

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ. ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ**

**Συγκριτική μελέτη της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται  
με την πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων  
σε μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από ομφαλίδες φυσιολογικών  
και παθολογικών εμβρύων με υπολειπόμενη ενδομήτριο ανάπτυξη  
(Intra-Uterine Growth Restriction, IUGR).  
Συσχέτιση με κλινικές, υπερηχογραφικές και βιοχημικές  
παραμέτρους των κήσεων και επιγενετικός έλεγχος**

**Παναγιώτης. Α. Φωτεινόπουλος  
Μαιευτήρας Χειρουργός Γυναικολόγος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Αθήνα 2024**

**1<sup>st</sup> DEPARTMENT OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY,  
UNIVERSITY OF ATHENS, MEDICAL SCHOOL  
HEAD: GEORGIOS DASKALAKIS**

**TITLE OF THESIS:**

**COMPARATIVE STUDY OF THE EXPRESSION OF GENES  
INVOLVED IN STEM CELL PLURIPOTENCE  
IN MESENCYMAL STEM CELLS FROM UMBILICAL  
CORDS OF NORMAL AND IUGR FETUSES.  
CORRELATION WITH CLINICAL, SONOGRAPHIC  
AND BIOCHEMICAL VARIABLES OF GESTATIONS  
AND EPIGENETIC CONTROL.**

**PANAGIOTIS FOTINOPOULOS  
OBSTETRICIAN - GYNECOLOGIST**

**Athens 2024**

## ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ  
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ  
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ  
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΜΙΣΕΘΑΙ  
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ,  
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΗΣΕΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ  
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΤΕΜΕΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-  
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ  
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-  
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΠΡΟΪΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ  
ΑΠΑΞΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ  
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-  
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΕΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΙΜΟΤΙΚΟΙΣ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.  
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΠΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠΙ ΕΦΘΑΣΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ  
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΣΥΝΑΝΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ.  
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-  
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΦΗΜΕΣΟΜΑΙ ΣΥΝΕΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ  
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΝ ΔΩΣΩ, ΑΙΤΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ  
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΣ  
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΑΨΙΩΝΤΑΣ, ΕΥΧΟΡΙΩΣ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ  
ΠΡΗΕΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΤΑΖΙΗΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ  
ΕΠ'ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΣ ΤΟΙΣ ΕΣΙΝ ΠΑΤΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-  
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΨΙΗΣ ΚΑΙ ΕΦΘΟΡΑΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ  
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΕΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ  
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΪΔΩ Η ΑΡΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ  
ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-  
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-  
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ  
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ Ε ΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-  
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'  
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.



## ΟΡΚΟΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΘΕΑΣ, ΕΡΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΣ ΑΥΤΟΥΣ ΩΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ, ΟΤΙ ΘΑ ΤΗΡΗΣΩ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΑΥΤΗΝ ΕΔΩ ΤΗΝ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ. ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΜΕΝ ΕΚΕΙΝΟΝ. Ο ΟΠΟΙΟΣ ΜΕ ΕΔΙΔΑΣΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ, ΙΣΧΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΚΑΜΩ ΚΟΙΝΩΝΟΝ ΤΟΥ ΒΙΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΝ ΒΟΗΘΩ, ΟΤΑΝ ΕΥΡΙΣΚΕΤΑΙ ΕΙΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΝ ΑΝΑΓΚΗΝ, ΚΑΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΓΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥ ΩΣ ΑΔΕΛΦΟΥΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΘΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΚΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΑΥΤΗΝ. ΕΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗΝ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗΝ ΚΑΙ ΕΓΓΡΑΦΟΝ ΣΥΜΦΩΝΙΑΝ, ΘΑ ΠΑΡΕΧΩ ΔΕ ΣΥΜΒΟΥΛΑΣ, ΕΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΟΡΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΟΛΑΣ ΤΑΣ ΥΠΟΛΟΙΠΟΥΣ ΓΝΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΔΙΔΑΣΚΑΛΟΥ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΜΑΘΗΤΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΚΑΙ ΕΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙ ΕΙΝΑΙ ΚΑΙ ΕΧΟΥΝ ΔΕΞΕΙ ΟΡΚΟΝ ΣΥΜΦΩΝΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ ΔΕ ΑΛΙΟΝ.

ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩ ΔΕ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΝ ΑΓΩΓΗΝ ΠΡΟΣ ΩΦΕΛΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΙΝ ΜΟΥ. ΘΑ ΠΡΟΛΑΜΒΑΝΩ ΔΕ ΒΛΑΒΗΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑΝ. ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΝ ΕΙΣ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΕΑΝ ΜΟΥ ΖΗΤΗΣΩ, ΚΑΙ ΟΥΤΕ ΘΑ ΔΩΣΩ ΤΟΙΑΥΤΗΝ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΩΣ ΑΥΤΟΣ ΟΥΤΕ ΕΙΣ ΕΓΚΥΩΝ ΓΥΝΑΙΚΑ ΘΑ ΔΩΣΩ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟΝ ΦΑΡΜΑΚΟΝ. ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΩ ΔΕ ΤΟΝ ΒΙΟΝ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΡΟΠΟΝ ΑΓΝΟΝ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΟΝ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΙΟΝ ΝΟΜΟΝ. ΑΚΟΜΗ ΔΕ ΔΕΝ ΘΑ ΧΕΙΡΟΥΡΓΩ ΟΥΤΕ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΑΣ ΑΠΟ ΛΙΘΙΑΣΙΝ, ΑΛΛΑ ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΑΡΑΡΕΜΠΩ ΕΙΣ ΑΝΔΡΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΥΣ, ΕΙΔΙΚΟΥΣ ΔΙΑ ΤΟ ΕΡΓΟΝ ΤΟΥΤΟ. ΕΙΣ ΟΣΑΣ ΔΕ ΟΙΚΙΑΣ ΜΕΤΑΒΑΙΝΩ, ΘΑ ΕΙΣΕΡΧΟΜΑΙ ΠΡΟΣ ΒΟΗΘΕΙΑΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ, ΑΠΕΧΩΜΕΝ ΠΑΣΗΣ ΕΚΟΥΣΙΑΣ ΑΔΙΚΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΣ ΔΙΑΦΘΟΡΑΣ ΓΑΙ ΣΑΤΚΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΓΥΝΑΙΚΩΝ Η ΑΝΔΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.

ΟΣΑ ΔΕ ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑΝ Η ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΝ ΜΟΥ ΜΕΤΑ ΤΩΝ ΑΛΛΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΕΙΣ ΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗΝ ΤΟΥΣ ΖΩΗΝ, ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕΝΑ ΑΝΑΚΟΙΝΩΘΟΥΝ ΕΙΣ ΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ, ΘΑ ΚΡΑΤΩ ΜΥΣΤΙΚΑ, ΠΙΣΤΕΥΩΝ ΟΤΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΑΠΟΡΡΗΤΑ. ΕΦ' ΟΣΟΝ ΜΕΝ ΛΟΙΠΟΝ ΤΗΡΩ ΑΥΤΟΝ ΕΔΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟΝ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΩ, ΕΙΘΕ ΝΑ ΑΠΟΛΛΑΥΩ ΚΑΙ ΤΗΣ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΗΣ, ΕΚΤΙΜΩΜΕΝΟΣ ΕΞΑΕΙ ΑΠΟ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ. ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΑΥΤΟΝ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΤΟΥΤΩΝ.

**ΜΕ ΕΥΓΝΩΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΣΕΒΑΣΜΟ ΣΤΟΝ:**  
**ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗ ΑΝΤΣΑΚΗ**  
**ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΝΙΚΟΛΑΟ ΠΑΠΑΝΤΩΝΙΟΥ**  
**ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΠΑ**

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 28/01/2013  
(Αριθμός Πρωτοκόλλου 4845/31-1-2013).

**Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

1. Αριστείδης Αντσακλής. Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Νικόλαος Παπαντωνίου. Ομότιμος Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.
3. Καλλιόπη Παππά Καθηγήτρια Μαιευτικής - Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 19/01/2024

Ημερομηνία εξέτασης διδακτορικής διατριβής : 28/03/2024

---

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως.  
(Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202, παρ. 2, του Νόμου 5343)

---



*Στη γυναίκα μου Μαρία*

*Στα παιδιά μου Νάσο και Λάμπρο*

*Στους γονείς μου Αθανάσιο και Θεώνη*



## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στην Α΄ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα» υπό τη διαδοχική διεύθυνση των καθηγητών κυρίων Αριστείδη Αντσακλή, Δημήτριου Λουτράδη και Αλεξάνδρου Ροδολάκη.

Θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στον καθηγητή κύριο **Αριστείδη Αντσακλή**. Αφορμή στάθηκε μια προηγούμενη συγγραφική συνεισφορά μας στο Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου του Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», στην περιγραφική μελέτη μεταξύ άλλων της έκφρασης της IGF2BP1 σε τοιχωματικά μεσεγχυματικά κύτταρα από ομφαλίδες φυσιολογικών εμβρύων από το υλικό της Α΄ Πανεπιστημιακής Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Μαιευτήριο «Αλεξάνδρα». Ο Καθηγητής αναγνώρισε την δυναμική αξία του πεδίου αυτού και με ενθάρρυνε στην επέκταση της μελέτης σε άλλους εμβρυϊκούς υποπληθυσμούς. Ένα ενδιαφέρον πεδίο αποτελούσαν πάντοτε τα έμβρυα με υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη, που εξακολουθούν και συνιστούν κλινική πρόκληση σε παγκόσμιο επίπεδο. Το πεδίο ήταν τελείως νέο και δεν είχε περιγραφεί από άλλους συγγραφείς. Η Α΄ Πανεπιστημιακή Κλινική αποτελούσε ιδανικό τόπο λήψης των δειγμάτων με υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη, καθώς είναι κέντρο αναφοράς για κυήσεις υψηλού κινδύνου

Η εργαστηριακή επεξεργασία και ανάλυση των δειγμάτων δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την επίβλεψη και ενθάρρυνση της συντονίστριας έρευνας του Κέντρου Ανοσολογίας και

Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου του Α.Ο.Ν.Α. "Ο Άγιος Σάββας" **Δρ.Σόνιας Περέζ**, που δυστυχώς χάθηκε πρόωρα, κατά το τελευταίο έτος πραγματοποίησης της παρούσας διατριβής, από την επάρατη νόσο. Εξαιρετικά σημαντική υπήρξε η εργαστηριακή συμβολή των βιολόγων Δρ. Λουίζας Μαχαίρα και του Δρ. Σωτηρίου Φόρτη, συνεργατών της Δρ Σόνιας Περέζ.

Σε επίπεδο επίβλεψης θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στο διττό επιστημονικό ενδιαφέρον της καθηγήτριας κ. **Καλλιόπης Παππά** (κλινικό και εργαστηριακό) που συνέβαλε στην άρτια επίβλεψη και την αντιμετώπιση πρακτικών εργαστηριακών και σχεδιαστικών προβλημάτων της παρούσας μελέτης.

Επίσης, ο καθηγητής κ. **Νικόλαος Παπαντωνίου** με την μακρόχρονη κλινική και επιστημονική και διευθυντική του πείρα πάνω σε ζητήματα κύησης υψηλού κινδύνου, τόσο στην Α', όσο και στην Γ' Πανεπιστημιακή Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, συνεισέφερε σε πλήθος γόνιμων συζητήσεων σχετικά με το κλινικοεργαστηριακό προφίλ των εγκύων που θα περιλαμβάνονταν στην μελέτη.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. **Γεώργιο Δασκαλάκη** που όντας επικεφαλής του τμήματος κύησης υψηλού κινδύνου και με την πολύχρονη πείρα και αρτιότητα που τον διακρίνει, πραγματοποίησε τις υπερηχογραφικές μελέτες ντόπλερ στα έμβρυα με υπολειπόμενη ανάπτυξη, ώστε οι μετρήσεις να είναι υψηλού επιπέδου και ακριβείς.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τους διάδοχους διευθυντές της Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής κυρίους Δημήτριο Λουτράδη και Αλέξανδρο Ροδολάκη για την παροχή διευκολύνσεων κατά το μέσο και τελικό χρονικό διάστημα εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

