεται δείγμα αίματος το πρωί ενώ η έγκυος δεν έχει φάει ή πιεί το βράδυ πάρα μόνο νερό. Στη συνέχεια δίνεται ένα διάλυμα γλυκόζης (συνήθως 75g γλυκόζης σε νερό) και μετά από 2 ώρες λαμβάνεται ένα δεύτερο δείγμα αίματος, προκειμένου να ελέγξουμε τα επίπεδα γλυκόζης στο χρόνο αυτό. Συνήθως το OGTT γίνεται στις 24-28 εβδομάδες κύησης αλλά αν υπάρχει διαβήτης τότε γίνεται νωρίτερα (Vandorsten et al, 2013). Τα νεότερα διαγνωστικά κριτήρια τα οποία μάλιστα χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία σύμφωνα με τον ADA (American Diabetes Association) - 2014 αφορούν:

- Γλυκόζη νηστείας: 92 -125 mg/dl
- Γλυκόζη πλάσματος 1 ώρα μετά την λήψη 75g γλυκόζης \geq 180 mg/dl
- Γλυκόζη πλάσματος 2 ώρες μετά την λήψη 75g γλυκόζης: 153-199 mg/dl

Βέβαια τα κριτήρια διάγνωσης του διαβήτη κύησης όπως αναφέρεται και στην μελέτη των Fraser & Heller, (2007) διαφέρουν ανάμεσα στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Μελέτης Διαβήτη, Αμερικάνικο Οργανισμός Διαβήτη και αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Τωρινά κριτήρια διάγνωσης διαβήτη κύησης

WHO (Παγκόσμιο οργανισμός υγείας)	75 g γλυκόζης μετά από νηστεία και τιμές plasma glucose ≥ 7 mmol/L, glucose ≥ 7.8 mmol/L μετά από 2-h
EASD (Ευρωπαϊκός Οργανισμός Μελέτης Διαβήτη)	75 g γλυκόζης μετά από νηστεία και τιμές plasma glucose ≥ 6 mmol/L, glucose ≥ 9 mmol/L μετά από 2-h
ADA (Αμερικάνικος Οργανισμός Διαβήτη)	75 g γλυκόζης μετά από νηστεία και τιμές plasma glucose ≥ 5.3 mmol/L, glucose ≥ 10 mmol/L μετά από 1-h, glucose ≥ 8.6 mmol/L μετά από 2-h, glucose ≥ 7.7 mmol/L μετά από 3-h

Πίνακας 1: Fraser & Heller, 2007

1.3.2. Παθοφυσιολογία διαβήτη κύησης

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη είναι μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από αντίσταση στην ινσουλίνη με περίπου 50% μείωση στην κάθαρση της γλυκόζης από την ινσουλίνη αλλά και από 250% αύξηση στην παραγωγή ινσουλίνης έτσι ώστε να διατηρηθεί η μητρική νορμογλυκαιμία (περίπου 120 mg/dl) (Rieck & Kaestner, 2010). Αυτή η κατάσταση υπερινσουλινισμού επάγεται λόγω αντισταθμιστικής υπερπλασίας και υπερτροφίας των β-κυττάρων του Langerhans (Rieck & Kaestner, 2010). Πολλά πειραματικά μοντέλα σε τρωκτικά έχουν δείξει πως η αποτυχία προσαρμογής των β-κυττάρων στην κύηση οδηγούν σε υπεργλυκαιμία και ίσως διαβήτη. Σύμφωνα με μελέτες λοιπόν (DeSisto et al, 2014, Karnik et al., 2007, Zhang

et al., 2010) ο διαβήτης κύησης ίσως να προκύπτει από ανισορροπία μεταξύ αντίστασης στην ινσουλίνη και έκκρισης ινσουλίνης. Η διαταραχή έκκρισης ινσουλίνης φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αποτυχίας των β-παγκρεατικών κυττάρων να συμβαδίσουν με την αυξανόμενη ινσουλινοαντίσταση κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης.

Οι έγκυες γυναίκες με παχυσαρκία ή διαβήτη κύησης έχουν ακόμη μεγαλύτερη αντίσταση στην ινσουλίνη συγκριτικά με τις φυσιολογικές γυναίκες. Η αντίσταση στην ινσουλίνη ξεκινά συνήθως στο δεύτερο τρίμηνο εγκυμοσύνης και υπάρχει μέχρι το τέλος της. Το φαινόμενο αυτό μάλλον ευνοεί την παροχή γλυκόζης στο έμβρυο αφού η μητέρα χρησιμοποιεί τελικά λιγότερη γλυκόζη. Έτσι ο ενεργειακός μεταβολισμός της μητέρας αλλάζει και ενώ χρησιμοποιούσε υδατάνθρακες ως πρώτη και κύρια πηγή ενέργειας πριν την εγκυμοσύνη, πλέον ούσα έγκυος χρησιμοποιεί πρωτίστως τα λιπίδια (Buchanan, T. A., 1995) in McCabe, C. F., & Perng, W., 2017). Υπάρχει επίσης ένα υποσύνολο γυναικών με διαβήτη κύησης με αυτοαντισώματα έναντι των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Η παρουσία τέτοιων αυτοαντισωμάτων σε τέτοιες γυναίκες ποικίλλει από 1,6-38%. Βέβαια έχουν βρεθεί κι άλλου τύπου αυτοαντισώματα στα κύτταρα αυτά όπως κατά την ινσουλίνης και κατά της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμικού οξέος. Αυτές οι γυναίκες διατρέχουν επιπλέον κίνδυνο καθώς μπορεί να αναπτύξουν αυτοάνοσο τύπο διαβήτη αργότερα μετά την εγκυμοσύνη. Υπολογίζεται τέλος πως 5% περίπου των γυναικών με διαβήτη κύησης δεν μπορεί να αντιμετωπίσει σε κυτταρικό επίπεδο την αντίσταση στην ινσουλίνη λόγω μετάλλαξης του ενζύμου γλυκοκινάση (Mauricio et al, 1996, Setji et al, 2005).

Η πλακουντιακή έκκριση ορμονών όπως προγεστερόνη, κορτιζόλη, λακτογόνο, προλακτίνη, αυξητική ορμόνη παίζει σημαντικότατο ρόλο στην μετάβαση στην κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη που χαρακτηρίζει την εγκυμοσύνη (Di Cianni et al, 2003) και επίσης στο διαβήτη κύησης η έκκριση αυτών των ορμονών είναι μεγαλύτερη (Setji et al, 2005).

Οι απόγονοι γυναικών με παχυσαρκία και διαβήτη κύησης είναι πολύ πιθανό να έχουν αυξημένο ποσοστό λίπους και να αποκτήσουν αντίσταση στην ινσουλίνη και να «μεταδώσουν» τις μεταβολικές αυτές διαταραχές στους απογόνους τους (Jones, C., 2001). Η βελτίωση του μεταβολικού περιβάλλοντος μιας παχύσαρκης μητέρας μπορεί να σπάσει αυτή την οδό μεταβίβασης μεταβολικών διαταραχών από γενιά σε γενιά.

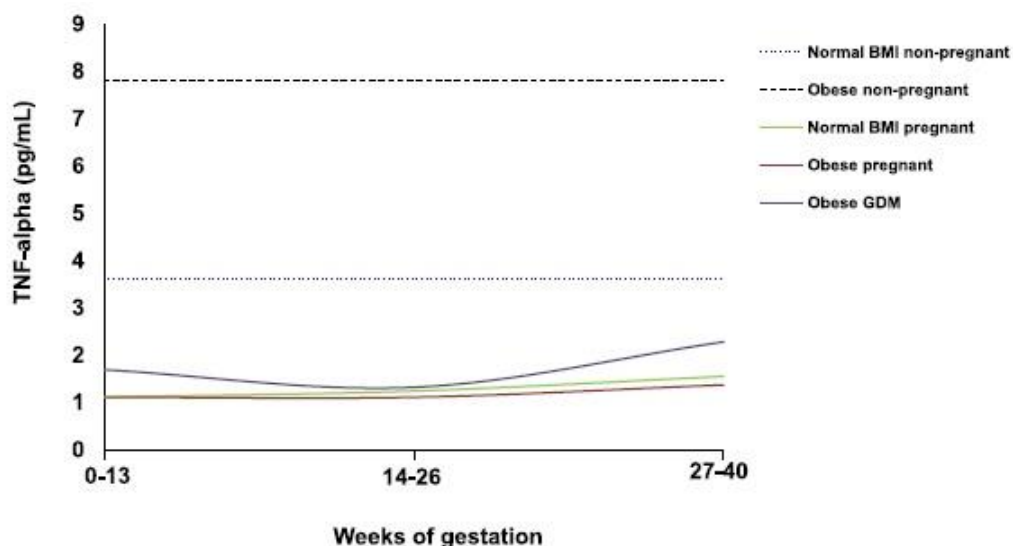


Figure 3: Διάγραμμα απεικόνισης τιμών του TNF- α κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, Pantham et al, 2015.

Σύμφωνα με τωρινά δεδομένα, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τον ρόλο της φλεγμονής ως προοίμιο των μεταβολικών διαταραχών, καθώς η φλεγμονή κυριαρχεί στο ενδομήτριο περιβάλλον μιας παχύσαρκης εγκύου. Όταν δεν υπάρχει εγκυμοσύνη, η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με ήπια φλεγμονή. Θα ήταν βάσιμο να υποστηρίξουμε πως η παχυσαρκία επάγει μεταβολικά την φλεγμονή. Η φλεγμονή αυτή διεγείρεται από μεταβολίτες και συστατικά που οδηγούν τελικά σε αντίσταση στην ινσουλίνη (Gregor & Hotamisligil, 2011). Αλλωστε έχει παρατηρηθεί πλακουντιακή φλεγμονή σε εγκυμοσύνες με παχυσαρκία και διαβήτη κύησης (Kleiblova et al, 2010) και ίσως παίζει κεντρικό ρόλο στην διαμόρφωση του εμβρυικού περιβάλλοντος. Η μητρική παχυσαρκία και ο διαβήτης κύησης έχουν συσχετιστεί με αλλαγές στην πλακουντιακή μεταφορά συστατικών αλλά και λειτουργία του (Jansson et al, 2013). Οι αλλαγές αυτές την πλακουντιακή λειτουργία ίσως οφείλονται σε αλλαγές στην φλεγμονή που δεν γίνεται το ίδιο οργανωμένο και συντονισμένα στη μητέρα και έτσι να εξηγείται η νοσηρότητα αυτών των παθολογικών κύσεων (Jones et al, 2009).

Οι κυτοκίνες που παράγονται από τον πλακούντα ίσως είναι υπεύθυνες για την αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος ως αναφορά στα μόρια φλεγμονής, που παρατηρούνται στην μητρική κυκλοφορία στον διαβήτη κύησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο TNF- α όπου παράγεται από τις πλακουντιακές κοτυληδόνες και το 94% καταλήγει στην μητρική πλευρά και μόνο το 6% στην εμβρυική πλευρά.