## Περιεχόμενα

<b>1. Βιογραφικό Σημείωμα.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Περίληψη.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Γενικό Μέρος.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη (FGR).....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Παράγοντες για την εμφάνιση FGR .....	28
3.1.2. Προβλεπτικοί πρώιμοι βιοχημικοί δείκτες FGR.....	30
3.1.3. Προβλεπτικοί υπερηχογραφικοί δείκτες πρώτου τριμήνου για την εμφάνιση εμβρυϊκής υπολειπόμενης ανάπτυξης (FGR).....	32
3.1.4. Υπερηχογραφικοί προβλεπτικοί δείκτες FGR δευτέρου τριμήνου.....	34
3.1.5. Βιοχημικοί προβλεπτικοί δείκτες FGR δευτέρου τριμήνου.....	35
3.1.6. Αιμοδυναμική κατάσταση FGR εμβρύων.....	37
<b>3.2. Υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη και επιδημιολογικές     συσχετίσεις .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. Επιδημιολογική σχέση χαμηλού βάρους γέννησης και καρδιαγγειακής νόσου και αρτηριακής υπέρτασης. Η Υπόθεση Barker .....	45
3.2.2. Επιδημιολογική σχέση χαμηλού βάρους γέννησης και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και παχυσαρκίας.....	46
3.2.3. Επιδημιολογική σχέση χαμηλού βάρους γέννησης και μεταβολικού συνδρόμου .....	48
3.2.4. Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί.....	48
<b>3.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί .....</b>	<b>51</b>
<b>3.4. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) .....</b>	<b>53</b>
3.4.1. Εφαρμογές UC-MSCs σε κυτταρικές θεραπείες.....	54
3.4.2. Εφαρμογές UC-MSCs σε αντικαρκινικές θεραπείες .....	59
<b>3. 5 Ο γενικός ρόλος της IGF2BP1 .....</b>	<b>64</b>

3.5.1. Ο ειδικός ρυθμιστικός ρόλος της IGF2BP1 .....	67
<b>3.6. Ο γενικός ρόλος της P21 (CDKN1A) .....</b>	<b>71</b>
<b>3.7. Ο γενικός ρόλος του NANOG.....</b>	<b>72</b>
<b>3.8. Ο γενικός ρόλος του GLI1 .....</b>	<b>73</b>
<b>3.9. Ο γενικός ρόλος της OCT4 (POU5F1).....</b>	<b>74</b>
<b>3.10. Ο γενικός ρόλος του SOX2 .....</b>	<b>76</b>
<b>3.11. Ο γενικός ρόλος του CMYC .....</b>	<b>77</b>
<b>3.12. Βιβλιογραφικές συσχετίσεις των υπό εξέταση γονιδίων     με τη χρήση τεχνητής νοημοσύνης.....</b>	<b>81</b>
<b>4. Ειδικό μέρος.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1. Σκοπός της μελέτης .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2. Υλικά και Μέθοδος.....</b>	<b>88</b>
4.2.1. Ασθενείς και βιολογικό υλικό.....	88
4.2.2. Προφίλ ασθενών και κριτήρια κατάταξης των δειγμάτων σε κατηγορίες .....	91
4.2.3. Λήψη και μεταφορά του βιολογικού υλικού .....	101
4.2.4. Παραλαβή και κατεργασία των δειγμάτων.....	103
4.2.5. Απομόνωση και συνθήκες καλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ομφάλιου λώρου .....	104
4.2.6. Κατάψυξη κυττάρων.....	105
4.2.7. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας και του αριθμού των κυττάρων.....	106
4.2.8. Χαρακτηρισμός μεσεγχυματικών κυττάρων με ανοσοφθορισμό .....	108
4.2.9. Υπολογισμός χρόνου διπλασιασμού και διπλασιασμών πληθυσμού των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.....	110
4.2.10. Υπολογισμός δείκτη αύξησης και σωρευτικού δείκτη αύξησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων .....	111
4.2.11. Απομόνωση ολικού RNA .....	113
4.2.12. Ποσοτικός έλεγχος και έλεγχος καθαρότητας RNA.....	116

4.2.13. Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση Cdna.....	116
4.2.14. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR).....	117
4.2.15. Στατιστική ανάλυση.....	122
<b>4.3. Αποτελέσματα</b> .....	123
4.3.1. Συγκριτική ανάλυση περιγεννητικού αποτελέσματος .....	123
4.3.1.1. Εβδομάδα περάτωσης της κύησης.....	123
4.3.1.2. Βάρος Γέννησης Νεογνών .....	125
4.3.1.3. Εκατοστιαίες θέσεις βάρους γέννησης νεογνών.....	126
4.3.1.4. Κλίμακα APGAR Score .....	128
4.3.2. Συγκριτική ανάλυση βιοχημικών - αιματολογικών παραμέτρων επιτόκων.....	130
4.3.2.1. Αιμοσφαιρίνη περιφερικού αίματος μητέρας.....	130
4.3.2.2. Αριθμός Λευκών Αιμοσφαιρίων περιφερικού αίματος μητέρας.....	131
4.3.2.3. Αριθμός Αιμοπεταλίων περιφερικού αίματος μητέρας .....	132
4.3.2.4. Ουρία περιφερικού αίματος μητέρας.....	133
4.3.2.5. SGOT περιφερικού αίματος μητέρας .....	135
4.3.2.6. Ουρικό οξύ περιφερικού αίματος μητέρας.....	136
4.3.2.7. Χρόνος προθρομβίνης και INR περιφερικού αίματος μητέρας.....	137
4.3.3. Συγκριτική ανάλυση ανάλυσης φάσματος ντόπλερ ομφαλικής αρτηρίας εμβρύων.....	138
4.3.3.1. Ντόπλερ ομφαλικής αρτηρίας εμβρύων .....	138
4.3.4. Συγκριτική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μεσεγχυματικών κυττάρων σε καλλιεργητικές σειρές .....	140
4.3.4.1. Έκφραση της IGF2BP1 .....	140
4.3.4.2. Έκφραση της P21 .....	142
4.3.4.3. Έκφραση της NANOG .....	144
4.3.4.4. Έκφραση της GLI1 .....	146
4.3.4.5. Έκφραση της OCT4.....	148
4.3.4.6. Έκφραση της SOX2.....	150



4.3.4.7. Έκφραση της CMYC.....	152
4.3.4.8. Συνολική σχετική έκφραση γονιδίων .....	154
<b>4.4. Συζήτηση .....</b>	<b>158</b>
<b>4.5. Συμπεράσματα .....</b>	<b>170</b>
<b>5. Περίληψη στα Αγγλικά (Abstract).....</b>	<b>172</b>
<b>6. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>174</b>

# 1. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

**Παναγιώτης Α. Φωτεινόπουλος,**  
**Μαιευτήρας Χειρουργός-Γυναικολόγος**

---

## ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

---

**Μαιευτήρας Χειρουργός Γυναικολόγος,**

Συνεργαζόμενος ιατρός στο τμήμα Εμβρυομητρικής-Υπερήχων του μαιευτηρίου ΡΕΑ, Παλαιό Φάληρο (2016- σήμερα)

Συνεργαζόμενος ιατρός στο τμήμα Εμβρυομητρικής-Υπερήχων του μαιευτηρίου Λητώ, Αθήνα (2018-2019)

Πανεπιστημιακός και Ακαδημαϊκός Υπότροφος Α΄ Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ, Τμήμα Εμβρυομητρικής Ιατρικής, ΓΝ Αλεξάνδρα, (2016-2017)

Επιμελητής ιατρός στην Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Nordwest Krankenhaus, Frankfurt am Main, Γερμανία (2013-2014).

Ειδικεύομενος Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Α Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, Γ. Ν. Αλεξάνδρα, Δεκέμβριος 2009- Δεκέμβριος 2012

Ειδικεύομενος Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Γ.Ν. Νέας Ιωνίας «Κωνσταντοπούλειο – Αγία Όλγα », Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική (2008-2009)

Αγροτικός Ιατρός στο ειδικό περιφερειακό Ιατρείο Φυλακών Τριπόλεως και το Παναρκαδικό Γενικό Νοσοκομείο Τριπόλεως (2007-2008)

Ειδικευόμενος Γενικής Χειρουργικής, Π.Γ. «ΚΑΤ», Κλινική Χειρουργικής Θώρακος, (2006-2007)

Αγροτικός Ιατρός στο περιφερειακό Ιατρείο Κοπανακίου Μεσσηνίας (2005-2006). Τρίμηνη εκπαίδευση σε ΓΝ. Κυπαρισσίας και ΓΝ. Καλαμάτας

---

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Υποψήφιος Διδάκτωρ με θέμα: «Συγκριτική μελέτη της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων σε μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από ομφαλίδες φυσιολογικών και παθολογικών εμβρύων με υπολειπόμενη ενδομήτριο ανάπτυξη (Intra-Uterine Growth Restriction, IUGR). Συσχέτιση με κλινικές υπερηχογραφικές και βιοχημικές παραμέτρους των κυήσεων και επιγενετικός έλεγχος.»

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Φοιτητής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Β ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, «Έρευνα στην γυναικεία αναπαραγωγή, 2014, Βαθμός Πτυχίου 8,16 «Λίαν Καλώς»

Εκπαίδευση στη μαιευτική και γυναικολογική υπερηχογραφία, υπό τον καθηγητή Eberhard Merz, στο τμήμα υπερήχων του Nordwest Krankenhaus, Frankfurt am Main, Γερμανία (2013-2014).

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Εισαγωγή 1997, Βαθμός Πτυχίου 7,62 «Λίαν Καλώς»

Απολυτήριο Λυκείου, Ελληνικό Λύκειο Στουτγάρδης Γερμανίας, Μάιος 1997, Βαθμός 19 και 11/12 (Άριστα)

---

## COURSES

4ο Σεμινάριο Ρομποτικής Γυναικολογικής Χειρουργικής με πρακτική εξάσκηση στο ρομποτικό σύστημα Da Vinci – S. Αθήνα 2013

Advanced Life Support in Obstetrics (ALSO), Αθήνα 2009.

Σεμινάριο BLS / AED, ΕΚΑΒ Αθήνα, 2009

Advanced Trauma Life Support (ATLS), Πάτρα 2006.

## ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΕΣ

---

Πιστοποίηση **Αγγλικής** γλώσσας επιπέδου FCE (First Certificate in English) του Cambridge University.

Πιστοποίηση **Γερμανικής** Γλώσσας επιπέδου KDS (Kleines Deutsches Sprachdiplom) του Goethe Institut.

Γνώσεις **υπολογιστή**: πιστοποίηση Certified Computer User Syllabus 1.0 του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

---

1. Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Περιγεννητικής Ιατρικής
2. Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία
3. Μέλος της International Society for Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG)
4. Πιστοποιημένο μέλος του Fetal Medicine Foundation (FMF) England.
5. Πιστοποιημένο μέλος του Fetal Medicine Foundation (FMF) Deutschland

## ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΕ ΔΙΔΑΚΤΙΚΑ ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΑ

---

1. Εντατική Θεραπεία και Επείγουσα Ιατρική: Επεμβάσεις - Παρεμβάσεις. Γ. Μπαλτόπουλος - Π. Μυριανθεύς, Ε. Μπούτζουκα, Αθήνα 2007, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αποσυμπίεση υπεζωκότα- κλειστή θωρακοστομία - πλευροδεσία. Π.Μίχος, **Π. Φωτεινόπουλος**, σελ. 485-492
2. Μαιευτική και Γυναικολογία, Λουτράδης Δημήτριος, Δεληγεώρογλου Ευθύμιος, Παπαντωνίου Νικόλαος, Παππά Καλλιόπη. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη – Broken Hill 2017, ISBN: 9789963258949. Κεφάλαιο 13°. Επεμβάσεις προγεννητικού ελέγχου: Λήψη χοριακής λάχνης - Αμνιακού υγρού - Εμβρυϊκού αίματος, Γ. Δασκαλάκης - **Π. Φωτεινόπουλος**, σελ.120-125.
3. Μαιευτική και Γυναικολογία, Λουτράδης Δημήτριος, Δεληγεώρογλου Ευθύμιος, Παπαντωνίου Νικόλαος, Παππά Καλλιόπη. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη - Broken Hill 2017, ISBN: 9789963258949. Κεφάλαιο 27°. Πολύδυμη κύηση, Γ.Δασκαλάκης - **Π.Φωτεινόπουλος**, σελ 223-230.

4. Μαιευτική και Γυναικολογία, Λουτράδης Δημήτριος, Δεληγεώρογλου Ευθύμιος, Παπαντωνίου Νικόλαος, Παππά Καλλιόπη. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη – Broken Hill 2017, ISBN: 9789963258949. Κεφάλαιο 42°. Πρόωρη ρήξη υμένων. Γ. Δασκαλάκης – **Π.Φωτεινόπουλος**, σελ 383-387.
5. Μαιευτική και Γυναικολογία. Αλέξανδρος Ροδολάκης, Καλλιόπη Παππά, Εκδόσεις Πασχαλίδη - Broken Hill, Αθήνα 2022, ISBN: 9789925588183, Κεφάλαιο 8ο - Προγεννητική διάγνωση και εκτίμηση ανευπλοειδίας στην κύηση και Μη Επεμβατικός Προγεννητικός Έλεγχος: Γ.Δασκαλάκης - **Π. Φωτεινόπουλος** (Σελ 109 - 128).

---

## ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

Μαθήματα φυσιολογίας του πνεύμονα και φυσιοθεραπείας αναπνευστικού σε σπουδαστές του τμήματος φυσιοθεραπείας του ΤΕΙ Αθήνας κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2006-2007 στο νοσοκομείο ΚΑΤ.

Εκπαιδευτικές διαλέξεις στους φοιτητές της Α' Μ/Γ Πανεπιστημιακής Κλινικής στο νοσοκομείο «Αλεξάνδρα» κατά τη διάρκεια της θητείας ως Πανεπιστημιακός και Ακαδημαϊκός υπότροφος τα έτη 2016-2017.