Αύξηση του κυκλοφορούντος TNF- α ίσως σχετίζεται με την ανάπτυξη του διαβήτη κύησης (Kirwan et al, 2002) αλλά και αυξημένα επίπεδα IL-6 στο μητρικό πλάσμα και

ορό έχουν επιβεβαιωθεί πως υπάρχουν στην παχυσαρκία αλλά και στον διαβήτη κύησης όταν συνυπάρχει ή όχι παχυσαρκία (Ategbro et al, 2006).

1.3.3.Θεραπεία

Είναι αρκετά αμφιλεγόμενο μέχρι και σήμερα αν οι γυναίκες με διαβήτη κύησης χρειάζονται να λάβουν κάποια θεραπεία, φαρμακευτική ή μη έτσι ώστε να προλάβουν τις επιπλοκές της νόσου. Το κατά πόσο χρειάζεται να λάβουν θεραπεία εξαρτάται κυρίως από το στάδιο της νόσου και κυρίως από την σοβαρότητα της υπεργλυκαιμίας. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις είναι κυρίως διατροφικές αν η γυναίκα είναι παχύσαρκη και αν δεν είναι αποτελεσματική τότε γίνεται και φαρμακευτική παρέμβαση. Η Αμερικανική εταιρεία Καρδιολογίας συμπεριλαμβάνει πλέον τον διαβήτη κύησης ως παράγοντα ανάπτυξης καρδιαγγειακών παθήσεων για τις γυναίκες. Ο διαβήτης κύησης ανεξάρτητα από το μητρικό BMI, δεν γνωρίζουμε αν σχετίζεται με την ανάπτυξη μεταβολικών νοσημάτων και παχυσαρκίας στον απόγονο, ή αν ο απόγονος μπορεί να έχει αυτή την παθολογία μόνο λόγω του μητρικού BMI (Kim et al, 2009). Σε μια μεγάλη μελέτη επίσης δεν παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στο αίμα της μητέρας και του BMI των απογόνων στα 2 έτη και στα 5-7 έτη (Thaware et al,2015).



Στην κλινική πράξη οι διατροφικά ιατρικές θεραπείες που περιλαμβάνουν αλλαγές στην διαίτα, προγραμματισμός γευμάτων, σωματική άσκηση και αλλαγή τρόπου ζωής θεωρούνται ακρογωνιαίος λίθος για την θεραπεία του διαβήτη κύησης (Serlin & Lash, 2009). Παρόλα αυτά αν επιμένει η υπεργλυκαιμία της μητέρας, τότε η χορήγηση ινσουλίνης είναι η πρώτη θεραπεία που προτείνει ο γιατρός. Ενώ η θεραπεία με ινσουλίνη θεωρείται συνηθισμένη θεραπεία για τον διαβήτη κύησης, έχει και αρκετά μειονεκτήματα όπως υπογλυκαιμία, αύξηση βάρους, ανάγκη για συνεχείς ενέσεις και κόστος (Alwan et al, 2009 in Kitwitee et al,2015). Από την άλλη, η χρήση αποτελεσματικών και ασφαλών υπογλυκαιμικών φαρμάκων από το στόματος (για παράδειγμα Σουλφονουλιδίνες, Μεγλιτινίδια, Θειαζολιδινοδιόνες, αναστολείς α-γλυκοζιδάσης), που μειώνουν την ανάγκη για την φυσική παρουσία του γιατρού κατά την θεραπεία, και προσφέρουν ίσως πλεονεκτήματα έναντι της ινσουλίνης.

Μια εκ του στόματος θεραπεία είναι η μετφορμίνη, που αναστέλλει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και βελτιώνει την περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη. Είναι η συχνότερη φαρμακευτική θεραπεία μετά την ινσουλίνη για τον διαβήτη κύησης. Μάλιστα σε μια μεγάλη μελέτη έχει φανεί πως η μετφορμίνη είναι προτιμότερη από την ινσουλίνη σαν θεραπεία για τους ασθενείς γιατί η μετφορμίνη, σε αντίθεση με την ινσουλίνη, δεν συσχετίζεται με μητρικές και εμβρυικές επιπλοκές. Παρ' όλα αυτά φάνηκε να υπάρχει αυξημένο ποσοστό πρόωρου τοκετού (<37 εβδομάδες κύησης) μετά την χορήγηση μετφορμίνης, το ίδιο φαινόμενο που παρατηρήθηκε και με την ινσουλίνη βέβαια (Rowan et al, 2008). Από άλλη μελέτη φάνηκε πως δεν υπήρξε καμία επίδραση της θεραπείας του διαβήτη κύησης την πρόληψη εμφάνισης διαβήτη, μεταβολικού συνδρόμου, ποσοστό λίπους στη μητέρα 5-10 έτη μετά την γέννα (Casey B., 2015). Σε μια μεγάλη κλινική δοκιμή θεραπείας του διαβήτη κύησης με ειδική διατροφή, παρακολούθηση της γλυκόζης αίματος και ινσουλινοθεραπείας φάνηκε να μειώθηκαν οι περιγεννητικές από το 4% στο 1%. Επομένως προτείνουν πως η θεραπεία είναι απαραίτητη λόγω αυτής της διαφοράς αλλά και επειδή δεν αυξάνονται τα ποσοστά καισαρικής (Crowther et al, 2005).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Μελέτη της έκφρασης του υποδοχέα LRP5 σε πλακούντα εγκύων γυναικών με διαβήτη κύησης

Πληθυσμός μελέτης

Η μελέτη μας περιλαμβάνει μια ομάδα 22 εγκύων γυναικών που πάσχουν από διαβήτη κύησης και τα νεογνά τους, καθώς και μια ομάδα ελέγχου 34 γυναικών που δεν έπασχαν από διαβήτη κύησης και τα νεογνά τους. Η διαλογή έγινε από την γυναικολογική πτέρυγα στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών» το χρονικό διάστημα Μαρτίου (2010) έως τον Δεκέμβριο (2011) καθώς και τα έτη 2016 έως 2018. Όλα τα συμμετέχοντα μέλη ήταν ελληνικής καταγωγής. Η διάγνωση του διαβήτη κύησης βασίστηκε στο πρότυπο τεστ λήψης 75g από του στόματος γλυκόζης και μέτρησης σε διαστήματα εντός 3 ωρών, στις 24 έως 28 εβδομάδες κύησης σύμφωνα με τα πρότυπα κριτήρια.

Οι γυναίκες κατά την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο έκαναν βιοχημικές εξετάσεις καθώς και καμπύλη γλυκόζης, εάν οι γλυκόζη πλάσματος ήταν υψηλή. Οι φυσιολογικές τιμές που χρησιμοποιήσαμε προήλθαν από το ADA (American Diabetes Association) 2010. Τυπικά πρέπει 2 τουλάχιστον μετρήσεις να υπερβαίνουν τις φυσιολογικές για να θεωρηθεί πως υπάρχει διαβήτης. Οι φυσιολογικές τιμές καθορίζονται με βάση την δόση των 75 g γλυκόζης.

Γλυκόζη	Νηστείας	60' min	120' min	180' min
Φυσιολογικές τιμές γλυκόζης πλάσματος	95 mg/dl / 5,3 mmol/L	180mg/dl / 10 mmol/L	155 mg/dl / 8.6 mmol/L	140mg/dl / 7.8 mmol/L

Σύμφωνα με τον ADA 2010, παθολογική θεωρείται η γλυκόζη νηστείας > 126 mg/dl και η μέτρηση γλυκόζης σε τυχαία στιγμή με τιμή >200 mg/dl.

Η ομάδα ελέγχου απαρτίστηκε από γυναίκες τεστ ανοχής στη γλυκόζη εντός φυσιολογικών ορίων. Η μελέτη αυτή εγκρίθηκε από την Institutional Review Board of the University General Hospital Attikon. Έγγραφο συναίνεσης για συμμετοχή στην μελέτη συμπληρώθηκε από όλες τις γυναίκες απ' όπου συλλέγαμε δείγματα.

Τα δημογραφικά και τα κλινικά χαρακτηριστικά των γυναικών και των νεογνών συλλέχθηκαν με βάση τους ιατρικούς φακέλους. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από την μέτρηση του μήκους μηριαίου οστού από τους ιατρικούς

φακέλους, παράμετρος που μετράται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Όλες οι μητέρες γέννησαν με καισαρική τομή. Τα πρόωρα νεογνά στις 37 ή λιγότερες εβδομάδες κύησης δεν συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη αυτή, καθώς και αυτά με νεογνική ασφυξία, σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, κλινικές ενδείξεις υποξικής-ισχαιμικής εγκεφαλοπάθειας ή άλλη συγγενή διαταραχή.

Φλεβικό αίμα από τον ομφάλιο λώρο συλλέχθηκε αμέσως μετά τον τοκετό καθώς και ορός στον οποίο έγινε μέτρηση των συστατικών: ασβέστιο (Ca), φώσφορος (P), μαγνήσιο (Mg), αλκαλική φωσφατάση (ALP), γλυκόζη, αλβουμίνη, ουρία, κρεατινίνη. Επίσης λήφθηκε δείγμα αίματος από τα νεογνά την δεύτερη μέρα μετά τον τοκετό, προκειμένου να μετρηθούν ασβέστιο, φώσφορος, μαγνήσιο, αλβουμίνη και αλκαλική φωσφατάση στον ορό.

Μετά τον τοκετό τμήματα πλακουντιακού ιστού συλλέχθηκαν σε απόσταση 5 εκατοστών από τον ομφάλιο λώρο (κύβος πλευράς 2,5 εκατοστών). Στη συνέχεια έγινε τομή του ιστού σε 3 περιοχές (μητρική επιφάνεια, εμβρυική επιφάνεια, χόριο) και αποθηκεύτηκε σε υπερκατάψυξη στους -80°C, μέχρι να γίνει απομόνωση πρωτεϊνών για χρήση σε ανάλυση western blot (WB). Στα πειράματα που διεξήχθησαν στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μόνο το μέρος του ιστού από την μητρική επιφάνεια. Ο υπόλοιπος πλακουντιακός ιστός μεταφέρθηκε σε διάλειμμα φορμαλίνης 10% για περαιτέρω επεξεργασία προκειμένου να εφαρμοστούν τεχνικές ανοσοϊστοχημείας.

Βιοχημική ανάλυση

Η μέτρηση συγκεντρώσεων ορού των Ca, P, Mg, ALP, γλυκόζης, αλβουμίνης, ουρίας και κρεατινίνης στον ορό φλεβικού αίματος ομφάλιου λώρου καθώς και για το νεογνό την δεύτερη μέρα ζωής, έγινε σύμφωνα με τις πρότυπες μεθόδους. Τα επίπεδα ασβεστίου έχουν προσαρμοστεί σύμφωνα με τις τιμές της αλβουμίνης σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση: Προσαρμοσμένο Ca (mmol/l) = Ολικό Ca (mmol/l) + 0.02 (40 - ALB (g/L)).