Επίδειξη υπερηχογραφήματος 3<sup>ου</sup> τριμήνου στα πλαίσια του συμποσίου «Υπερηχογραφική Αξιολόγηση Εμβρύου στο 1<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> τρίμηνο». Αθήνα 18/3/2017

---

## ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Mahaira LG, Katsara O, Pappou E, Iliopoulou EG, Fortis S, Antsaklis A, Fotinopoulos P, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. IGF2BP1 expression in human mesenchymal stem cells significantly affects their proliferation and is under the epigenetic control of TET1/2 demethylases. *Stem Cells Dev.* 2014 Oct 15;23(20):2501-12. doi: 10.1089/scd.2013.0604. Epub 2014 Jul 14. PMID: 24915579.

Daskalakis G, Fotinopoulos P, Pergialiotis V, Theodora M, Antsaklis P, Sindos M, Papantoniou N, Loutradis D. Delayed interval delivery of the second twin in a woman with altered markers of inflammation. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018 Jun 4;18(1):206. doi: 10.1186/s12884-018-1848-4. PMID: 29866067; PMCID: PMC5987477.

Petrakis E, Chatzipapas I, Papapanagiotou IK, Fotinopoulos P, Siemou P, Ntzeros K, Loutradis D. A Successful Pregnancy Despite the Presence of an Intrauterine Fetal Bone

Fragment. Case Rep Obstet Gynecol. 2019 Oct 17;2019:3064727. doi: 10.1155/2019/3064727. PMID: 31772796; PMCID: PMC6854233.

## **ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

Γιαννούλης Γ, Σύνδος Μ, Φωτεινόπουλος Π, Γρηγοριάδης Θ, Παπαντωνίου Ν, Αντσακλής Α. Συστηματικός ερυθματώδης λύκος: Συμβουλευόντας την ασθενή που επιθυμεί κύηση, Περιγεννητική Ιατρική και Νεογνολογία 2001;6:2 45-52

## **ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

«Λήψη τροφοβλάστης σε δίδυμες κυήσεις μετά από αυτόματη σύλληψη και μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση». 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο υπερήχων στη μαιευτική και γυναικολογία. Θεσσαλονίκη 14-16 Οκτωβρίου 2016

“Τρίτη και κύηση”. Ημερίδα «Συγγενείς Λοιμώξεις, από το Α στο Ω», Αθήνα 27 Ιανουαρίου 2018.

"Εφαρμογές Τρισδιάστατης Μαιευτικής υπερηχογραφίας" 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική & Γυναικολογία», Αθήνα, 7 – 9 Δεκεμβρίου 2018,

«Ultrasound assessment of the posterior fossa of the fetal brain (+3D)» Webinar on Fetal CNS evaluation and Fetal Neurology (1st department of Obstetrics and Gynecology, Department of fetal and maternal medicine), Athens, 25.09.2021

"3D υπερηχογραφία στον προγεννητικό έλεγχο", 22ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 3-12-2023.

## **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Τραυματική ψευδοκύστη πνεύμονα: Διάγνωση, θεραπεία, αντιμετώπιση: Π. ΜΙΧΟΣ, Ι. ΓΑΚΙΔΗΣ, Κ. ΠΟΤΑΡΗΣ, Χ.ΧΑΤΖΗΑΝΤΩΝΙΟΥ, Ν. ΚΟΥΖΑΝΙΔΗΣ, Π. ΦΩΤΕΙΝΟΠΟΥΛΟΣ, Ο.ΚΑΡΑΓΥΡΗΣ, 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Θώρακος – Καρδιάς – Αγγείων, Θεσσαλονίκη 9-11/11/2006
2. Ιατρογενείς κακώσεις θώρακος: Π. ΜΙΧΟΣ, Χ.ΧΑΤΖΗΑΝΤΩΝΙΟΥ, Ι. ΓΑΚΙΔΗΣ, Κ. ΠΟΤΑΡΗΣ, Ε. ΣΑΡΡΑΣ, Ν.ΚΟΥΖΑΝΙΔΗΣ, Π. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΟΠΟΥΛΟΣ, Π.



**ΦΩΤΕΙΝΟΠΟΥΛΟΣ**, 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Θώρακος – Καρδιάς – Αγγείων, Θεσσαλονίκη 9-11/11/2006

3. Λανθάνων (occult) πνευμοθώρακας: Η διαγνωστική προσέγγιση και η σημασία του στην πρόγνωση: Π.ΜΙΧΟΣ, Χ.ΧΑΤΖΗΑΝΤΩΝΙΟΥ, Ι.ΓΑΚΙΔΗΣ, Κ.ΠΟΤΑΡΗΣ, Ν. ΚΟΥΖΑΝΙΔΗΣ, Ε. ΣΑΡΡΑΣ, **Π.ΦΩΤΕΙΝΟΠΟΥΛΟΣ**, Ο.ΚΑΡΑΡΓΥΡΗΣ, 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Θώρακος – Καρδιάς – Αγγείων, Θεσσαλονίκη 9-11/11/2006.
4. Τρόποι παρηγορητικής αγωγής κακοηθών πλευριτικών συλλογών (Modalities of palliative treatment of malignant pleural effusions). Ι.Γακίδης, Π. Μίχος, Χ. Χατζηαντωνίου, Ο. Καραργύρης, **Π. Φωτεινόπουλος**, Ν. Μαρίνος. 5ο Διεθνές Συνέδριο Καρκίνου του πνεύμονα, Συνεδριακό κέντρο Πατρών, 24-27 Ιανουαρίου 2007
5. Μελέτη της ρυθμιστικής συμμετοχής του πλακούντα στην παθολογία της κύησης: Ντόμαλη Α, Παπαντωνίου Ν, **Φωτεινόπουλος Π**, Δασκαλάκης Γ, Μεσογίτης Σ, Αντσακλής Α Αναρτημένη ανακοίνωση (ΑΑ-199): 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο στη Μαιευτική και Γυναικολογία, Θεσσαλονίκη, 17-20 Μαΐου 2012,
6. Παρουσίαση σπανίου κλινικού περιστατικού: Ασθενής 50 ετών με κακοήθη όγκο περιφερικών νευρικών ελύτρων τραχήλου μήτρας (MPNST): Αναρτημένη ανακοίνωση (ΑΑ-253): **Φωτεινόπουλος Π**, Ροδολάκης Α, Θωμάκος Ν, Σωτηροπούλου Μ, Αραμπατζή Ε, Αντσακλής Α: 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο στη Μαιευτική και Γυναικολογία, Θεσσαλονίκη, 17-20 Μαΐου 2012,
7. Υπερηχογραφική παρακολούθηση εμβρύου εγκύου με νόσο Graves. Παρουσίαση περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Αναρτημένη ανακοίνωση (ΑΑ-54). Θεοδωρά Μ., Μαρίτσα Β., Ασημακόπουλος Γ., Αντσακλής Π., **Φωτεινόπουλος Π.**, Δασκαλάκης Γ., Λουτράδης Δ.. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο υπερήχων στη μαιευτική και γυναικολογία. Θεσσαλονίκη 14-16/10/2016

#### **ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

Foteinopoulos P., Merz E. Factor V-Leiden deficiency, antiphospholipid syndrome and recurrent fetal Pena-Shokeir syndrome. Ian Donald 6th Advanced Course of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology & 45th International Meeting of Gestosis Organization, Athens 6-8 December 2013

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ - ΗΜΕΡΙΔΕΣ

1. 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2009, Αθήνα. (18 CME Credits).
2. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Γονιμότητας και Στεριρότητας, 10-12 Δεκεμβρίου 2010, Αθήνα (20 CME Credits).
3. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική και Γυναικολογία, 10-12 Δεκεμβρίου 2010, Αθήνα (10 CME Credits).
4. 27ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής, Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010, 24- 27 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα.
5. 14ο Σεμινάριο- Εξαρτηματικοί όγκοι, διλήμματα και προκλήσεις, 20-21 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα (5 CME Credits).
6. Ημέρες Ενδοκρινολογίας της γυναίκας, 6 Νοεμβρίου 2010, Αρεταίειο Νοσοκομείο, Αθήνα
7. 4ο Σεμινάριο Ενδοσκοπικής Χειρουργικής στη Γυναικολογία, 12 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα. (5 CME Credits).
8. 1ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Γυναικολογικής Ρομποτικής Χειρουργικής: ο ρόλος της Ρομποτικής χειρουργικής στη Γυναικολογία, 12 Μαρτίου 2010, Αθήνα. (5 CME Credits).
9. 8ο Ευρωπαϊκό Σεμινάριο Κολποσκόπησης και Παθολογίας Τραχήλου, 24-25 Ιουνίου 2010, Αθήνα. (5 CME Credits).
10. 21η ετήσια Ειδική Σύνοδος Ελληνικής Μαιευτικής και Γυναικολογικής Εταιρείας, 4-5 Ιουνίου 2010, (5 CME Credits).
11. 2nd Athens Obstetrical Forum: Αντιπαραθέσεις στην Εμβρυομητρική Ιατρική, 12-13 Ιουνίου 2010, Αθήνα (5 CME Credits).
12. Διημερίδα: 20 χρόνια προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, 29-30 Μαΐου 2010, Αθήνα (5 CME Credits)
13. 12ο Διαβητολογικό Συνέδριο, 16-20 Μαρτίου 2011, Αθήνα (24 CME Credits)

14. 3ο Σεμινάριο Γυναικολογικής Ογκολογίας- Διατήρηση Γονιμότητας σε γυναίκες με Γυναικολογικό καρκίνο, 25-27 Φεβρουαρίου 2011, Αθήνα (5 CME Credits).
15. 22ο- Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 24-26 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα (12 CME Credits).
16. 23ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, 25-27 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα (15 CME Credits)
17. 6η ημερίδα Ενδοκρινολογίας: Θυρεοειδής και Γυναίκα: Εφηβεία, Εγκυμοσύνη, Εμμηνόπαυση, 12 Νοεμβρίου 2011, Αθήνα, Αρεταίειο Νοσοκομείο.
18. 37ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 17-21 Μαΐου 2011, Αθήνα (25 CME Credits).
19. Σεμινάριο: Περιεγχειρητική διαχείριση ασθενούς στη Μαιευτική και Γυναικολογία, 16 Μαρτίου 2012, Αθήνα. (3 CME Credits).
20. 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο στη Μαιευτική και Γυναικολογία, 17-20 Μαΐου 2012, Θεσσαλονίκη (12 CME Credits).
21. 7η ημερίδα Ενδοκρινολογίας της Γυναίκας: η υπογονιμότητα στο ζευγάρι, 9 Ιουνίου 2012, Αθήνα.
22. The Fetus as a patient, 31 Αυγούστου-2 Σεπτεμβρίου, Μύκονος (5 CME Credits).
23. 12th Congress of the European Society of Contraception and Reproductive Health, 20-23 Ιουνίου 2012, Αθήνα.
24. Σεμινάριο Γυναικολογικού και Ουρολογικού Καρκίνου 2012, 5-6 Οκτωβρίου 2012, Αθήνα (9 CME Credits).
25. Επιστημονική ημερίδα στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή: Σύγχρονες απόψεις στην εξωσωματική Γονιμοποίηση – Current aspects of IVF - 3 Νοεμβρίου 2012, Αθήνα (3 CME Credits).
26. 8η Ημερίδα Ενδοκρινολογίας της Γυναίκας, Οστά και Γυναίκα, 10 Νοεμβρίου 2012, Αθήνα.
27. Επιστημονική ημερίδα: εξωσωματική γονιμοποίηση και μικρογονιμοποίηση: οι αλήθειες και οι μύθοι, Ένωση Μαιευτήρων Γυναικολόγων Ελλάδος, 24 Νοεμβρίου 2012, Αθήνα (3 CME Credits).

28. Ian Donald 6th Advanced Course of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology & 45th International Meeting of Gestosis Organization, Athens 6-8 December 2013
29. 32ο κλινικό σεμινάριο εμβρυομητρικής ιατρικής " Υπερηχογραφικά Καθοδηγούμενη Επεμβατική Θεραπεία Εμβρύου, Αθήνα 21/7/2014
30. 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο: «Διλήμματα και αντιθέσεις για τον καρκίνο του μαστού σε Ακραίες ηλικίες». Αθήνα 4-5/4/2014
31. Επιστημονικό Σεμινάριο: «Λαπαροσκόπηση στην γυναικολογική ογκολογία». Αθήνα 20/2/2016
32. Ημερίδα: «Αιμορραγία μετά τον τοκετό. Από το α έως το ω». Αθήνα 2/4/2016
33. 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο υπερήχων στη μαιευτική και γυναικολογία. Θεσσαλονίκη 14-16/10/2016.
34. Επιστημονικό συμπόσιο: Υπερηχογραφική αξιολόγηση εμβρύου στο 1<sup>ο</sup> και τρίτο τρίμηνο. Αθήνα 16-17/3/2017
35. 3<sup>ο</sup> Συμπόσιο αντιπαραθέσεων στη μαιευτική και γυναικολογία, Αθήνα 24-25/9/2016
36. Ημερίδα «Συγγενείς Λοιμώξεις, από το Α στο Ω», Αθήνα 27 Ιανουαρίου 2018.
37. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπερήχων στη Μαιευτική & Γυναικολογία», Αθήνα, 7 – 9 Δεκεμβρίου 2018
38. 5<sup>ο</sup> Συμπόσιο Αντιπαραθέσεων / Debates στη μαιευτική και γυναικολογία, Αθήνα 18-19 Φεβρουαρίου 2023.
39. 22ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Αθήνα 3-12-2023.

## 2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή και σκοπός της μελέτης:** Η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (Intrauterine growth restriction, IUGR) συνιστά ένα παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Τα άτομα που γεννιούνται με υπολειπόμενη ανάπτυξη αποκτούν με επιγενετικό τρόπο μια σειρά από γονιδιακές προσαρμογές "λιτού φαινοτύπου" σύμφωνα με την υπόθεση του Barker και είναι επιρρεπή να αναπτύξουν στη ζωή τους μια σειρά από μεταβολικά νοσήματα. Τα μικρά για την ηλικία κύησης έμβρυα (Small for Gestational Age, SGA) συνιστούν μια μεταβατική ομάδα ανάμεσα στα IUGR και στα έμβρυα με φυσιολογική ανάπτυξη (Appropriate for Gestational Age, AGA). Στην παρούσα βιβλιογραφία υπάρχει περιορισμένη γνώση σχετικά με το εάν η IUGR ή SGA κατάσταση μπορεί να επηρεάσει την πλειοδυναμικότητα των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχομένων από ομφαλίδες (Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, UC-MSCs) αναφορικά με την γονιδιακή έκφραση σε διάφορες καλλιεργητικές σειρές.

**Μέθοδοι και υλικό:** Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε την έκφραση δεικτών πλειοδυναμικότητας σε UC-MSCs από συνολικά 21 AGA, IUGR, και SGA έμβρυα. Μελετήθηκε σε σειρές κυτταροκαλλιέργειών P0 και P1 η σχετική έκφραση των κρίσιμων γονιδίων IGF2BP1, CMYC, GLI1, P21, NANOG, OCT4, και SOX2 που εμπλέκονται στην πλειοδυναμικότητα, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διατήρηση του βλαστικού χαρακτήρα των UC-MSCs με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής και qPCR.

**Αποτελέσματα:** Βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης της IGF2BP1 στην ομάδα IUGR (P=0.044) και της P21 στην ομάδα SGA (P=0.024) στην σειρά P0 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα GLI1 και OCT4 παρουσίασαν μικρότερη έκφραση στην ομάδα IUGR ως προς την ομάδα AGA στην σειρά P1 (P=0.0434 και P=0.0343 αντίστοιχα). Η διάμεση έκφραση της NANOG διέφερε στατιστικά μεταξύ AGA και IUGR στην P0 (P=0.034) και P1 (P=0.0205). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές της μέσης έκφρασης των SOX2 και CMYC ανάμεσα στις διάφορες ομάδες στις σειρές P0 και P1.

**Συμπεράσματα:** Η συγκριτική ανάλυση της έκφρασης γονιδιακών δεικτών πλειοδυναμικότητας και του βλαστικού χαρακτήρα UC-MSCs από τις προαναφερθείσες αναπτυξιακές ομάδες αποτελεί ένα καινοφανές περιγραφικό στοιχείο της παρούσης μελέτης που προσθέτει νέες προοπτικές στην υπάρχουσα βιβλιογραφία.



### **3. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### 3.1. Υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη (FGR)

Ως υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη (FGR, **Fetal Growth Restriction**) ορίζεται η παθολογική αναστολή της εμβρυϊκής ανάπτυξης με αποτέλεσμα το έμβρυο να αδυνατεί να εκπληρώσει το αναπτυξιακό του δυναμικό. Ο όρος αυτός έχει βιβλιογραφικά αντικαταστήσει τα τελευταία χρόνια τον προηγούμενό του που ήταν η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (**IUGR, Intra-Uterine Growth Restriction**) και προφανώς υποδηλώνει ότι το έμβρυο βρίσκεται στο επίκεντρο του όρου και ότι η ύπαρξη μήτρας δεν θα είναι ενδεχομένως απαραίτητη στο μέλλον. Στην παρούσα εργασία θα αναφέρονται και οι δύο όροι ως συνώνυμοι.

Ανάλογα με το χρονικό σημείο της κύησης που εμφανίζεται η FGR, διακρίνεται σε πρόωμη και όψιμη υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη<sup>40</sup>. Πρόκειται επί της ουσίας για δύο διακριτούς κλινικούς φαινότυπους.

Η **πρόωμη υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη (Early-onset FGR)** εμφανίζεται πριν τις 34 εβδομάδες της κύησης και οφείλεται σε σοβαρή πλακουντιακή ανεπάρκεια. Σχετίζεται αρκετές φορές με προεκλαμψία και αφορά το 1% των κυήσεων. Εκτός από την υπολειπόμενη βιομετρία, χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική επιδείνωση των φασμάτων ντόπλερ στην ομφαλική και μέση εγκεφαλική αρτηρία και μείωση του αμνιακού υγρού ως συνέπεια των ανακατανομών στην κυκλοφορία του εμβρύου.

Η **όψιμη υπολειπόμενη ανάπτυξη (late-onset FGR)** εμφανίζεται μετά τις 34 εβδομάδες της κύησης, σχετίζεται με πλακουντιακή ανεπάρκεια μικρότερου βαθμού. Η βιομετρία χαρακτηρίζεται από προοδευτική υποβάθμιση της εκατοστιαίας θέσης του

εκτιμώμενου βάρους του εμβρύου, ενώ δεν διαταράσσονται τα φάσματα ντόπλερ στην ομφαλική και μέση εγκεφαλική αρτηρία.

### 3.1.1. Παράγοντες για την εμφάνιση FGR

Οι παράγοντες που προδιαθέτουν για την εμφάνιση εμβρυϊκής υπολειπόμενης ανάπτυξης διακρίνονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες <sup>41</sup>:

- A. Πλακουντιακοί παράγοντες,
- B. Μητρικοί παράγοντες,
- Γ. Εμβρυϊκοί και
- Δ. Φαρμακογενείς παράγοντες.

Στους **πλακουντιακούς παράγοντες** περιλαμβάνονται η προεκλαμψία, ο προδρομικός πλακούντας, η υμενώδης έκφυση του ομφαλίου λώρου και το σύνδρομο εμβρυο-εμβρυϊκής μετάγγισης μονοχοριακών διδύμων (TTTS)

Στους **μητρικούς παράγοντες** περιλαμβάνονται ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (BMI), ο διαβήτης, η ύπαρξη αυτοάνοσων ασθενειών, η ύπαρξη χρόνιων νόσων ή λοιμώξεων, η πλημμελής διατροφή, καθώς και οι συγγενείς ανωμαλίες διάπλασης της μήτρας.

Στους **εμβρυϊκούς παράγοντες** περιλαμβάνονται η πολύδυμος κύηση, οι ενδομήτριες λοιμώξεις, οι συγγενείς διαμαρτίες, καθώς και γενετικές ιδιομορφίες, όπως αριθμητικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδίες) ή εστιακά ελλείμματα ή αναδιπλασιασμοί.

Στους **φαρμακογενείς παράγοντες** περιλαμβάνονται η χορήγηση αντιεπιληπτικών σκευασμάτων, μεθοτρεξάτης, ηπαρίνης, καθώς και το κάπνισμα και η χρήση κοκαΐνης.

Η **FGR** σχετίζεται με σημαντικά αυξημένη περιγεννητική νοσηρότητα και θνησιμότητα λόγω προεκλαμψίας, υψηλότερου ποσοστού διενέργειας καισαρικών τομών, προωρότητας και υψηλότερου ποσοστού ενδομήτριων θανάτων.

Ένα μεγάλο ποσοστό εμβρύων με υπολειπόμενη ανάπτυξη παρουσιάζουν διαταραγμένη παθολογοανατομική εικόνα στον πλακούντα τους.

Η κυριότερη κλινική πρόκληση στην καθημερινή πράξη είναι η έγκαιρη ανίχνευση των περιπτώσεων εμβρυϊκής υπολειπόμενης ανάπτυξης. Είναι γνωστό από πολλαπλές μελέτες ότι η προγεννητική ανίχνευση των εμβρύων με FGR σχετίζεται με υποπενταπλάσια ποσοστά εμφάνισης ενδομήτριου θανάτου (6,2% έναντι 32%)<sup>42</sup>.

Η εκ των προτέρων ανίχνευση των περιπτώσεων που θα εμφανίσουν υπολειπόμενη ανάπτυξη μετά το μέσο της κύησης είναι δύσκολη, διότι ο όρος είναι περιγραφικός και τα έμβρυα αυτά αποτελούν μια ετερογενή ομάδα με ποικίλο υπόστρωμα. Υπολογίζεται ότι στο ¼ των περιπτώσεων ο πλακούντας είναι τελείως φυσιολογικός<sup>43</sup>. Στις περιπτώσεις όψιμης υπολειπόμενης εμβρυϊκής ανάπτυξης, ο πλακούντας εκτός από φυσιολογικός μπορεί να έχει στοιχεία από θρομβωτικά επεισόδια, λαχνίτιδα αγνώστου αιτιολογίας (villitis of uncertain etiology, VUE), ή να παρουσιάζει αγγειακές βλάβες που να σχετίζονται με αρχόμενη προεκλαμψία<sup>44,45</sup>.

Βασικός διαγνωστικός κορμός παραμένει η υπερηχογραφική μελέτη της βιομετρίας του εμβρύου και της δυναμικής της κυκλοφορίας με μελέτη φάσματος ντόπλερ.

Η πρόληψη της εμφάνισης FGR έχει βρεθεί από πολλαπλές μελέτες ότι σχετίζεται με φαρμακευτικές παρεμβάσεις στην πρώιμη φάση της πλακουντοποίησης. Ο ρόλος της προφυλακτικής χορήγησης ασπιρίνης (Salospir<sup>®</sup>) προ των 16 εβδομάδων κύησης έχει τεκμηριωθεί από πολλαπλές μελέτες<sup>46</sup>.

### 3.1.2. Προβλεπτικοί πρόωμοι βιοχημικοί δείκτες FGR

Υπάρχουν διάφοροι βιοχημικοί δείκτες στο πρώτο τρίμηνο που μπορεί να πιθανολογήσουν αυξημένο κίνδυνο FGR στο δεύτερο μισό της κύησης. Πρόκειται για ορμόνες ή πρωτεΐνες πλακουντιακής προέλευσης, αγγειογενετικούς ή ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες.

Ο παλαιότερος παράγοντας είναι η **PAPP-A (Pregnancy-Associated Plasma Protein A)** που παράγεται από την αναπτυσσόμενη τροφοβλάστη. Είναι μια μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη και ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των μεταλλοπρωτεϊνών που έχουν συνδεδεμένο ψευδάργυρο<sup>88</sup>. Η PAPP-A οδηγεί στην απελευθέρωση IGF (Insulin-like Growth Factor) μέσω της αποδόμησης της IGFBP4 (IGF-Binding Protein-4). Με τον τρόπο αυτό επιδρά επιταχυντικά και ενισχυτικά στην ανάπτυξη, την κυτταρική διαφοροποίηση και την τροφοβλαστική διείσδυση επί του φθαρτικού υποστρώματος της μήτρας. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στο συνδυαστικό έλεγχο πρώτου τριμήνου για την ανίχνευση ανευλοειδίων. Είναι γνωστό ότι οι χαμηλές τιμές της σχετίζονται με δυσμενές αποτέλεσμα της κύησης, ακόμη και σε ευλοειδικά έμβρυα<sup>44</sup>. Σχετίζεται με το μέγεθος της πλακουντιακής μάζας και με τον κίνδυνο εμφάνισης υπολειπόμενης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η PAPP-A από μόνη της έχει ποσοστό ανίχνευσης γύρω στα 13% με ποσοστό ψευδώς θετικών 10% και επομένως μόνη της έχει περιορισμένη χρησιμότητα<sup>47</sup>. Ωστόσο, η προσθήκη και επιπλέον παραγόντων όπως το ύψος, το βάρος της εγκύου, ο φυλετικός τύπος και ο αριθμός τοκετών μπορούν να αυξήσουν το ποσοστό ανίχνευσης FGR στο 29,5% για ποσοστό 10% ψευδώς θετικά<sup>48</sup>.

Η **χοριακή γοναδοτροπίνη** παράγεται από την συγκυτιοτροφοβλάστη και είναι ετεροδιμερές που αποτελείται από την άλφα (α) και βήτα (β) υπομονάδα. Η μέτρηση της

β-υπομονάδας (γνωστή ως **β-χοριακή γοναδοτροπίνη, β-hCG** εργαστηριακώς) της παρέχει την ειδικότητα στη μέτρηση που απαιτείται προκειμένου να αποφεύγονται ποσοτικά ανιχνευτικά σφάλματα λόγω της κοινής ομολογίας της α-υπομονάδας με άλλες ορμόνες (FSH, LH, TSH). Είναι γνωστό ότι χαμηλές τιμές σχετίζονται με δυσμενή έκβαση της κύησης<sup>49</sup>. Από μόνη της έχει περιορισμένη προβλεπτική αξία για την εμφάνιση FGR αργότερα στην κύηση.