2.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από πλακούντα γυναικών με διαβήτη κύησης και από γυναίκες χωρίς διαβήτη κύησης

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε χωρίστηκε σε κάποια βήματα. Αρχικά έγινε απομόνωση ολικού κλάσματος πρωτεϊνών από δείγμα πλακούντα σύμφωνα με το πρωτόκολλο από το Journal of the National Cancer Institute (87), N012, (1995) με τροποποιήσεις και στη συνέχεια έγινε μέτρηση της ποσότητας πρωτεΐνης σε $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Έπειτα έγινε ανάλυση των πρωτεϊνών με την τεχνική Western Blot Analysis όπου με χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έγινε μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης LRP5 στον πλακούντα των γυναικών. Τέλος έγινε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων που συλλέξαμε και ανάλυση των εικόνων από τα πειράματα με το πρόγραμμα Image J.

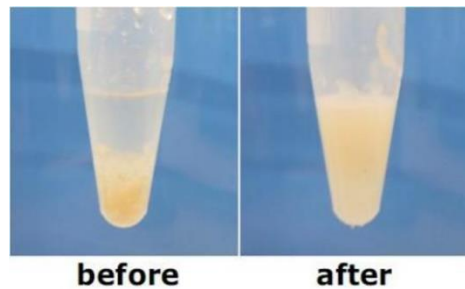
Η διαδικασία απομόνωσης (extraction) ολικής πρωτεΐνης από τον πλακούντα έγινε με χρήση διαλύματος extraction (Custom Lysis extraction Buffer) που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο:

- Χρησιμοποιήθηκε περίπου 0,2-0,4g ιστός
- Φυγοκέντρωση σε διάλυμα PBS 1x (Phosphate buffered saline που περιέχει NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , απεσταγμένο νερό) στα 500g .
- Προστέθηκε διάλυμα Custom Lysis στο falcon για το οποίο ανά δείγμα προστέθηκε:

Υλικά

- 100 μL *Tris-HCl*¹
 - 100 μL *MgCl₂*
 - 100 μL *Glycerol*
 - 2.5 μL *β -μερκαπτοαιθανόλη*
 - 0,005 g *CHAPS*
 - 62.5 μL *protease inhibitors*
 - 62.5 μL *phosphatase inhibitors*
- 700 μL *dH₂O*

- Ομογενοποίηση σε μηχανήμα και επώαση του δείγματος σε πάγο.



¹ **MgCl₂, Glycerol** : Αποτρέπουν την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών.

Tris-HCl: Διάλυμα για ρύθμιση του Ph.

β -μερκαπτοαιθανόλη: Αναγωγικό μέσο που αποτρέπει την οξείδωση των πρωτεϊνών.

CHAPS: Υλικό που αποτρέπει την μετουσίωση των πρωτεϊνών κατά την απομόνωσή τους και χρησιμεύει ιδιαίτερα για μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι συχνά ελάχιστα διαλυτές ή αδιάλυτες σε υδατικό διάλυμα λόγω της φυσικής τους υδροφοβικότητας.

protease & phosphatase inhibitors: Αναστέλλουν τις ενδογενείς πρωτεάσες και φωσφατάσες στα κύτταρα, προστατεύοντας τις πρωτεΐνες που θέλουμε να ανιχνεύσουμε στο πείραμα.

- Φυγοκέντρηση δειγμάτων για 20 min στους 4 °C
- Αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος που περιέχει το ολικό κλάσμα πρωτεϊνών. Αποθήκευση του διαλύματος στους -80°C για οποιαδήποτε χρήση.

2.2. Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης

Για την μέτρηση ολικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήσαμε BCA protein assay kit με το οποίο προκύπτει μια πρότυπη καμπύλη με βάση την αλβουμίνη, σύμφωνα με την οποία γίνεται μέτρηση τιμών για τα δείγματα μας. Το πρωτόκολλο ήταν το εξής:

Για την BCA απαιτούνται 3 διαλύματα, οι όγκοι των οποίων υπολογίζονται ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θέλουμε να μετρήσουμε.

Παρακάτω δίνονται οι ποσότητες για μέτρηση 25 δειγμάτων:

- Reconstitution Buffer : 50μl working reconstitution Buffer + 50μl dH2O (Αραίωση 1:1).
- Compatibility Reagent Solution (4μl/δείγμα): Ο όγκος που χρησιμοποιούμε είναι 100μl Solution για κάθε 25 δείγματα.
- BCA Working Reagent: Υπολογίζουμε τον όγκο αυτού του διαλύματος με βάση τον αριθμό των δειγμάτων που θα μετρήσουμε και συγκεκριμένα με τον τύπο:

$$2 * (\text{αριθμός δ/των standard} + \text{αριθμός δειγμάτων}) * 260 = \dots \dots \dots \mu\text{l}$$

Για αυτό το διάλυμα προστέθηκαν τα Reagent A, Reagent B με αναλογία 50:1 αντίστοιχα. Η πρότυπη καμπύλη έγινε ως εξής:

Vial	Sample Buffer volume (μl)	BSA source and volume	Concentration (μg/ml)
A	0	200 Αλβουμίνης	2,000
B	66	200 Αλβουμίνης	1,500
C	100	100 of vial A	1,000
D	100	100 of vial B	750
E	100	100 of vial C	500
F	100	100 of vial E	250
G	100	100 of vial F	125



Η μέτρηση γίνεται με οπτική απορρόφηση (φωτομέτρηση) στα 590 nm. Αφού φτιάξουμε τα διαλύματα λοιπόν :

- I. Φορτώθηκαν 9μl/well standards
- II. Φορτώθηκαν 4μl/well Compatibility Reagent
- III. Ανακίνηση της πλάκας Elisa και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C.
- IV. Προσθήκη 260μl/well BCA working και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C
- V. Παραμονή της πλάκας elisa σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
- VI. Μέτρηση πρωτεΐνης στον υπολογιστή σύμφωνα με την οπτική απορρόφηση και κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

2.3. Western Blot Analysis

Η Western Blot είναι μια ποιοτική και δευτερευόντως ποσοτική μέθοδος ανάλυσης πρωτεϊνών. Με την μέθοδο αυτή μπορούμε να ανιχνεύσουμε πολύ ειδικά μια πρωτεΐνη μέσα από ένα μεγάλο μίγμα πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα από έναν ιστό. Η τεχνική για να επιτύχει αυτά τα αποτελέσματα χρησιμοποιεί 3 κύρια βήματα: (1) Διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό βάρος, (2) μεταφορά σε στερεό μέσο (συνήτοτερα μια μεμβράνη), και (3) σήμανση της πρωτεΐνης με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα για να γίνει ορατή. Συνήθως η εμφάνιση της πρωτεΐνης γίνεται σε φωτογραφικό φιλμ. Βασιζόμενοι στο ότι τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε είναι μονοκλωνικά, δεσμεύονται μόνο στην επιθυμητή πρωτεΐνη και έτσι μόνο μια ζώνη θα απεικονίζεται στο φιλμ. Έτσι εξασφαλίζεται η ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου. Το μέγεθος της ζώνης αντιστοιχεί στην ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει στο προς ανάλυση δείγμα. Οι πρωτεΐνες που θέλαμε να μετρήσουμε στην

μελέτη αυτή είναι οι LRP5 (200 kDa) και η ακτίνη (40 kDa) ως εσωτερικός μάρτυρας.

1^η ημέρα

- Χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση 1x Running Buffer (100ml TGS + 900 ml dH₂O)
- Χρησιμοποιήθηκε gel ακρυλαμίδης (8%)
Ο όγκος που φορτώνουμε/well είναι
50μl : 12,5μl Laemmli Buffer 4x + β-μερκαπτοαιθανόλη
37,5μl πρωτεΐνη ± Lysis Buffer (1x dissociation buffer)
- Θερμαίνουμε την πρωτεΐνη σε heatblock στους 95°C
- Ηλεκτροφόρηση αρχικά στα 90V για 15min και μετά στα 120V μέχρι συνολικά τις 2h
- Χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη διάλυμα Transfer Buffer (100ml TGS + 700ml dH₂O + 200ml μεθανόλη)
- Transfer για 100V για 1h σε φελιζόλ με πάγο
- Χρωστική Ponceau για 5min
- Blocking μεμβράνης (σε γάλα + PBST) και επώαση για 1h υπό ανακίνηση
- Επώαση με το 1^ο αντίσωμα στους 4°C (1:1000 Αντίσωμα + 5% Γάλα σε PBST)

2η ημέρα

- Επώαση με το 2^ο αντίσωμα για 1h (1:2000 2^ο Αντίσωμα+ 5% γάλα σε PBST)
- Επώαση με ECL
- Εμφάνιση σε φιλμ
- Αποθήκευση μεμβράνης σε PBS στους 4°C

Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα (φιλμ) της μεθόδου Western Blot προκειμένου να εκτιμηθούν ποσοτικά, μετρήθηκαν με χρήση του προγράμματος ImageJ 1.51k απ' όπου εκτιμήθηκε η ένταση των ζωνών. Τέλος τα αριθμητικά αποτελέσματα προστέθηκαν στο στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics V24.0, ελέγχοντας αν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά μέσω των όρων (t-test ανεξαρτήτων δειγμάτων) αλλά και διασπορών ανάμεσα στις 2 ομάδες γυναικών που εξετάσαμε. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές με $p < 0,05$. Ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών της μελέτης εκτιμήθηκαν με τον συντελεστή Pearson ο οποίος είναι ευαίσθητος μόνο σε μια γραμμική σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών (που μπορεί να υπάρχει ακόμη και αν η μία είναι μια μη γραμμική συνάρτηση της άλλης). Και πάλι στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις με $p - \text{value} < 0,05$.

Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά την μελέτη της έκφρασης του μορίου LRP5 στον πλακούντα γυναικών με διαβήτη κύησης και στον πλακούντα γυναικών χωρίς διαβήτη κύησης. Η έκφραση του LRP5 εκτιμήθηκε με την μέθοδο Western Blot. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν κλινικά και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των νεογνών και των μητέρων με βάση τους ιατρικούς φακέλους καθώς και βιοχημικές παράμετροι.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΗΘΥΜΟΥ

Το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από 34 γυναίκες χωρίς διαβήτη κύησης (αναφέρονται και ως μάρτυρες) και 22 γυναίκες με διαβήτη κύησης (αναφέρονται και ως ασθενείς). Η σύγκριση των μέσων όρων των δύο πληθυσμών μας έγινε με t-test ανεξάρτητων δειγμάτων. Αν τα δύο δείγματα είναι μεγαλύτερα από 30 τότε η εφαρμογή της δοκιμασίας νομιμοποιείται άμεσα ενώ αν τα δείγματα είναι μικρά τότε πρέπει να τεκμηριωθεί ο λόγος για τον οποίον οι μεταβλητές ακολουθούν την κανονική κατανομή είτε με ποιοτική ανάλυση των παραγόντων που συμβάλουν στην μεταβλητότητα των τιμών τους είτε με γραφικό τρόπο χρησιμοποιώντας το ιστόγραμμα, το διάγραμμα q-q. Επιπλέον, η δοκιμασία αυτή απαιτεί μία σχετική ομοιότητα των διακυμάνσεων των δύο πληθυσμών. Επειδή λοιπόν το δείγμα της μελέτης είναι μικρό πρέπει να αξιολογηθεί αν οι μετρήσεις μας ακολουθούν κανονική κατανομή είτε πρόκειται για υγιείς είτε πρόκειται για ασθενείς. Γι' αυτό το σκοπό έγινε χρήση του Kolmogorov-Smirnov test που έδειξε πως και οι δύο πληθυσμοί (υγιείς και ασθενείς) ακολουθούν κανονική κατανομή με $p\text{-value} > 0,05$, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

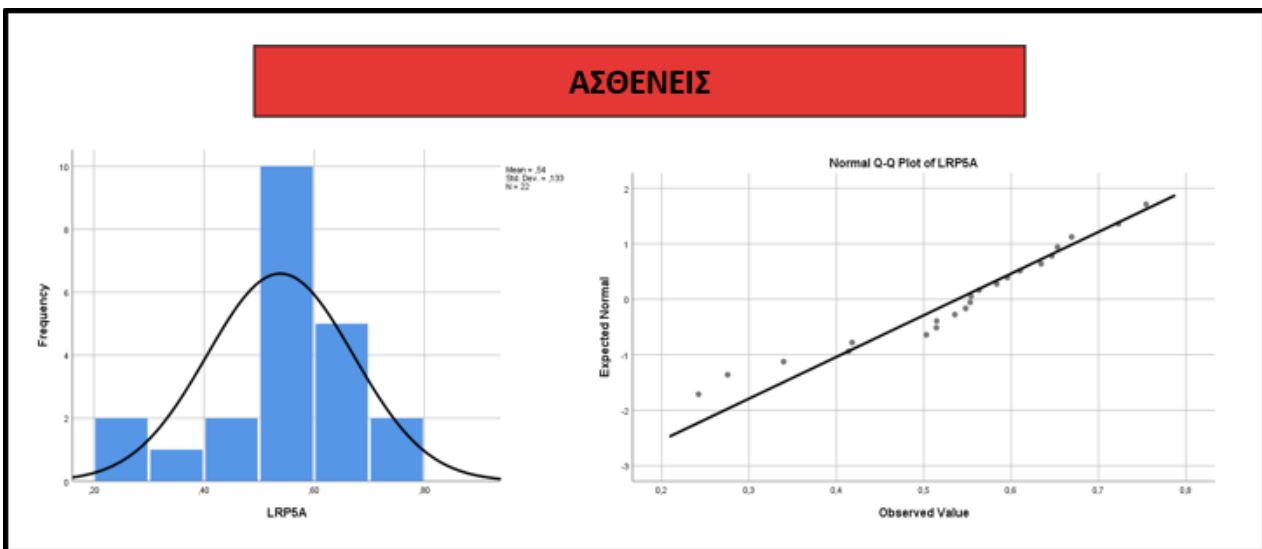
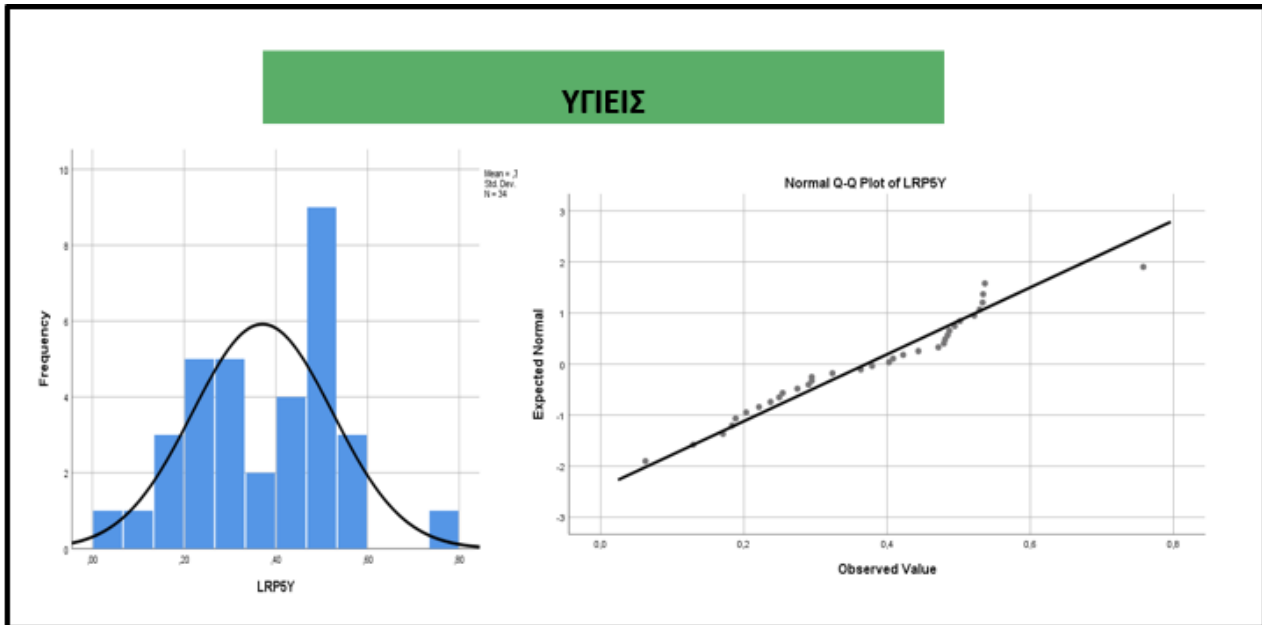
Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LRP5Y	,128	34	,175	,960	34	,246
LRP5A	,168	22	,110	,945	22	,250

a. Lilliefors Significance Correction

Πίνακας 1: Έλεγχος κανονικότητας πληθυσμών

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα Q-Q καθώς και ιστογράμματα όπου φαίνεται σχηματικά η κανονικότητα των πληθυσμών μας.



ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Έγινε συλλογή δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των γυναικών και των νεογνών με βάση τους ιατρικούς φακέλους. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από την μέτρηση του μήκους μηριαίου οστού από τους ιατρικούς φακέλους, μια παράμετρος που μετράται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Μερικά από τα χαρακτηριστικά αυτά εντάχθηκαν στην παρούσα μελέτη προκειμένου να εξεταστεί πιθανή συσχέτιση τους με τα αποτελέσματα της Western – Blot. Τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες όπου αναφέρονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση για καθένα. Επίσης έγινε t-test για ανεξάρτητα δείγματα ανάμεσα στην ομάδα των μαρτύρων και των ασθενών με το σχετικό p-value (Πίνακες 2-4).

Ο έλεγχος των μέσων όρων έδειξε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των μητέρων ανάμεσα στους πληθυσμούς μαρτύρων και ασθενών (Πίνακας 2). Επίσης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα χαρακτηριστικά των νεογνών στους δύο πληθυσμούς αντίστοιχα (Πίνακας 3), με εξαίρεση την βιοχημική παράμετρο γλυκόζη ομφάλιου λώρου όπου βρέθηκε αυξημένη ($p < 0.05$) στην ομάδα των ασθενών (Πίνακας 4).

ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΗΤΕΡΑΣ				
	Μονάδα μέτρησης	Μάρτυρες (N=34)	Ασθενείς (N=22)	p-value
Ηλικία	έτη	31 ± 5,9	33,84 ± 5,88	NS
Εβδομάδες κύησης	εβδομάδες	38	38	NS
Βάρος πριν τον τοκετό	kg	66,91 ± 10,97	73,39 ± 18,42	NS
Βάρος μετά τον τοκετό	kg	83,89 ± 12,46	85,61 ± 19,11	NS
ΒΜΙ πριν τον τοκετό	kg/m ²	24,72 ± 4,13	27,38 ± 5,63	NS
ΒΜΙ μετά τον τοκετό	kg/m ²	31,26 ± 5,08	32,27 ± 5,75	NS

Πίνακας 2: Έλεγχος μέσω τιμών παραμέτρων μητέρων

ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΝΕΟΓΝΟΥ				
	Μονάδα μέτρησης	Μάρτυρες	Ασθενείς	p-value
Βάρος νεογνού	gr	3153.485 ± 403.93	3198.2 ± 401.61	NS
Μήκος νεογνού	cm	49.9 ± 2.48	49.08 ± 4.76	NS
Μήκος μηριαίου οστού	mm	39.27 ± 2.24	39.24 ± 2.75	NS
ΒΜΙ νεογνού	kg/m ²	12.35 ± 1.1	13.6 ± 3.5	NS

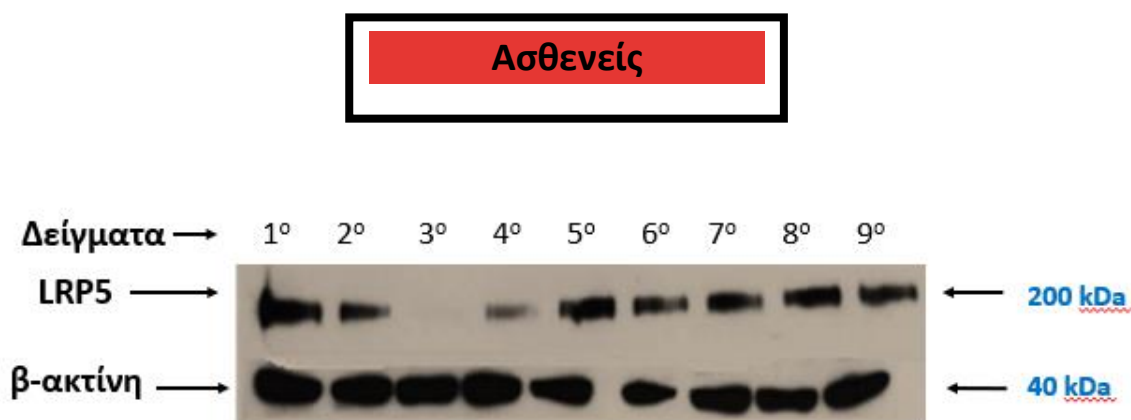
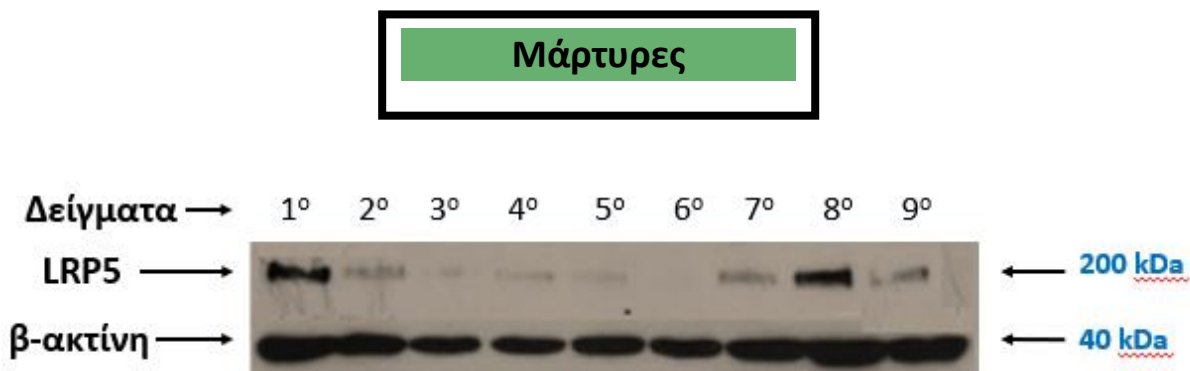
Πίνακας 3: Έλεγχος μέσω τιμών παραμέτρων νεογνών