Ο **πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας** (Placental Growth Factor, **PIGF**) σε χαμηλά επίπεδα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόωμης εμφάνισης προεκλαμψίας και σχετίζεται με πλακουντιακές βλάβες, χαμηλές τιμές PAPP-A πρώτου τριμήνου και υπολειπόμενη ανάπτυξη στο δεύτερο μισό της κύησης<sup>50</sup>. Ειδικά όσον αφορά την προεκλαμψία σχετίζεται και με αυξημένα επίπεδα του αγγειογενετικού παράγοντα sFlt1 (fms like tyrosine kinase 1).

Η **πλακουντιακή αυξητική ορμόνη** (**PGH**, Placental Growth Hormone) είναι προϊόν της συγκυτιοτροφοβλάστης και σχετίζεται με τον βαθμό τροφοβλαστικής διείσδυσης και τα επίπεδα του IGF-1. Οι χαμηλές τιμές PGH μπορεί να σχετίζονται με χαμηλό βάρος γέννησης, ωστόσο μελέτες έδειξαν ότι η κλινική χρησιμότητα του ως δείκτη πρώτου τριμήνου είναι περιορισμένη<sup>51</sup>.

Η **πλακουντιακή πρωτεΐνη 13** (PP13, Placental Protein 13) έχει μειωμένα επίπεδα σε κύησεις που εμφανίζουν στο μέλλον προεκλαμψία και υπολειπόμενη ανάπτυξη. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν μικρή κλινική χρησιμότητα λόγω χαμηλής ευαισθησίας<sup>52</sup>.

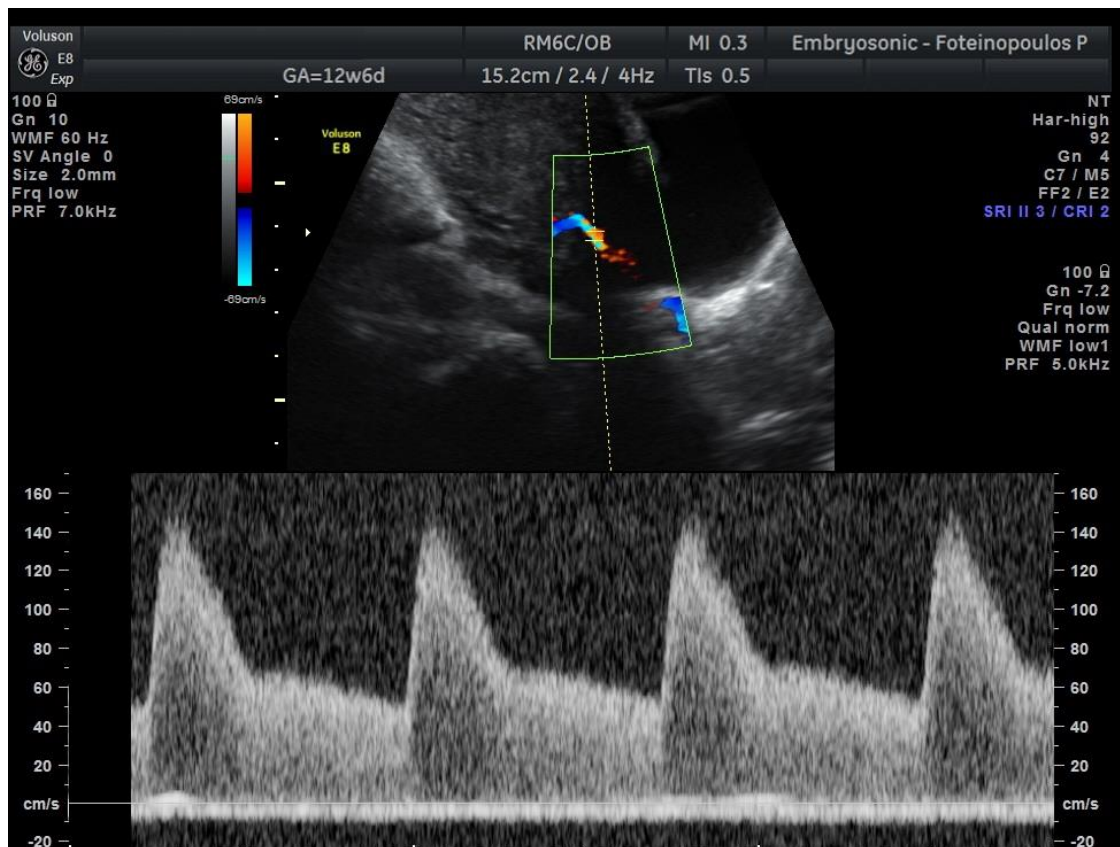
Η **ADAM 12** (A-Disintegrin and Metalloproteinase 12) εκφράζεται στον πλακούντα και σχετίζεται με υπολειπόμενη ανάπτυξη, χαμηλά επίπεδα PAPP-A και αποβολές πρώτου τριμήνου, αλλά η κλινική της χρησιμότητα είναι μικρή<sup>53</sup>.

Νεότερες έρευνες έδειξαν ότι στο πρώτο τρίμηνο οι μητέρες που θα εμφάνιζαν στο μέλλον υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη είχαν μια ιδιαίτερη μεταβολική υπογραφή στην ανάλυση των ούρων τους<sup>54</sup>. Ειδικότερα, είχαν μειωμένη αποβολή μυρμηγκικού, ακετοξικού και κιτρικού οξέος, γλυκίνης, τυροσίνης και τριμεθυλαμίνης.

### **3.1.3. Προβλεπτικοί υπερηχογραφικοί δείκτες πρώτου τριμήνου για την εμφάνιση FGR**

Η ύπαρξη αυξημένων αντιστάσεων στο μητρικό σκέλος της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας είναι έμμεσα υποδηλωτική ατελούς τροφοβλαστικής διεϊσδυσης στη μήτρα, τροφοβλαστικής υποάρδευσης και αυξημένης πιθανότητας για την εμφάνιση προεκλαμψίας και υπολειπόμενης εμβρυϊκής ανάπτυξης στο δεύτερο μισό της κύησης. Για τον σκοπό αυτό, στον συνδυασμένο υπερηχογραφικό- βιοχημικό έλεγχο που πραγματοποιείται στις 11+0 έως 13+6 εβδομάδες της κύησης περιλαμβάνεται και ο έλεγχος του φάσματος ντόπλερ των μητριάων αρτηριών (Εικόνα 1).

Η εξέταση πραγματοποιείται υπό αυστηρές προδιαγραφές που έχουν τεθεί από διάφορους ρυθμιστικούς φορείς και επιστημονικές εταιρείες. Οι κανόνες πρότυπης εκτέλεσης από το FMF (Fetal Medicine Foundation) στην Αγγλία είναι αυστηροί και ελέγχονται στην ετήσια επαναξιολόγηση (audit) και επαναπιστοποίηση των εξεταστών. Εμπίπτουν στον συνδυαστικό αλγόριθμο του FMF, που μαζί με βιοχημικούς παράγοντες (PAPP-A, β-hCG, PlGF) και στοιχεία του προφίλ του ιστορικού της μητέρας εξάγουν πιθανότητες για προεκλαμψία και υπολειπόμενη ανάπτυξη στο τρίτο τρίμηνο μέσω στατιστικής αναγωγής από το εσωτερικό πρότυπο δείγμα αναφοράς.



**Εικόνα 1:** Υπόδειγμα διενέργειας μελέτης ντόπλερ μητριαίων αρτηριών πρώτου τριμήνου

Σύμφωνα με τους κανόνες αυτούς, για την εκτέλεση ντόπλερ μητριαίων αρτηριών στο πρώτο τρίμηνο, η τοποθέτηση του παράθυρου δειγματοληψίας ντόπλερ πρέπει να γίνει στο επίπεδο του έσω τραχηλικού στομίου με γωνία προσβολής μικρότερη από 30 μοίρες, παράθυρο δειγματοληψίας στα 2 mm, μέγιστη ταχύτητα συστολικής ροής (PSV, Peak Systolic Velocity) πάνω από 60 cm/sec και μελέτη του δείκτη παλμικότητας (PI) ανάλυσης φάσματος σε τουλάχιστον 3 πανομοιότυπες ομοιόμορφες κυματομορφές. Στη συνέχεια οφείλει να αναλύεται ο μέσος όρος του δείκτη παλμικότητας από τις δύο μητριαίες αρτηρίες. Η ύπαρξη εντομής (notch) στο φάσμα ροής ανάμεσα στο κατερχόμενο σκέλος της συστολικής φάσης και της διαστολικής φάσης σχετίζεται με το ενδεχόμενο μελλοντικής πλακουντιακής ανεπάρκειας<sup>55</sup>.

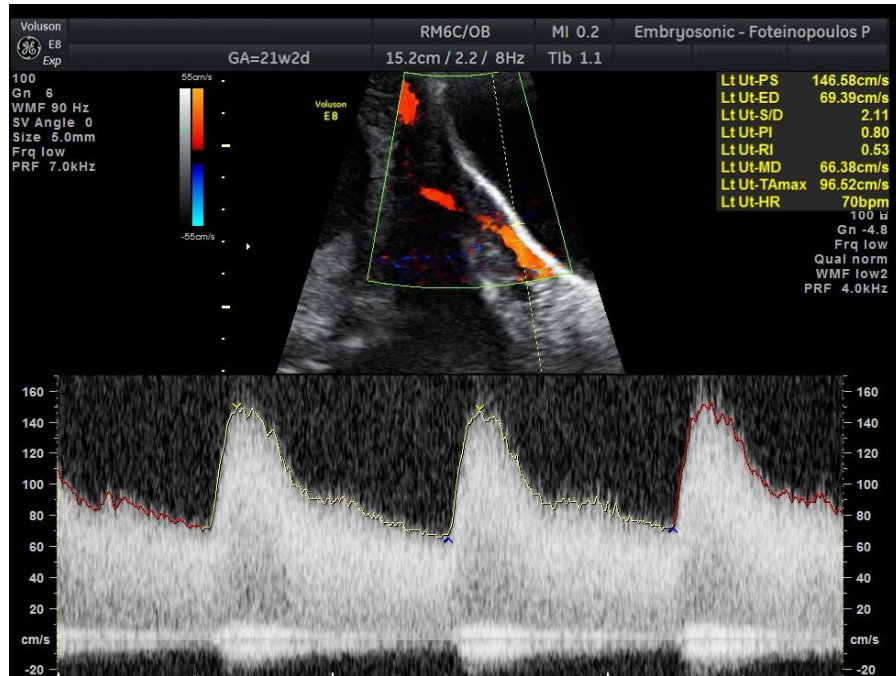


Μεθοδολογικά προβλήματα αξιολόγησης του μέσου όρου των PI των δύο μητριάων αρτηριών προκύπτουν σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις που υπάρχει τοπογραφική ασυμμετρία. Στην έκκεντρη πρόσφυση του πλακούντα ο δείκτης PI είναι αυξημένος στο απομακρυσμένο σκέλος και σχετίζεται με την μεγαλύτερη ενδομήτρια διαδρομή της εισερχόμενης κυκλοφορίας που οφείλει να καλυφθεί από την πλευρά εκείνη μέχρι τον τροφοβλαστικό ιστό. Επίσης, σε περιπτώσεις διαφραγματοφόρου μήτρας με αποκλεισμένο τον ένα ημιθάλαμο, οι σύστοιχη τιμή PI είναι λίαν αυξημένη και αντιστοιχεί σε προσαρμοστικό λειτουργικό αποκλεισμό της μητρικής κυκλοφορίας πλησίον του κενού ημιθαλάμου. Στις περιπτώσεις αυτές, η ιδιαίτερα αυξημένη τιμή του PI της μιας μητριάιας αρτηρίας συμπαρασύρει ψευδώς τον μέσο όρο των PI των μητριάων αρτηριών προς τα πάνω.

### **3.1.4. Υπερηχογραφικοί δείκτες πρόβλεψης FGR δευτέρου τριμήνου**

Το δεύτερο τρίμηνο ορίζεται ως το χρονικό διάστημα ανάμεσα στην ηλικία κύησης των 16+0 και 24+0 εβδομάδων.

Οι σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας υφίσταται κατά το πρώτο και δεύτερο τρίμηνο της κύησης μια φυσιολογική διαδικασία μετασχηματισμού, κατά τον οποίο τροφοβλαστικά κύτταρα μεταναστεύουν και ενσωματώνονται στο τοίχωμά τους με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε αγγεία με ευρύτερο αυλό και χαμηλότερες πιέσεις κατά τη ροή του αίματος εντός τους. Αδυναμία πραγματοποίησης αυτού του μετασχηματισμού έχει ως αποτέλεσμα να παραμένουν αυξημένες οι αντιστάσεις στη μελέτη του φάσματος ντόπλερ στις μητριάιες αρτηρίες (Εικόνα 2) <sup>56</sup>.



*Εικόνα 2: Μελέτη ροών ντόπλερ στις μητριαίες αρτηρίες στο δεύτερο τρίμηνο*

Μελέτες της προβλεπτικής αξίας της μελέτης ντόπλερ των μητριαίων αρτηριών στο δεύτερο τρίμηνο έδειξαν ετερογένεια αποτελεσμάτων. Ήδη από τις μελέτες των Campbell et al το 1986 και μέχρι τη δεκαετία του 2000 το εύρος της ευαισθησίας κυμαίνονταν από 6% έως και 67%, ενώ το εύρος της ειδικότητας ήταν από 80% έως και 96% με εξαίρεση την πρώτη εκείνη μελέτη που ήταν 65%<sup>57</sup>. Στις μελέτες αυτές σαν παθολογικές τιμές είχαν οριστεί τιμές στα PI και RI >95<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση (RI > 0,57-0,58) ή η αμφοτερόπλευρη παρουσία εντομών (notching).

### **3.1.5. Βιοχημικοί προβλεπτικοί δείκτες FGR δευτέρου τριμήνου**

Παράλληλα με την μελέτη διαφόρων βιοχημικών δεικτών δευτέρου τριμήνου για την ανίχνευση ανευπλοειδιών έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν διάφοροι βιοχημικοί δείκτες με την εμφάνιση FGR<sup>58,59</sup>.

Δοκιμάστηκε πλήθος παραγόντων όπως η α-FP, hHCG, η οιστραδιόλη, το PAPP-A, η ινχιβίνη A, ο PIGF, ο VEGF, η sFLT-1, η ενδογλίνη, η ομοκυστεΐνη, ο sVCAM-1, ο sICAM-1, η 8-OHdG, η IGFBP-1, SP1, η ισοπροστανη, η φιμπρονεκτίνη και το τριπλό τεστ (α-FP, b-hCG, uE3). Είχε τεθεί ως στόχος ώστε ο παράγοντας να είναι κλινικά εφαρμόσιμος να ικανοποιείται το κριτήριο λόγου θετικής πιθανοφάνειας >10. Ο μόνος παράγοντας που έφτασε κοντά στον στόχο του ήταν η α-FP με μια τιμή λόγου πιθανοφάνειας για FGR 8,80 όταν οι τιμές της ήταν <10<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση. Ο μόνος παράγοντας που ξεπέρασε τον στόχο αυτό ήταν η φιμπρονεκτίνη με λόγο θετικής πιθανοφάνειας γύρω στο 13, αλλά με απογοητευτική ευαισθησία 57%, παρά την καλή ειδικότητα του 96%<sup>59</sup>.

Ο συνδυασμός βιοχημικών δεικτών δευτέρου τριμήνου με υπερηχογραφικό έλεγχο ντόπλερ των μητριάων αρτηριών δεν απέδωσε τα αναμενόμενα. Η θετική προγνωστική αξία της ύπαρξης εντομών στα φάσματα ντόπλερ των μητριάων αρτηριών στο δεύτερο τρίμηνο βρέθηκε να έχει θετική προγνωστική αξία της τάξεως του 26% και η προσθήκη βιοχημικών παραμέτρων (AFP > 1,5 MoM, HCG < 0,5 MoM) την βελτίωσε ελάχιστα, στο 42-50 %<sup>60</sup>.

Σε μετα-αναλύσεις του 2008 φάνηκε ακολούθως ότι η χρήση του υπερηχογραφήματος μετά τις 24 εβδομάδες κύησης, τόσο όσον αφορά τη βιομετρία, όσο και τη χρήση ντόπλερ, δεν βελτίωσε την ανίχνευση εμβρύων FGR<sup>61</sup>. Η μελέτη POP του 2015 έδειξε ότι το ντόπλερ τρίτου τριμήνου μεταξύ 28 και 36 εβδομάδων είχε υψηλότερο ποσοστό ανίχνευσης FGR (57%) εφόσον γίνονταν επί ενδείξεων του ιστορικού, σε σχέση με τον καθολικό έλεγχο που είχε ποσοστό ανίχνευσης περί το 20%<sup>62</sup>.

### 3.1.6. Αιμοδυναμική κατάσταση FGR εμβρύων

Κοινός παθοφυσιολογικός παρονομαστής στην γένεση της υπολειπόμενης εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι η διαταραχή της λειτουργίας του πλακούντα. Αυτή επιδρά μέσω του ομφαλίου λώρου και στο έμβρυο, ώστε να πάσχει τροφικά και αιμοδυναμικά συνολικά η εμβρυοπλακουντιακή μονάδα με μειωμένη παροχή αίματος και χρόνια υποξαιμία στο έμβρυο.

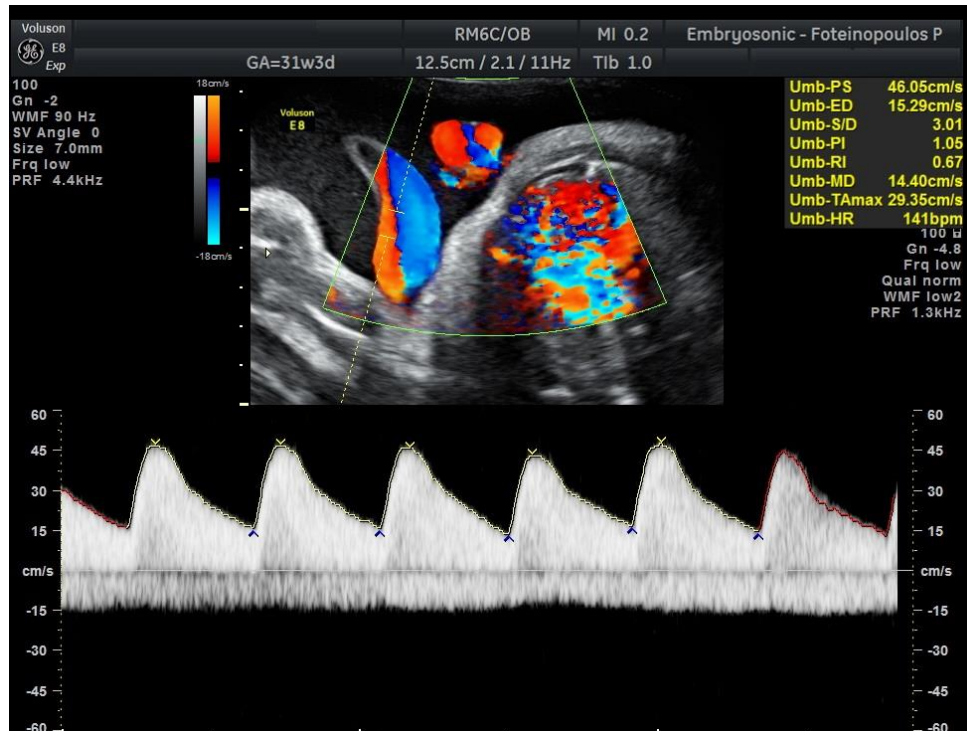
Θεωρείται ότι στην πρόιμη και στην όσιμη εμβρυϊκή υπολειπόμενη ανάπτυξη υπάρχει διαφορετική εικόνα διαπιστούμενων εκδηλώσεων λόγω της διαφορετικής κλίμακας μάζας εμβρύου που απαιτεί διαφορετικές αιμοδυναμικές και τροφικές προσαρμογές.

Στην πρόιμη εμβρυϊκή υπολειπόμενη ανάπτυξη πραγματοποιούνται μια σειρά από προσαρμοστικές αιμοδυναμικές αλλαγές που σκοπό έχουν να προτεραιοποιήσουν τις αιματικές ροές προς όργανα που απαιτούν απρόσκοπτη αιματική ροή και πλούσια φορτία γλυκόζης. Τα όργανα αυτά κατά κύριο λόγο είναι ο εγκέφαλος, τα επινεφρίδια και το μυοκάρδιο όπου η παραγωγή ενέργειας στηρίζεται κυρίως στην γλυκόλυση του κυτταροπλάσματος και όχι στην οξειδωτική φωσφορυλίωση των μιτοχονδρίων. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως « κεντροποίηση της κυκλοφορίας», βιβλιογραφικά γνωστό ως “brain-sparing effect”.

Οι μελέτες ροών ντόπλερ στο έμβρυο με πρόιμη εμβρυϊκή υπολειπόμενη ανάπτυξη αποτυπώνουν αυτό το φαινόμενο με μια προοδευτική μεταβολή των κυματομορφών του φάσματος ροών στην ομφαλική και μέση εγκεφαλική αρτηρία.

Οι ομφαλικές αρτηρίες είναι δύο και θεωρείται η μελέτη εκάστης αυτών περίπου ισοδύναμη. Εκφύονται περίπου από τον ομφάλιο λώρο, λαμβάνουν αίμα από τις έσω λαγόνιες του εμβρύου και πορεύονται μέχρι τον πλακούντα μεταφέροντας αποξυγονωμένο

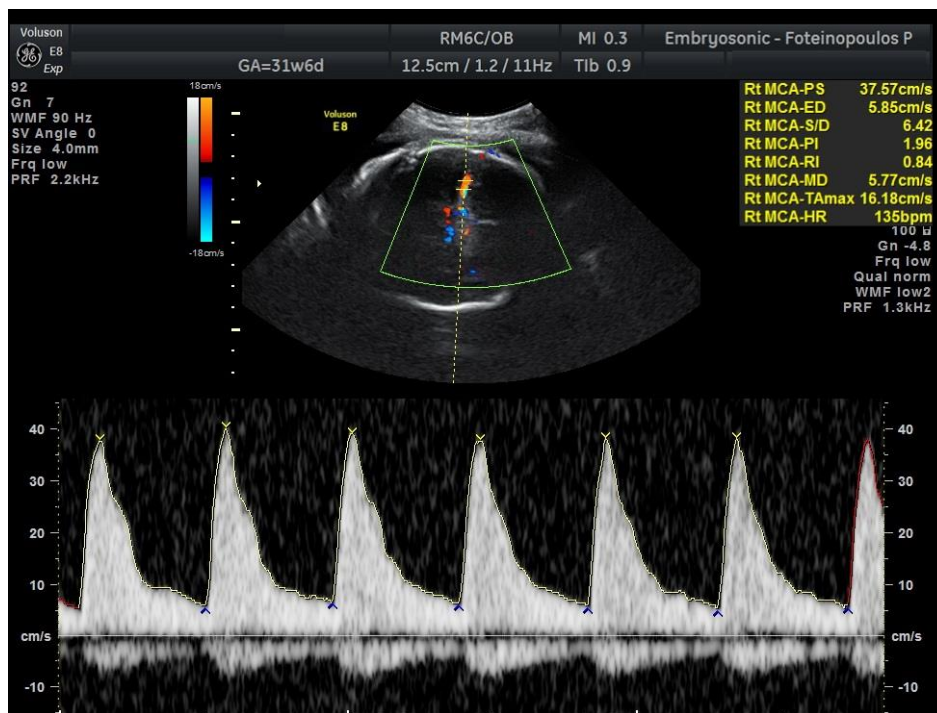
αίμα του εμβρύου με κυματομορφή περιφερικού αρτηριακού αγγείου με οδηγό το σφυγμικό κύμα που δημιουργεί η παλλόμενη εμβρυϊκή καρδιά. Η κυματομορφή αυτή έχει συνήθως πριονωτό σχήμα με την μέγιστη συστολική ροή ίση με το διπλάσιο της τελοδιαστολικής (Εικόνα 3).



*Εικόνα 3: Παράδειγμα φυσιολογικού φάσματος ντόπλερ ομφαλικής αρτηρίας στο τρίτο τρίμηνο*

Η τελοδιαστολική ροή παριστάνει το αδρανειακό σκέλος της αρτηριακής κυκλοφορίας και αποτυπώνει τη συνεχιζόμενη προς τα πρόσω ροή λόγω αδράνειας, παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει φέρουσα δύναμη πίεσης που να κινεί τα στοιχεία της κυκλοφορίας. Το σκέλος αυτό είναι και το πιο ευαίσθητο σε οποιαδήποτε δυναμική παρεμπόδισης της κυκλοφορίας.

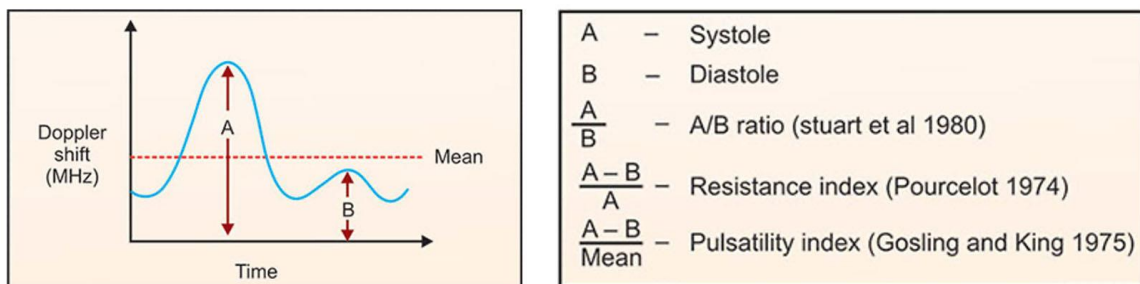
Οι μέσες εγκεφαλικές αρτηρίες είναι δύο στο έμβρυο και μελετάται συνήθως εκείνη που βρίσκεται στο εγγύτερο προς τον υπερηχογραφικό ηχοβολέα ημισφαίριο του εγκεφάλου για λόγους ευκολίας. Το χαρακτηριστικό του φάσματος ροής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας είναι ο οξυκόρυφος χαρακτήρας του, με ταχεία άνοδο, υψηλή μέγιστη συστολική ταχύτητα (PSV, Peak Systolic Velocity) και ταχεία κάθοδο που συνοδεύεται από χαμηλή τελοδιαστολική ροή (Εικόνα 4).