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΝΕΟΓΝΟΥ				
Γλυκόζη ομφάλιου λώρου	mg / dL	58,42 ± 10,75	66,98 ± 20,65	<0,05*

Πίνακας 4: Έλεγχος μέσω των τιμών παραμέτρων νεογνών

Western – Blot

Η ανάλυση Western – Blot δείχνει ποιοτικά την έκφραση της μετρούμενης πρωτεΐνης LRP5, η οποία στη συνέχεια εκτιμήθηκε ποσοτικά με χρήση του προγράμματος Image J. Στις παρακάτω εικόνες μπορούμε να δούμε την έκφραση των πρωτεϊνών από τα φιλμ της μεθόδου Western – Blot.

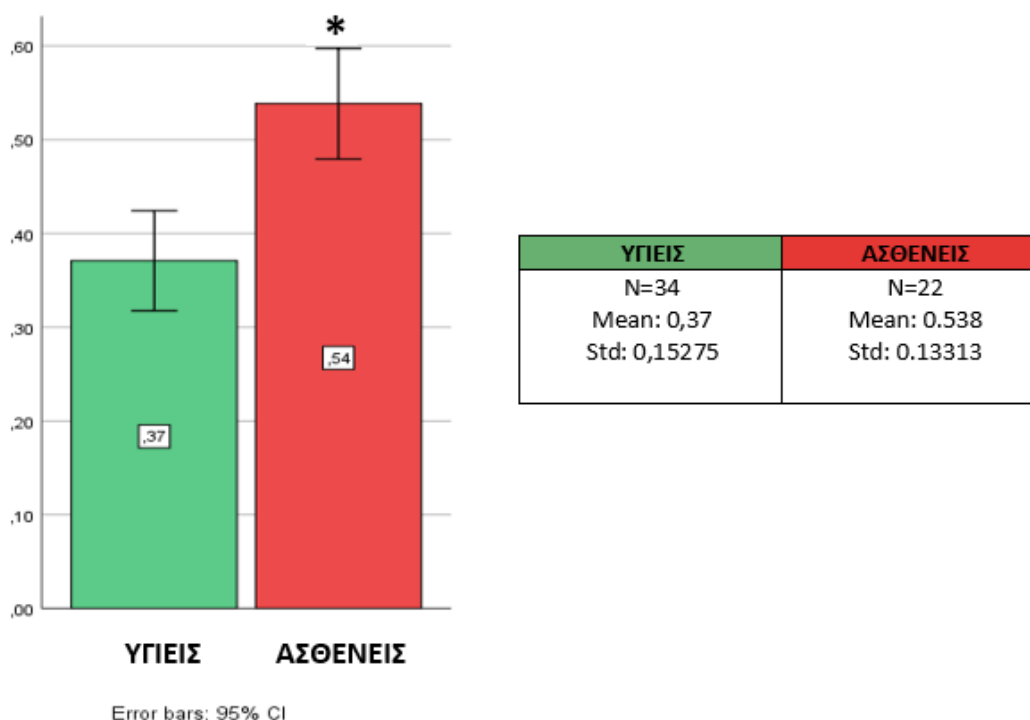


Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των πρωτεϊνών LRP5, b-actin μετρήθηκε στο Image- J. Έγινε έλεγχος μέσων τιμών (t-test) ανεξάρτητων δειγμάτων για τις μετρήσεις του μορίου LRP5 ανάμεσα ανάμεσα στην ομάδα των υγιών γυναικών και στην ομάδα των γυναικών με διαβήτη κύησης. Οι μετρήσεις της πρωτεΐνης LRP5 σταθμίζονται ως προς την β-ακτίνη που χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας. Η διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,01$). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 5 και διάγραμμα 1 αντίστοιχα.

	Μάρτυρες N=34	Ασθενείς N=22	p-value
LRP5/b-actin	0.3708	0.5383	<0,01*

Πίνακας 5: Έλεγχος μέσων τιμών του λόγου LRP5/b-actin

Μέση τιμή πρωτεΐνης LRP5 (LRP5/b-actin)



Διάγραμμα 1: Σχηματική απεικόνιση (ιστόγραμμα) της διαφοράς μέσων όρων LRP5/b-actin ανάμεσα στους πληθυσμούς

Η διερεύνηση ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ των σωματομετρικών χαρακτηριστικών εντός των ομάδων των υγιών και των ασθενών, έγινε με βάση τον γραμμικό συντελεστή του Pearson.

Στην ομάδα των μητέρων χωρίς διαβήτη κύησης δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του μορίου LRP5 και κάποιου σωματομετρικού χαρακτηριστικού (Πίνακας 6). Επίσης στην ομάδα των μητέρων με διαβήτη κύησης δεν υπάρχει σημαντική συσχέτιση του LRP5 με κάποιο σωματομετρικό χαρακτηριστικό (Πίνακας 7).

ΜΗΤΕΡΕΣ ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ

	LRP5 (N=34)	Ηλικία (N=34)	Εβδομάδες κύησης (N=34)	Βάρος πριν τοκετό (N=32)	Βάρος μετά τοκετό (N=32)	BMI πριν τοκετό
Ηλικία	-0.198 NS					
Εβδομάδες κύησης	0.019 NS	-0.316 NS				
Βάρος πριν τοκετό	-0.185 NS	0.131 NS	-0.418 Sig: <0.05*			
Βάρος μετά τοκετό	-0.150 NS	0.114 NS	-0.262 NS	0.86 Sig <0.01*		
BMI πριν τοκετό	-0.316 NS	0.081 NS	-0.349 NS	0.912 Sig <0,01*	0.82 Sig<0.01*	
BMI μετά τοκετό	-0.274 NS	0.1 NS	0.242 NS	0.086 NS	-0.073 NS	0.173 NS

Πίνακας 6: Γραμμική συσχέτιση χαρακτηριστικών των μητέρων χωρίς διαβήτη κύησης

ΜΗΤΕΡΕΣ ΜΕ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ

	LRP5 (N=22)	Ηλικία (N=22)	Εβδομάδες κύησης (N=22)	Βάρος πριν τοκετό (N=20)	Βάρος μετά τοκετό (N=20)	BMI πριν τοκετό
Ηλικία	0.062 NS					
Εβδομάδες κύησης	0.187 NS	-0.337 NS				
Βάρος πριν τοκετό	0.057 NS	-0.091 NS	0.009 NS			
Βάρος μετά τοκετό	0.057 NS	-0.106 NS	0.045 NS	0.976 Sig <0,01*		
BMI πριν τοκετό	-0.086 NS	-0.039 NS	0.069 NS	0.962 Sig<0.01*	0.908 Sig <0.01*	
BMI μετά τοκετό	-0.116 NS	-0.018 NS	0.129 NS	0.943 Sig<0,01*	0.953 Sig<0.01*	0.964 Sig<0.01*

Πίνακας 7: Γραμμική συσχέτιση χαρακτηριστικών των μητέρων με διαβήτη κύησης

Στην ομάδα των νεογνών από υγιείς μητέρες βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του μήκους μηριαίου οστού και του LRP5 καθώς και με την γλυκόζη ομφάλιου λώρου (Πίνακας 8), ενώ στην ομάδα των νεογνών από μητέρες που πάσχουν από διαβήτη κύησης δεν φάνηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του LRP5 και κάποιου χαρακτηριστικού (Πίνακας 9).

ΝΕΟΓΝΑ ΑΠΟ ΜΗΤΕΡΕΣ ΧΩΡΙΣ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ

	LRP5 (N=34)	Βάρος νεογνού (N=34)	Μήκος νεογνού (N=20)	Μήκος Μηριαίου (N=25)	Γλυκόζη ομφάλιου λώρου
Βάρος νεογνού	-0,201 NS				
Μήκος νεογνού	-0.218 NS	0.802 Sig: <0,01 *			
Μήκος Μηριαίου	-0.715 Sig:<0,01*	0.166 NS	0.211 NS		
Γλυκόζη ομφάλιου λώρου	-0.279 NS	0,151 NS	0,3 NS	0.423 Sig:<0.05*	
BMI νεογνού	0.174 NS	0.729 Sig: <0,01 *	0.169 NS	0.515 Sig:<0.05*	-0.166 NS

Πίνακας 8: Γραμμική συσχέτιση χαρακτηριστικών των νεογνών από υγιείς μητέρες

ΝΕΟΓΝΑ ΑΠΟ ΜΗΤΕΡΕΣ ΜΕ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ

	LRP5 (N=22)	Βάρος νεογνού (N=22)	Μήκος νεογνού (N=20)	Μήκος Μηριαίου (N=21)	Γλυκόζη ομφάλιου λώρου
Βάρος νεογνού	0.121 NS				
Μήκος νεογνού	0.192 NS	0.440 Sig: <0.05*			
Μήκος Μηριαίου	-0.182 NS	0.024 NS	0.276 NS		
Γλυκόζη ομφάλιου λώρου	0,191 NS	-0,387 NS	-0.04 NS	0,052 NS	
BMI νεογνού	-0.157 NS	0.07 NS	-0.859 Sig: <0.01*	-0.302 NS	-0.176 NS

Πίνακας 9: Γραμμική συσχέτιση χαρακτηριστικών των νεογνών από μητέρες με διαβήτη κύησης

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την μελέτη μας φάνηκε πως η μέση τιμή της πρωτεΐνης LRP5 διαφέρει στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στην ομάδα του διαβήτη κύησης και στην ομάδα χωρίς διαβήτη κύησης. Συγκεκριμένα, ο μέσος όρος των τιμών στην ομάδα του διαβήτη κύησης μετρήθηκε υψηλότερος από την ομάδα των γυναικών χωρίς διαβήτη. Το μόριο LRP5 είναι ένας συνυποδοχέας στο μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνη. Το Wnt μονοπάτι έχει συσχετισθεί με τον διαβήτη και ειδικότερα μέσω της συμμετοχής του στην ανάπτυξη του παγκρέατος, στην λειτουργία των νησιδίων, στην έκκριση ινσουλίνης καθώς και στην λειτουργία των λιποκυττάρων (Kanazawa et al., 2004, Rulifson et al., 2007, Palsgaard et al., 2012). Το γονίδιο του LRP5 στον άνθρωπο βρίσκεται στην περιοχή IDDM4 η οποία σχετίζεται με διαβήτη τύπου I (Twells et al., 2003). Το LRP5 εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιποπρωτεϊνών. Σε μελέτες σε τρωκτικά αλλά και σε ανθρώπους η έλλειψη του LRP5 συνδέθηκε με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης πλάσματος καθώς και διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη και έκκρισης ινσουλίνης (Fujino et al., 2003, Saarinen et al., 2010). Στον άνθρωπο πολυμορφισμοί του LRP5 έχουν συσχετισθεί με παχυσαρκία (Guo et al., 2006), υπέρταση και υπερχοληστερολαιμία (Suwazono et al., 2006).