*Εικόνα 4: Υπόδειγμα φυσιολογικού φάσματος ντόπλερ της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας στο τρίτο τρίμηνο*

Επομένως, η πρόωμη υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη εκτός από επιπέδωση των βιομετρικών παραμέτρων που αφορούν την κοιλιακή περιφέρεια (AC) και το μήκος του μηριαίου (FL) που επιπεδώνουν την πολυωνυμική εκτίμηση βάρους, μεταβάλλει παράλληλα τις κυματομορφές στην ομφαλική και μέση εγκεφαλική αρτηρία του εμβρύου.

Η τελοδιαστολή ροή (EDF, End-Diastolic Flow) στην ομφαλική αρτηρία μειώνεται προϊόντος του χρόνου με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι δείκτες παλμικότητας (Pulsatility Index, PI) και οι δείκτες αντιστάσεων (Resistance Index, RI). Η μείωση της τελοδιαστολικής ροής αντανακλά την αυξημένη παρεμπόδιση της αδρανειακής ροής του αίματος προς τον πλακούντα ως συνέπεια της αλλοίωσης της μικροαρχιτεκτονικής του. Η τελοδιαστολική ροή όταν μειωθεί αρκετά δεν απεικονίζεται πλέον (απούσα τελοδιαστολική ροή, Absent end-Diastolic Flow, AEDF), και καθώς η κατάσταση επιδεινώνεται μπορεί να εμφανιστεί και αντιστραμμένη ροή κατά το τελοδιαστολικό σκέλος (REDF, Reversed End-Diastolic Flow)<sup>63</sup>.



**Εικόνα 5:** Ορισμοί δείκτη παλμικότητας (PI) και δείκτη αντιστάσεων (RI/)

Παράλληλα με τις μεταβολές αυτές παρατηρείται αγγειοδιαστολή στο σκέλος της αρτηριακής κοίτης των αγγείων του εγκεφάλου. Στο φάσμα ροών ντόπλερ στην μέση εγκεφαλική αρτηρία παρατηρείται πτώση της μέγιστης συστολικής ταχύτητας (PSV) και αύξηση της τελοδιαστολικής ταχύτητας. Οι δείκτες PI, RI που προαναφέρθηκαν παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές.

Υπενθυμίζεται ότι εννοιολογικά, τόσο ο δείκτης παλμικότητας (PI), όσο και ο δείκτης αντιστάσεων (RI) εννοιολογικά βρίσκονται πολύ κοντά (Εικόνα 5). Ο δείκτης RI είναι

παίρνει τιμές έως τη μονάδα στις περιπτώσεις απουσίας τελοδιαστολικής ροής, ενώ ο δείκτης PI δεν έχει τέτοιους περιορισμούς και μπορεί να λάβει υψηλότερες τιμές, αφού στον παρονομαστή του έχει στοιχείο που προκύπτει από εμβαδική ολοκλήρωση στην συνάρτηση άθροισης ροών ως προς το χρόνο (φάσμα ντόπλερ).

Οπτικοποιημένα, κοιτώντας κανείς τα φάσματα ντόπλερ στην ομφαλική και μέση εγκεφαλική αρτηρία ενός εμβρύου με πρόωμη υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη και “brain-sparing effect” έχει την αίσθηση ότι υπάρχει περίπου εναλλαγή μορφών ως προς τις φυσιολογικές απεικονίσεις. Το μαθηματικό ισοδύναμο αυτής της παρατήρησης είναι ο εγκεφαλοπλακουντιακός λόγος (CPR, CerebroPlacental Ratio), που ορίζεται ως το πηλίκο των δεικτών των δεικτών παλμικότητας (PI) σε μέση εγκεφαλική και ομφαλική αρτηρία (Εικόνα 6) <sup>64</sup>. Οι τιμές του CPR μειώνονται καθώς επιδεινώνεται η ανακατανομή της κυκλοφορίας ενός FGR εμβρύου.



**Εικόνα 6:** Πρότυπες καμπύλες του δείκτη παλμικότητας (PI) στην ομφαλική (UA) και την μέση εγκεφαλική αρτηρία (MCA) προϊόντος του χρόνου. Η πράσινη καμπύλη παριστάνει την 50<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση, ενώ οι ακρότατες κόκκινες καμπύλες παριστάνουν την 5<sup>η</sup> και 95<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση των τιμών.



Η προοδευτική υποξαιμία του FGR εμβρύου επιδεινώνει την καρδιακή λειτουργία με αποτέλεσμα όψιμα να εμφανίζονται και διαταραχές στο φλεβικό σκέλος. Τυπικό φλεβικό αγγείο στο έμβρυο είναι ο φλεβώδης πόρος (Ductus Venosus, DV), του οποίου το φάσμα ντόπλερ έχει μελετηθεί εκτεταμένα.

Ο φλεβώδης πόρος αποφράσσεται μετά τη γέννηση. Είναι ένα παρακαμπτήριο φλεβικό αγγείο σε σχήμα τρομπέτας που σε πλήρη εφαρμογή του νόμου του Bernoulli επιτυγχάνει μια τεχνητή επιτάχυνση της οξυγονωμένης φλεβικής αιματικής στήλης που περιέχει. Η στήλη αυτή, μέσω του φλεβώδους πόρου παρακάμπτει το ήπαρ και κατευθύνεται στο δεξιο-οπίσθιο τοίχωμα της κάτω κοίλης φλέβας και προς τον δεξιό κόλπο, ώστε στη συνέχεια μέσω διαμητικής ροής και εκμεταλλευόμενη τη χωροδιάταξη της crista dividens να περάσει εκλεκτικά το ωοειδές τρήμα.



*Εικόνα 7: Ανάλυση φάσματος ντόπλερ του φλεβώδους πόρου στο πρώτο τρίμηνο*

Στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης δια του φλεβώδους πόρου διέρχεται το 30% και 18% της εισερχόμενης ροής στο ήπαρ δια της ομφαλικής φλέβας <sup>65</sup>.

Η φυσιολογική κυματομορφή του φλεβώδους πόρου είναι τρικόρυφη (Εικόνα 7). Οι κορυφές S και D αντιστοιχούν στην συστολή και διαστολή των κοιλιών και η μικρή κορυφή α αντιστοιχεί στην συστολή των κόλπων της καρδιάς. Οι κορυφές αυτές απεικονίζουν έμμεσα εισροφητικές προωστικές πιέσεις στο φλεβικό σκέλος, που προερχόμενες από την δεξιά καρδιά ωθούν αυτή την φλεβική αιματική στήλη σε πρόσω κίνηση.

Καθώς το “brain-sparing effect” σε ένα πρώιμο FGR έμβρυο επιδεινώνεται, το μυοκάρδιο επιβαρύνεται και εμφανίζει υψηλότερες ανάγκες σε οξυγόνο και υποστρώματα, καθώς έχει να επιτελέσει υψηλότερο έργο λόγω αύξησης του μεταφορτίου. Σε επίπεδο ντόπλερ το κύμα α στην κυματομορφή του φλεβώδους πόρου μειώνεται, εξαφανίζεται και στο τέλος αντιστρέφεται. Πρόκειται για εξαιρετικά σοβαρή αιμοδυναμική διαταραχή του εμβρύου που παριστάνει προθανάτια κατάσταση, λίαν σημαντική καρδιακή απορρύθμιση και απαιτεί άμεσο διασωστικό τερματισμό της κύησης με επείγουσα καισαρική τομή. Σε επίπεδο δεικτών ντόπλερ παρατηρείται προοδευτική αύξηση του δείκτη παλμικότητας των φλεβών (PIV, Pulsatility Index for Veins).

Ταυτόχρονα, στην κατάσταση αυτή έχουν αλλοιωθεί και οι κυματομορφές ντόπλερ στις ομφαλικές φλέβες, όπου αντί για την συνήθη συνεχή ροή εμφανίζονται διφασικές ή τριφασικές καμπύλες ροής <sup>66</sup>. Το στοιχείο αυτό είναι επίσης ενδεικτικό καρδιακής απορρύθμισης και αυξημένων κεντρικών φλεβικών πιέσεων. Το καρδιοτοκογράφημα ηρεμίας, εξάλλου, είναι παθολογικό με μειωμένη μεταβλητότητα σε τέτοιες καταστάσεις.

Ένα συμπληρωματικό στοιχείο που αφορά τον φλεβώδη πόρο είναι το γεγονός ότι μπορεί κάτω από εξαιρετικά δυσμενείς για το έμβρυο συνθήκες να μεταβάλει το βαθμό εκτροπής της ενδοηπατικής αιματικής ροής έως και 90% <sup>67</sup>. Επίσης, η τροφική κυκλοφορία του ήπατος υπό φυσιολογικές συνθήκες πραγματοποιείται κατά 80% από την ομφαλική φλέβα και 20% από την πυλαία φλέβα με αίμα υψηλής οξυγόνωσης προερχόμενο απευθείας από τον πλακούντα. Σε συνθήκες ανακατανομής της κυκλοφορίας εννοείται η αιματική τροφοδοσία του ήπατος από τις λιγότερο οξυγονωμένες ηπατικές αρτηρίες που ανήκουν στο αρτηριακό σκέλος της κατιούσας αορτής και την πυλαία φλέβα. Με βαθμό εκτροπής της εισερχόμενης κυκλοφορίας από την ομφαλική φλέβα κατά 90% στον φλεβώδη πόρο και 10% μόλις για τον αριστερό ηπατικό λοβό, δεν υπάρχει καθόλου άμεση εισερχόμενη ροή οξυγονωμένου αίματος για τον δεξιό λοβό του ήπατος. Η συνέπεια είναι η πλημμυλής αποθήκευση ενεργειακών υποστρωμάτων στο ήπαρ και η μείωση του όγκου του και συνεπώς και της περιφέρειας της κοιλιάς του εμβρύου (AC), όπως διαπιστώνεται και υπερηχογραφικά <sup>68</sup>. Επίσης, υπερηχογραφικά απεικονίζεται λιγότερη αγγείωση στον δεξιό λοβό του ήπατος. Στο σημείο αυτό ενδεχομένως υπεισέρχεται και ο μηχανισμός των επιγενετικών αλλαγών του λιτού φαινότυπου κατά Barker που αναφέρεται παρακάτω.

Επίσης, σε όψιμο στάδιο απορρύθμισης χάνεται η αγγειοδιαστολή στα αγγεία του εγκεφάλου. Η αλλαγή της κυματομορφής της μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας πλέον στο στάδιο αυτό αποτελεί κακό προγνωστικό παράγοντα και δεν θα πρέπει να εκλαμβάνεται ως στοιχείο βελτίωσης <sup>69</sup>.

## **3.2. Υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη και επιδημιολογικές συσχετίσεις**

### **3.2.1. Επιδημιολογική σχέση χαμηλού βάρους γέννησης και καρδιαγγειακής νόσου και αρτηριακής υπέρτασης. Η Υπόθεση Barker**

Το 1934 οι Kermack et al διατύπωσαν για πρώτη φορά την υπόθεση ότι πρώιμα γεγονότα της ζωής επιδρούν στο μέλλον <sup>1,2</sup>. Αντιστρόφως, η βελτίωση του βιωτικού επιπέδου κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας οδηγούσε σε μείωση όλων των δεικτών θνησιμότητας.

Οι Forsdahl et al, το 1977 διατύπωσαν την παρατήρηση ότι οι συνθήκες ένδειας στην πρώιμη ζωή σε συνδυασμό με συνθήκες αφθονίας στην κατοπινή ζωή οδηγούσαν σε συχνότερη εμφάνιση αθηρωματικής νόσου <sup>3</sup>.

Το 1986, στις μελέτες τους οι Barker, Osmond et al, μελέτησαν το παράδοξο της εμφάνισης υψηλότερου επιπολασμού ισχαιμικής καρδιακής νόσου σε περιοχές της Αγγλίας και της Ουαλίας με χαμηλότερο βιωτικό επίπεδο. Γεωγραφικές συγκρίσεις περιοχών όσον αφορά την βρεφική θνησιμότητά τους το χρονικό διάστημα 1921-1925 και της αντίστοιχης εμφάνισης ισχαιμικής καρδιακής νόσου το διάστημα 1968-1978 έδειξαν θετική συσχέτιση σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και τα φύλα. Διατυπώθηκε τότε η τολμηρή υπόθεση ότι οι διακυμάνσεις στην διατροφή κατά την πρώιμη ζωή μπορούν να έχουν επιδράσεις στην όψιμη ζωή <sup>4</sup>.