Η μελέτη μας αφορά μια ειδική κατηγορία του διαβήτη, τον σακχαρώδη διαβήτη κύησης, όπου το Wnt μονοπάτι έχει μελετηθεί σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο. Η μελέτη των López-Escobar et al., (2015) σε τρωκτικά, καταλήγει πως το υπεργλυκαιμικό περιβάλλον, μέσω του μην κανονικού Wnt μονοπατιού, επηρεάζει την ανάπτυξη των οφθαλμών. Στον άνθρωπο έχει παρατηρηθεί διαφορά στην έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα TCF7L2, στα πλαίσια του διαβήτη κύησης (Tong et al., 2009, Kuzmicki et al., 2011). Δεν υπάρχουν μελέτες συγκεκριμένα για το LRP5 και τον διαβήτη κύησης.

Ο πλακούντας είναι ένα “προσωρινό” όργανο και ο κύριος ρυθμιστής της εμβρυομητρικής κυκλοφορίας, καθώς μεταξύ των λειτουργιών του, ρυθμίζει την διέλευση μορίων ανάμεσα στη μητέρα και στο έμβryo. Είναι ιδιαίτερα κυτταροβριθής και μεταξύ άλλων περιέχει τροφοβλάστες, μεσεγγυματικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (Wang, Y., 2010). Δεν έχει μελετηθεί ως προς τις αλλαγές που εμφανίζει στο Wnt μονοπάτι. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε πως το μόριο LRP5 υπάρχει σε τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα αλλά υπάρχουν μελέτες σχετικά με την έκφραση του στο διαβήτη. Από τα πειράματά μας φαίνεται πως η πρωτεΐνη

LRP5 όχι μόνο υπάρχει στον πλακούντα αλλά ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στον διαβήτη κύησης.

Το μόριο LRP5 θεωρείται ένας από τους κύριους ρυθμιστές της οστικής πυκνότητας (Rivadeneira et al., 2009, Richards et al., 2012). Μεταλλάξεις στο LRP5 προκαλούν διαταραχές είτε με αυξημένη είτε με μειωμένη οστική πυκνότητα. Μεταλλάξεις που μειώνουν την λειτουργία του LRP5 επάγουν το σύνδρομο οστεοπόρωσης – ψευδογλοιώματος (OPPG) (Joiner et., 2013, Trajanoska et al., 2018), ενώ μεταλλάξεις αυξάνουν την λειτουργία του LRP5 σχετίζονται με ασυνήθιστα αυξημένη οστική πυκνότητα (Johnson, M. L., 2004). Στην μελέτη μας βρέθηκε πως η πρωτεΐνη LRP5 συσχετίζεται αρνητικά με το μήκος μηριαίου στα νεογνά από μητέρες χωρίς διαβήτη κύησης, ενώ δεν υπήρχε καμία τέτοια στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην ομάδα των νεογνών από μητέρες με διαβήτη κύησης. Το ότι δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στον πληθυσμό με διαβήτη μπορεί να οφείλεται στο μικρό μέγεθος του δείγματος αλλά ίσως να μην είναι και τυχαία.

Η ανάλυση των σωματομετρικών χαρακτηριστικών δεν έδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των μεταβλητών ανάμεσα στους πληθυσμούς των νεογνών με εξαίρεση αύξηση του μέσου όρου γλυκόζης ομφάλιου λώρου στην ομάδα των νεογνών από διαβητικές μητέρες συγκριτικά με την ομάδα νεογνών από υγιείς μητέρες. Επίσης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μέσων όρων ανάμεσα στα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των μητέρων στους δύο πληθυσμούς. Επίσης οι μέσοι όροι της ηλικία μητέρας και δείκτης μάζας σώματος (BMI) πριν τον τοκετό αν και δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς, πλησιάζουν το απαιτούμενο όριο σημαντικότητας.

Τέλος, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μέσων όρων βάρους των νεογνών ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς που μελετήσαμε. Επομένως στην ομάδα του διαβήτη κύησης δεν παρατηρήθηκε μακροσωμία (βάρος γέννησης νεογνού > 4 kg, *Obstetrics & Gynecology*. 128(5):e195–e209, NOVEMBER 2016). Γνωρίζουμε πως τα νεογνά από μητέρες με διαβήτη κύησης εμφανίζουν συχνότερα μακροσωμία συγκριτικά με τον υγιή πληθυσμό (Van Wootten, W., & Turner, R. E., 2002, Bo et al., 2003, Lowe et al., 2012, Kamana et al., 2015). Η πιθανότητα εμφάνισης μακροσωμίας φαίνεται πως μεταβάλλεται με την καλή ρύθμιση της γλυκόζης πλάσματος κατά την κύηση και φυσικά με την ρύθμιση του βάρους της μητέρας αν είναι παχύσαρκη (Horvath et al.,

2010, Falavigna et al., 2012). Επομένως το ότι οι μέσοι όροι βάρους γέννησης νεογνών δεν διαφέρουν σημαντικά, μάλλον οφείλεται αφενός στην επίτευξη νορμογλυκαιμίας της μητέρας καθώς και στο ότι οι μητέρες δεν ήταν παχύσαρκες σε κανέναν πληθυσμό μελέτης. Η ύπαρξη παχυσαρκίας ίσως επιδρά διαφορετικά από την υπεργλυκαιμία στην εμφάνιση μακροσωμίας σύμφωνα με τις μελέτες των Ehrenberg et al., 2004, Yogen & Langer, 2008, Kamana et al., 2015.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ai, M., Holmen, S. L., Van Hul, W., Williams, B. O., & Warman, M. L. (2005). Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 4946-4955.
- Adams, K. M., Li, H., Nelson, R. L., Ogburn Jr, P. L., & Danilenko-Dixon, D. R. (1998). Sequelae of unrecognized gestational diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 178(6), 1321-1332.
- Alwan, N., Tuffnell, D. J., & West, J. (2009). Treatments for gestational diabetes. *The Cochrane Library*. American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- Aplin, J. D., & Kimber, S. J. (2004). Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 48.
- Ategbro, J. M., Grissa, O., Yessoufou, A., Hichami, A., Dramane, K. L., Moutairou, K., ... & Khan, N. A. (2006). Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(10), 4137-4143.
- Aubin JE, Heersche JNM 2005 Vitamin D and osteoblasts. In: Feldman D, Pike, JW, Glorieux FH, eds. Vitamin D. 2nd ed. Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 649–663
- Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., ... & Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell*, 151(7), 1443-1456.
- Aye, I. L., Jansson, T., & Powell, T. L. (2013). Interleukin-1 β inhibits insulin signaling and prevents insulin-stimulated system A amino acid transport in primary human trophoblasts. *Molecular and cellular endocrinology*, 381(1), 46-55.
- Babij, P., Zhao, W., Small, C., Kharode, Y., Yaworsky, P. J., Bouxsein, M. L., ... & Marzolf, J. (2003). High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(6), 960-974.
- Balemans, W., Devogelaer, J. P., Cleiren, E., Pitters, E., Caussin, E., & Van Hul, W. (2007). Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone

mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(5), 708-716.

- Balemans, W., Ebeling, M., Patel, N., Van Hul, E., Olson, P., Dioszegi, M., ... & Paes-Alves, A. F. (2001). Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Human molecular genetics*, 10(5), 537-544.
- Baron, R., Rawadi, G., & Roman-Roman, S. (2006). Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Current topics in developmental biology*, 76, 103-127.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., & Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592), 638.
- Bellido, T., Saini, V., & Pajevic, P. D. (2013). Effects of PTH on osteocyte function. *Bone*, 54(2), 250-257.
- Benirschke K, Kaufmann P, and Baergen RN (2006) *Pathology of the Human Placenta*. 5th edn. New York: Springer; p. 1050.
- Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D., & MacDougald, O. A. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3324-3329.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., & Hsieh, J. C. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382(6588), 225.
- Björklund, P., Svedlund, J., Olsson, A. K., Åkerström, G., & Westin, G. (2009). The internally truncated LRP5 receptor presents a therapeutic target in breast cancer. *PloS one*, 4(1), e4243.
- Bleker OP, Kloosterman GJ, Mieras DJ, Oosting J, Salle HJA. Intervillous space during uterine contractions in human subjects: An ultrasonic study. *Am J Obstet Gynecol* 1975, 123:697.
- Bo, S., Menato, G., Signorile, A., Bardelli, C., Lezo, A., Gallo, M. L., ... & Pagano, G. (2003). Obesity or diabetes: what is worse for the mother and for the baby?. *Diabetes & metabolism*, 29(2), 175-178.

- Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., ... & Lifton, R. P. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *New England Journal of Medicine*, 346(20), 1513-1521.
- Brody, S. C., Harris, R., & Lohr, K. (2003). Screening for gestational diabetes: a summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Obstetrics & Gynecology*, 101(2), 380-392.
- Buchanan, T. A. (1995). Metabolic changes during normal and diabetic pregnancies. *Diabetes mellitus in pregnancy. 2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone*, 59-77.
- Burgers, T. A., & Williams, B. O. (2013). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling within and from osteocytes. *Bone*, 54(2), 244-249.
- Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2012). The placenta and developmental programming: balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. *Placenta*, 33, S23-S27.
- Carpenter, M. W., & Coustan, D. R. (1982). Criteria for screening tests for gestational diabetes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 144(7), 768-773.
- Casey, B. (2015). 3: Effect of treatment of mild gestational diabetes on long-term maternal outcomes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 212(1), S3.
- Catalano, P. M., Huston, L., Amini, S. B., & Kalhan, S. C. (1999). Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *American journal of obstetrics and gynecology*, 180(4), 903-916.
- Cawthorn, W. P., Heyd, F., Hegyi, K., & Sethi, J. K. (2007). Tumour necrosis factor- α inhibits adipogenesis via a β -catenin/TCF4 (TCF7L2)-dependent pathway. *Cell death and differentiation*, 14(7), 1361.
- Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(1), 16-24.
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192-1205.

- Crowther, C. A., Hiller, J. E., Moss, J. R., McPhee, A. J., Jeffries, W. S., & Robinson, J. S. (2005). Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *New England Journal of Medicine*, 352(24), 2477-2486.
- Dabelea, D. (2007). The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes care*, 30(Supplement 2), S169-S174.
- DeSisto, C. L., Kim, S. Y., & Sharma, A. J. (2014). Peer Reviewed: Prevalence Estimates of Gestational Diabetes Mellitus in the United States, Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS), 2007–2010. *Preventing chronic disease*, 11.
- Desoye, G., Hauguel-de Mouzon, S., & Shafir, E. (2003). The placenta in diabetic pregnancy. *Textbook of Diabetes in Pregnancy*, 1.
- Diabetes Atlas International Diabetes Federation. 6th ed. Available from: URL: <http://www.idf.org/diabetesatlas>
- Di Cianni, G., Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C., & Del Prato, S. (2003). Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 19(4), 259-270.
- Donovan, P. J., & McIntyre, H. D. (2010). Drugs for gestational diabetes. *Australian prescriber*, 33(5), 141-4.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *cell*, 89(5), 747-754.
- Ehrenberg, H. M., Mercer, B. M., & Catalano, P. M. (2004). The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 191(3), 964-968.
- Figueroa, D. J., Hess, J. F., Ky, B., Brown, S. D., Sandig, V., Hermanowski-Vosatka, A., ... & Austin, C. P. (2000). Expression of the type I diabetes-associated gene LRP5 in macrophages, vitamin A system cells, and the Islets of Langerhans suggests multiple potential roles in diabetes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(10), 1357-1368.
- Fraser, R., & Heller, S. R. (2007). Gestational diabetes: aetiology and management. *Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine*, 17(12), 345-348.

- Fretz, J. A., Zella, L. A., Kim, S., Shevde, N. K., & Pike, J. W. (2006). 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 via deoxyribonucleic acid sequence elements located downstream of the start site of transcription. *Molecular Endocrinology*, 20(9), 2215-2230.
- Fujino, T., Asaba, H., Kang, M. J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., ... & Okubo, M. (2003). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1), 229-234.
- Genetos, D. C., Yellowley, C. E., & Loots, G. G. (2011). Prostaglandin E2 signals through PTGER2 to regulate sclerostin expression. *PLoS one*, 6(3), e17772.
- Genuth, S., Alberti, K. G., Bennett, P., Buse, J., Defronzo, R., Kahn, R., ... & Nathan, D. (2003). Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26, 3160-3167.
- Gilbert-Barnes, E. (1996). Pathology of the Human Placenta, Kurt Benirschke and Peter Kaufmann. *ARCHIVES OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE*, 120, 313-313.
- Gooi, J. H., Pompolo, S., Karsdal, M. A., Kulkarni, N. H., Kalajzic, I., McAhren, S. H. M., ... & Walsh, N. C. (2010). Calcitonin impairs the anabolic effect of PTH in young rats and stimulates expression of sclerostin by osteocytes. *Bone*, 46(6), 1486-1497.
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*, 29, 415-445.
- Gong, Y., Vikkula, M., Boon, L., Liu, J., Beighton, P., Ramesar, R., ... & De Paepe, A. (1996). Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *American journal of human genetics*, 59(1), 146.
- Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., ... & Zacharin, M. (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107(4), 513-523.

- Guo, Y., Hockert, P., Che, F., George, S., Xie, J., Zi, X., & Hoang, B. H. (2008). Dominant negative LRP5 decreases tumorigenicity and metastasis of osteosarcoma.
- Hartmann, C. (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in cell biology*, 16(3), 151-158.
- Hauguel-de Mouzon, S., & Guerre-Millo, M. (2006). The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta*, 27(8), 794-798.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131(8), 1663-1677.
- Hernandez, P., Whitty, C., Wardale, R. J., & Henson, F. M. (2014). New insights into the location and form of sclerostin. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(4), 1108-1113.
- Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6), 1678S-1688S.
- Holmen, S. L., Salic, A., Zylstra, C. R., Kirschner, M. W., & Williams, B. O. (2002). A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate β -catenin-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 34727-34735.
- Horvath, K., Koch, K., Jeitler, K., Matyas, E., Bender, R., Bastian, H., ... & Siebenhofer, A. (2010). Effects of treatment in women with gestational diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 340, c1395.
- Hu, H., Hilton, M. J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D. M., & Long, F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*, 132(1), 49-60.
- Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *Journal of clinical pathology*, 61(12), 1296-1302.
- Jansson, N., Rosario, F. J., Gaccioli, F., Lager, S., Jones, H. N., Roos, S., ... & Powell, T. L. (2013). Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(1), 105-113.

- Jin, T. (2008). The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 51(10), 1771.
- Jiwani, A., Marseille, E., Lohse, N., Damm, P., Hod, M., & Kahn, J. G. (2012). Gestational diabetes mellitus: results from a survey of country prevalence and practices. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 25(6), 600-610.
- Johnson, M. L., Gong, G., Kimberling, W., Recker, S. M., Kimmel, D. B., & Recker, R. R. (1997). Linkage of a gene causing high bone mass to human chromosome 11 (11q12-13). *The American Journal of Human Genetics*, 60(6), 1326-1332.
- Johnson, M. L. (2004). The high bone mass family-the role of Wnt/Lrp5 signaling in the regulation of bone mass. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 4(2), 135.
- Joiner, D. M., Ke, J., Zhong, Z., Xu, H. E., & Williams, B. O. (2013). LRP5 and LRP6 in development and disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(1), 31-39.
- Jones, C. (2001). Gestational diabetes and its impact on the neonate. *Neonatal Network*, 20(6), 17-23.
- Jones, H. N., Jansson, T., & Powell, T. L. (2009). IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297(5), C1228-C1235.
- Kamana, K. C., Shakya, S., & Zhang, H. (2015). Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 66(Suppl. 2), 14-20.
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Sekine, A., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kashiwagi, A., ... & Iwamoto, Y. (2004). Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *The American Journal of Human Genetics*, 75(5), 832-843.

- Kapoor, N., Sankaran, S., Hyer, S., & Shehata, H. (2007). Diabetes in pregnancy: a review of current evidence. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 19(6), 586-590.
- Karnik, S. K., Chen, H., McLean, G. W., Heit, J. J., Gu, X., Zhang, A. Y., ... & Kim, S. K. (2007). Menin controls growth of pancreatic β -cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus. *Science*, 318(5851), 806-809.
- Karpe, F., & Pinnick, K. E. (2015). Biology of upper-body and lower-body adipose tissue [mdash] link to whole-body phenotypes. *Nature reviews Endocrinology*, 11(2), 90-100.
- Kato, M., Patel, M. S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B. H. J., Glass, D. A., ... & Lang, R. A. (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of cell biology*, 157(2), 303-314.
- Kim, D. H., Inagaki, Y., Suzuki, T., Ioka, R. X., Yoshioka, S. Z., Magoori, K., ... & Fujino, T. (1998). A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E. *The Journal of Biochemistry*, 124(6), 1072-1076.
- Kim, S. Y., England, J. L., Sharma, J. A., & Njoroge, T. (2011). Gestational diabetes mellitus and risk of childhood overweight and obesity in offspring: a systematic review. *Experimental diabetes research*, 2011.
- Kirwan, J. P., Hauguel-De Mouzon, S., Lepercq, J., Challier, J. C., Huston-Presley, L., Friedman, J. E., ... & Catalano, P. M. (2002). TNF- α is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*, 51(7), 2207-2213.
- Kiserud, T. (2005, December). Physiology of the fetal circulation. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 10, No. 6, pp. 493-503). WB Saunders.
- Kitwitee, P., Limwattananon, S., Limwattananon, C., Waleekachonlert, O., Ratanachotpanich, T., Phimphilai, M., ... & Pongchaiyakul, C. (2015). Metformin for the treatment of gestational diabetes: an updated meta-analysis. *Diabetes research and clinical practice*, 109(3), 521-532.
- Kjos, S. L., & Buchanan, T. A. (1999). Gestational diabetes mellitus. *New England journal of medicine*, 341(23), 1749-1756.

- Kleiblova, P., Dostalova, I., Bartlova, M., Lacinova, Z., Ticha, I., Krejci, V., ... & Haluzik, M. (2010). Expression of adipokines and estrogen receptors in adipose tissue and placenta of patients with gestational diabetes mellitus. *Molecular and cellular endocrinology*, 314(1), 150-156.
- Kuzmicki, M., Telejko, B., Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Kalejta, K., Lemancewicz, A., Zdrodowski, M., ... & Szamatowicz, J. (2011). The expression of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) in fat and placental tissue from women with gestational diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 94(2), e43-e46.
- Laine, C. M., Chung, B. D., Susic, M., Prescott, T., Semler, O., Fiskerstrand, T., ... & Cole, W. G. (2011). Novel mutations affecting LRP5 splicing in patients with osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG). *European Journal of Human Genetics*, 19(8), 875.
- Li, X., Ominsky, M. S., Niu, Q. T., Sun, N., Daugherty, B., D'Agostin, D., ... & Asuncion, F. (2008). Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(6), 860-869.
- Loh, N. Y., Neville, M. J., Marinou, K., Hardcastle, S. A., Fielding, B. A., Duncan, E. L., ... & Christodoulides, C. (2015). LRP5 regulates human body fat distribution by modulating adipose progenitor biology in a dose-and depot-specific fashion. *Cell metabolism*, 21(2), 262-272.
- López-Escobar, B., Cano, D. A., Rojas, A., de Felipe, B., Palma, F., Sánchez-Alcázar, J. A., ... & Ybot-González, P. (2015). The effect of maternal diabetes on the Wnt-PCP pathway during embryogenesis as reflected in the developing mouse eye. *Disease models & mechanisms*, 8(2), 157-168.
- Lowe, L. P., Metzger, B. E., Dyer, A. R., Lowe, J., McCance, D. R., Lappin, T. R., ... & Oats, J. J. (2012). Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations of maternal A1C and glucose with pregnancy outcomes. *Diabetes care*, 35(3), 574-580.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., & Marhold, J. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*, 417(6889), 664.

- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell*, 17(1), 9-26.
- Magoori, K., Kang, M. J., Ito, M. R., Kakuuchi, H., Ioka, R. X., Kamataki, A., ... & Sasaki, M. (2003). Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11331-11336.
- Mani, A., Radhakrishnan, J., Wang, H. E., Mani, A., Mani, M. A., Nelson-Williams, C., ... & Lifton, R. P. (2007). LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*, 315(5816), 1278-1282.
- Mauricio, D., Balsells, M., Morales, J., Corcoy, R., Puig-Domingo, M., & de Leiva, A. (1996). Islet Cell Autoimmunity in Women with Gestational Diabetes and Risk of Progression to Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 12(4), 275-285.
- McCabe, C. F., & Perng, W. (2017). Metabolomics of Diabetes in Pregnancy. *Current Diabetes Reports*, 17(8), 57.
- Metzger, B. E. (2007). Long-term outcomes in mothers diagnosed with gestational diabetes mellitus and their offspring. *Clinical obstetrics and gynecology*, 50(4), 972-979.
- Moon, R. T., & Shah, K. (2002). Developmental biology: Signalling polarity. *Nature*, 417(6886), 239-240.
- Norman, A. W. (2008). From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American journal of clinical nutrition*, 88(2), 491S-499S.
- Norwitz, N. G., Mota, A. S., Misra, M., & Ackerman, K. E. (2019). LRP5, Bone Density, and Mechanical Stress: A Case Report and Literature Review. *Frontiers in Endocrinology*, 10.
- Nusse, R., & Varmus, H. E. (1992). Wnt genes. *Cell*, 69(7), 1073-1087.
- Pantham, P., Aye, I. L. H., & Powell, T. L. (2015). Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta*, 36(7), 709-715.
- Papathanasiou, I., Malizos, K. N., & Tsezou, A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(3), 348-353.

- Palsgaard, J., Emanuelli, B., Winnay, J. N., Sumara, G., Karsenty, G., & Kahn, C. R. (2012). Cross-talk between insulin and Wnt signaling in preadipocytes role of WNT co-receptor low density lipoprotein receptor-related protein-5 (LRP5). *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 12016-12026.
- Qatanani, M., & Lazar, M. A. (2007). Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*, 21(12), 1443-1455.
- Radaelli, T., Varastehpour, A., Catalano, P., & Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes*, 52(12), 2951-2958.
- Rajamannan, N. M. (2011). The role of Lrp5/6 in cardiac valve disease: LDL-density-pressure theory. *Journal of cellular biochemistry*, 112(9), 2222-2229.
- Rampersad, R., Cervar-Zivkovic, M., & Nelson, D. M. (2011). Development and anatomy of the human placenta. *The Placenta: From Development to Disease, From Development to Disease*, 17-26.
- Ricart, W., Lopez, J., Mozas, J., Pericot, A., Sancho, M. A., González, N., ... & Ramírez, O. (2005). Body mass index has a greater impact on pregnancy outcomes than gestational hyperglycaemia. *Diabetologia*, 48(9), 1736-1742.
- Richards, J. B., Zheng, H. F., & Spector, T. D. (2012). Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nature Reviews Genetics*, 13(8), 576.
- Rieck, S., & Kaestner, K. H. (2010). Expansion of β -cell mass in response to pregnancy. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(3), 151-158.
- Rivadeneira, F., Styrkársdóttir, U., Estrada, K., Halldórsson, B. V., Hsu, Y. H., Richards, J. B., ... & Cupples, L. A. (2009). Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature genetics*, 41(11), 1199.
- Robling, A. G., Niziolek, P. J., Baldrige, L. A., Condon, K. W., Allen, M. R., Alam, I., ... & Turner, C. H. (2008). Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), 5866-5875.

- Rowan, J. A., Hague, W. M., Gao, W., Battin, M. R., & Moore, M. P. (2008). Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *New England Journal of Medicine*, 358(19), 2003-2015.
- Rulifson, I. C., Karnik, S. K., Heiser, P. W., Ten Berge, D., Chen, H., Gu, X., ... & Kim, S. K. (2007). Wnt signaling regulates pancreatic β cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6247-6252.
- Ryan, E. A. (2011). Diagnosing gestational diabetes. *Diabetologia*, 54(3), 480-486.
- Saarinen, A., Välimäki, V. V., Välimäki, M. J., Löyttyniemi, E., Auro, K., Uusen, P., ... & Mäkitie, O. (2007). The A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) associates with low peak bone mass in young healthy men. *Bone*, 40(4), 1006-1012.
- Saarinen, A., Saukkonen, T., Kivelä, T., Lahtinen, U., Laine, C., Somer, M., ... & Mäkitie, O. (2010). Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mutations and osteoporosis, impaired glucose metabolism and hypercholesterolaemia. *Clinical endocrinology*, 72(4), 481-488.
- Schmidt, M. I., Duncan, B. B., Reichelt, A. J., Branchtein, L., Matos, M. C., e Forti, A. C., ... & Yamashita, T. (2001). Gestational diabetes mellitus diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes care*, 24(7), 1151-1155.
- Serlin, D. C., & Lash, R. W. (2009). Diagnosis and management of gestational diabetes mellitus. *American family physician*, 80(1).
- Seshadri, R. (2002). American diabetes association gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 25, S94-S96.
- Setji, T. L., Brown, A. J., & Feinglos, M. N. (2005). Gestational diabetes mellitus. *Clinical diabetes*, 23(1), 17-24.
- Smith, A. J. P., Gidley, J., Sandy, J. R., Perry, M. J., Elson, C. J., Kirwan, J. R., ... & Mansell, J. P. (2005). Haplotypes of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene: are they a risk factor in osteoarthritis?. *Osteoarthritis and cartilage*, 13(7), 608-613.
- Sutton, A. L., & MacDonald, P. N. (2003). Vitamin D: more than a “bone-a-fide” hormone. *Molecular Endocrinology*, 17(5), 777-791.

- Suwazono, Y., Kobayashi, E., Uetani, M., Miura, K., Morikawa, Y., Ishizaki, M., ... & Nogawa, K. (2006). G-protein $\beta 3$ subunit polymorphism C1429T and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphism A1330V are risk factors for hypercholesterolemia in Japanese males—a prospective study over 5 years. *Metabolism*, 55(6), 751-757.
- Suwazono, Y., Kobayashi, E., Uetani, M., Miura, K., Morikawa, Y., Ishizaki, M., ... & Nogawa, K. (2006). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 variant A1330V is a determinant of blood pressure in Japanese males. *Life sciences*, 78(21), 2475-2479.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., & He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular cell*, 13(1), 149-156.
- Thaware, P. K., McKenna, S., Patterson, C. C., Hadden, D. R., Pettitt, D. J., & McCance, D. R. (2015). Untreated mild hyperglycemia during pregnancy and anthropometric measures of obesity in offspring at age 5–7 years. *Diabetes care*, 38(9), 1701-1706.
- Tong, Y., Lin, Y., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, Y., Liu, H., & Zhang, B. (2009). Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC medical genetics*, 10(1), 15.
- Toomes, C., Bottomley, H. M., Jackson, R. M., Towns, K. V., Scott, S., Mackey, D. A., ... & Woodruff, G. (2004). Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *The American Journal of Human Genetics*, 74(4), 721-730.
- Trajanoska, K., Morris, J. A., Oei, L., Zheng, H. F., Evans, D. M., Kiel, D. P., ... & Rivadeneira, F. (2018). Assessment of the genetic and clinical determinants of fracture risk: genome wide association and mendelian randomisation study. *bmj*, 362, k3225.
- Twells, R. C., Mein, C. A., Payne, F., Veijola, R., Gilbey, M., Bright, M., ... & Rance, H. E. (2003). Linkage and association mapping of the LRP5 locus on chromosome 11q13 in type 1 diabetes. *Human genetics*, 113(2), 99-105.
- Van Bezooijen, R. L., Papapoulos, S. E., Hamdy, N. A., Ten Dijke, P., & Löwik, C. W. (2005). Control of bone formation by osteocytes? lessons from

the rare skeletal disorders sclerosteosis and van Buchem disease. *BoneKEY-Osteovision*, 2(12), 33-38.

- Van Wootten, W., & Turner, R. E. (2002). Macrosomia in neonates of mothers with gestational diabetes is associated with body mass index and previous gestational diabetes. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 102(2), 241.
- Van Bezooijen, R. L., Svensson, J. P., Eefting, D., Visser, A., van der Horst, G., Karperien, M., ... & Löwik, C. W. (2007). Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(1), 19-28.
- Van Wesenbeeck, L., Cleiren, E., Gram, J., Beals, R. K., Bénichou, O., Scopelliti, D., ... & Warman, M. L. (2003). Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *The American Journal of Human Genetics*, 72(3), 763-771.
- Vandorsten, J. P., Dodson, W. C., Espeland, M. A., Grobman, W. A., Guise, J. M., Mercer, B. M., ... & Scott, J. R. (2013). NIH consensus development conference: diagnosing gestational diabetes mellitus. *NIH consensus and state-of-the-science statements*, 29(1), 1-31.
- Yadav, V. K., Ryu, J. H., Suda, N., Tanaka, K. F., Gingrich, J. A., Schütz, G., ... & Mann, J. J. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*, 135(5), 825-837.
- Yavropoulou, M. P., Xygonakis, C., Lolou, M., Karadimou, F., & Yovos, J. G. (2014). The sclerostin story: from human genetics to the development of novel anabolic treatment for osteoporosis. *Hormones*, 13(4), 476-487.
- Yogev, Y., & Langer, O. (2008). Pregnancy outcome in obese and morbidly obese gestational diabetic women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 137(1), 21-26.
- Wang, Y. (2010, August). Vascular biology of the placenta. In *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* (Vol. 2, No. 1, pp. 1-98). Morgan & Claypool Life Sciences.

- Williams, B. O., & Insogna, K. L. (2009). Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(2), 171-178.
- Zhang, H., Zhang, J., Pope, C. F., Crawford, L. A., Vasavada, R. C., Jagasia, S. M., & Gannon, M. (2010). Gestational diabetes mellitus resulting from impaired β -cell compensation in the absence of FoxM1, a novel downstream effector of placental lactogen. *Diabetes*, 59(1), 143-152.
- Zhong, Z. A., & Williams, B. O. (2011). LRP5 (low density lipoprotein receptor-related protein 5).
- Zhu, Y., & Zhang, C. (2016). Prevalence of gestational diabetes and risk of progression to type 2 diabetes: a global perspective. *Current diabetes reports*, 16(1), 7.
- Βιτωράτος ΝΑ, Ιατράκης ΓΜ. Πλακούντας: ένας ορμονοπαραγωγός αδένας. Έκδοση της Ελληνικής Εταιρείας Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας. Αθήνα 2003.
- Ιατράκης Γ. Βιβλίο Μαιευτικής. Αθήνα, Εκδόσεις “Δεσμός” 2009
- Ιατράκης Γ. Επιλεγμένα Θέματα Μαιευτικής. Αθήνα, Εκδόσεις Ζεβелеκάκη 2011