Τρία χρόνια αργότερα, το 1989 αναγνωρίστηκε από τους ίδιους ερευνητές ότι το χαμηλό βάρος γέννησης σχετιζόταν με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης αρτηριακής υπέρτασης και καρδιαγγειακής νόσου στην ενήλικη ζωή. Η παρατήρηση αυτή γενίκευε

την προηγούμενη και αφορούσε τροφικά γεγονότα που συμβαίνουν εντός της μήτρας. Η επιδημιολογική αυτή παρατήρηση είναι γνωστή ως υπόθεση Barker <sup>5</sup>.

Ένα χρόνο αργότερα, ο Barker παρατήρησε ότι υπήρχε αυξημένη αρτηριακή πίεση σε άνδρες και γυναίκες που υπήρξαν έμβρυα με μικρό βάρος γέννησης και δυσανάλογα μεγάλο πλακούντα. Οι συγγραφείς διατύπωσαν την προωθημένη υπόθεση ότι η διαφορά της αναμενόμενης αναλογίας μεταξύ εμβρυϊκής και πλακουντιακής μάζας ήταν υποδηλωτική κάποιου είδους κυκλοφορικής προσαρμογής του εμβρύου που επηρέαζε τις αρτηριακές δομές της παιδικής ηλικίας και οδηγούσε σε βάθος χρόνου σε αρτηριακή υπέρταση κατά την όψιμη ενήλικη ζωή <sup>6</sup>.

Μια παράλληλη σουηδική μελέτη το 1987 των Gensser et al, επιβεβαίωσε τα ίδια ευρήματα για την διαστολική πίεση <sup>7</sup>.

Δέκα χρόνια αργότερα, η Φινλανδική ομάδα των Eriksson et al, σε σειρά μελετών τα έτη 1999, 2000, 2001, όπου συμμετείχαν ως συγγραφείς οι Barker και Osmond, παρατήρησε σε μεγάλες σειρές ενηλίκων ότι η στεφανιαία νόσος ήταν εξαιρετικά συχνή σε άτομα που είχαν χαμηλό βάρος γέννησης, αλλά που το αναπλήρωσαν γρήγορα και τουλάχιστον πριν το έβδομο έτος της ζωής <sup>8,9,10</sup>.

### **3.2.2. Επιδημιολογική σχέση χαμηλού βάρους γέννησης και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και παχυσαρκίας**

Παράλληλα με τις επιδημιολογικές μελέτες συσχέτισης του χαμηλού βάρους γέννησης με τις καρδιαγγειακές νόσους, οι Hales et al, το 1992 έδειξαν συσχέτιση ανάμεσα στο χαμηλό βάρος γέννησης και την ύπαρξη διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη σε άνδρες 64 ετών <sup>11</sup>. Στο άκρο των παρατηρήσεων, το πολύ χαμηλό βάρος γέννησης εξαπλασίαζε την πιθανότητα εμφάνισης διαβήτη τύπου II στην ενήλικη ζωή. Η σχετική δημοσίευση

εισήγαγε την έννοια της επίδρασης του «λιτού φαινότυπου» γέννησης στην μετέπειτα νοσηρότητα (“Thrifty-phenotype effect”) <sup>12</sup>.

Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η έλλειψη τροφικών υποστρωμάτων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από μεταβολικές προσαρμογές που εξυπηρετούν καλύτερα την βιωσιμότητα του οργανισμού όσο η παροχή θρεπτικών υποστρωμάτων βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα. Εάν μελλοντικά η παροχή θρεπτικών υποστρωμάτων αυξηθεί, ο μηχανισμός αυτός μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση μεταβολικών νοσημάτων. Τα ευρήματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές <sup>13</sup>.

Σύμφωνα με την υπόθεση των Hales και Barker, η υποθρεψία κατά την εμβρυϊκή ζωή μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη ανάπτυξη των β-νησιδίων του παγκρέατος με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραγμένου μεταβολισμού της γλυκόζης κατά την ενήλικη ζωή.

Ως γνωστόν, η έκκριση ινσουλίνης από τα β-νησίδια του παγκρέατος ακολουθεί δύο φάσεις μετά την αύξηση της γλυκόζης. Η πρώτη ταχεία φάση έκκρισης ινσουλίνης είναι βραχεία, ενώ η δεύτερη είναι παρατεταμένη. Η διαταραγμένη ανοχή στην γλυκόζη αφορά την κατάργηση του πρώτου (ταχέως) σκέλους έκκρισης της ινσουλίνης. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II αφορά επιπλέον και μειωμένη έκκριση ινσουλίνης κατά το δεύτερο σκέλος.

Η διαταραγμένη ανοχή στην γλυκόζη είναι συχνή σε παχύσαρκους μεσήλικες. Ο ίδιος ο λιπώδης ιστός παράγει μια σειρά από λιποκυττοκίνες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Ωστόσο, βρέθηκε από τους Ong et al, ότι το φαινόμενο είναι πιο έντονο σε άτομα που είχαν χαμηλό βάρος γέννησης, γεγονός που υποδηλώνει έναν επιπλέον μηχανισμό που επιβεβαιώνει την υπόθεση του Barker <sup>14</sup>.

### **3.2.3. Επιδημιολογική σχέση χαμηλού βάρους γέννησης και μεταβολικού συνδρόμου**

Η επιδημιολογική συσχέτιση του χαμηλού βάρους γέννησης με την εμφάνιση σε μεσήλικες αρτηριακής υπέρτασης, διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη, αντοχής στην ινσουλίνη, υπερλιπιδαιμίας και παχυσαρκίας, οδήγησαν στην υπόθεση της επαγωγής από αυτό του μεταβολικού συνδρόμου <sup>15</sup>. Το μεταβολικό σύνδρομο ευθύνεται ιδιαίτερα για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου.

### **3.2.4.Πιθανοί αιτιοπαθογενετικοί μηχανισμοί**

Η υπόθεση του «λιτού φαινοτύπου» που διατυπώθηκε από τον Barker, όπως προαναφέρθηκε αποτέλεσε μια αναδρομική ερμηνεία των επιδημιολογικών παρατηρήσεων.

Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η υποθρεψία ενός εμβρύου κατά την ενδομήτρια ζωή μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από προσαρμοστικές απαντήσεις που αλλάζουν τον μεταβολικό προγραμματισμό. Αυτό συμβαίνει, ώστε ο οργανισμός να χειρίζεται αποτελεσματικότερα και να αποθηκεύει (για μελλοντικές ανάγκες) τα ελάχιστα θρεπτικά και δομικά υποστρώματα που διαθέτει, αλλάζοντας τις οργανικές του προτεραιότητες. Η τελεολογική αυτή προσέγγιση υποστηρίζει ότι αυτός ο μηχανισμός είναι εξελκτικά πλεονεκτικότερος και εξασφαλίζει αυξημένη επιβίωση σε περιβάλλοντα όπου η διατροφή είναι πλημμελής. Σε μελέτες σε υποσαχάριους πληθυσμούς όπου η έλλειψη τροφής και τα χαμηλά βάρη γέννησης είναι γενικευμένο φαινόμενο έχουν βρεθεί μικρά ποσοστά σακχαρώδους διαβήτη μεσηλικών <sup>16</sup>.

Ο Ολλανδικός λιμός του 1944-1945 και ο Κινέζικος λιμός της δεκαετίας του 1950 μελετήθηκαν αντίστοιχα από τους Ravelli et al και τους Li et al, που κατέληξαν σε

παρόμοια συμπεράσματα ως προς την εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου σε μεσήλικες στην σύγχρονη εποχή<sup>17,18</sup>.

Η νεότερη τάση, η οποία διατυπώθηκε από τους Archer et al, κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσης μελέτης, βρίσκεται στην «υπόθεση των μητρικών προμηθειών» (maternal resources hypothesis, MRH)<sup>19</sup>. Σύμφωνα με αυτήν, τα παχύτερα άτομα διαθέτουν μεγαλύτερο αριθμό λιποκυττάρων και αποθηκεύουν μεταγενετικά μεγαλύτερες ποσότητες λιπαρών οξέων σε αντίθεση με τα λεπτόσωμα άτομα που προχωρούν σε οξειδωτικό καταβολισμό και άμεση χρησιμοποίησή τους<sup>20,21</sup>.

Αναφορικά με το πάγκρεας και τον αριθμό των παγκρεατικών νησιδίων, έχουν προκύψει τα τελευταία χρόνια ενδιαφέροντα πειραματικά και επιδημιολογικά δεδομένα. Η χορήγηση διαίτας χαμηλής σε πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μειώνει τη δραστηριότητα της πλακουντιακής 11β-υδροξύ στεροειδικής αφυδρογονάσης τύπου 2 με αποτέλεσμα την μειωμένη απενεργοποίηση της κορτιζόλης<sup>22,23</sup> (Bertram et al. 2001; Ostreicher et al. 2010). Η κορτιζόλη με τη σειρά της μπορεί να μειώσει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Pdx1 στο εμβρυϊκό πάγκρεας με αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση και διαφοροποίηση των β-νησιδίων και την μειωμένη παραγωγή ινσουλίνης, τόσο όσον αφορά τη βασική έκκριση, όσο και την επαγόμενη από χορήγηση γλυκόζης, λευκίνης ή αργινίνης<sup>24</sup>. Επίσης, βρέθηκε στις περιπτώσεις αυτές μειωμένη έκφραση του παράγοντα IGF-II που είναι γνωστός αντι-αποπτωτικός παράγοντας των β-νησιδίων<sup>25</sup>. Βρέθηκε ότι ενήλικες με διαβήτη τύπου II που επιβίωσαν από τον Ολλανδικό Λιμό του 1944 είχαν μειωμένη μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του IGF-II<sup>26</sup>.

Κάποια ερευνητικά δεδομένα παροδικά κλόνισαν κάποια στοιχεία της υπόθεσης Barker: Στην υπολειπόμενη εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι μειωμένες οι συγκεντρώσεις GH και



IGF-I σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, αλλά δεν είναι μειωμένες οι συγκεντρώσεις της IGF –II 27,28 (Lassarre et al. 1991; Mirlesse et al. 1993). Αυτό εξηγεί ότι τα σημερινά IUGR δεν είναι εξαιτίας του λιμού και επομένως είναι εν μέρει αυθαίρετη η γενίκευση με εκείνες τις συνθήκες και τις σημερινές, ως προς τις επιδράσεις των IUGR στην έκφραση γονιδίων. Ωστόσο, από ανάλυση προϊόντων μεταβολισμού ούρων (metabolomics) νέο-γνών, και εμβρυϊκού αίματος σε έμβρυα σε κυήσεις με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη έχουν προκύψει ενδιαφέροντα συμπεράσματα που επιβεβαιώνουν την ύπαρξη επιγενε-τικών επιδράσεων συμβατών με την υπόθεση του Barker<sup>29,30</sup>.

### 3.3. Επιγενετικοί μηχανισμοί

Η έκφραση των γονιδίων μπορεί να διαφοροποιηθεί με τρεις γνωστούς μηχανισμούς:

- A. Μέσω μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης βάσεων του DNA,
- B. Μέσω τροποποίησης των ιστονών και
- Γ. Μέσω της επίδρασης μικρών μη-κωδικοποιόντων τμημάτων RNA (small noncoding RNAs, **miRNAs**).

Η **μεθυλίωση του DNA** πραγματοποιείται ως επί το πλείστον στην θέση C5 της κυτοσίνης όταν ακολουθεί γουανοσίνη (CG) και οδηγεί τις περισσότερες φορές σε μεταγραφική αδράνεια. Το 5% των κυτοσινών είναι μεθυλιωμένο και το 50-60% των γονιδίων έχουν περιοχές πλούσιες σε ακολουθίες CpG που βρίσκονται κοντά στους υποκινητές και ονομάζονται «νησίδα CpG». Το ενζυματικό σύμπλοκο που πραγματοποιεί την μεθυλίωση ανήκει στην κατηγορία των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMT).

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και της ενηλίκου ζωής ορισμένα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα (καθώς και καρκινικά κύτταρα) εμφανίζουν αλλαγές στο πρότυπο της μεθυλίωσης του DNA που επάγεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η δημιουργία 5-υδροξύμεθυλοκυτοσίνης (5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC) είναι μια επιγενετική τροποποίηση που ο ρόλος της στην επαγωγή σύνθετων νοσημάτων παραμένει υπό διερεύνηση, αν και η 5-hmC παίζει ρόλο στην απομεθυλίωση του DNA και υπάρχει στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η κατάλυση της μετατροπής της 5-μέθυλοκυτοσίνης (5-mC) σε 5-υδροξύ-μέθυλοκυτοσίνη (5-hmC) επιτελείται από την οικογένεια των πρωτεϊνών TET (ten-eleven translocation proteins, TETs)<sup>31</sup> Pirola et al. 2015b).

Η τροποποίηση των ιστονών γίνεται μέσω μεθυλίωσης σε κατάλοιπα των αμινοξέων λυσίνη (Lys,K) ή αργινίνη. Ανάλογα με το ποιο αμινοξύ μεθυλιώνεται και τον βαθμό μεθυλίωσης (μονή, διπλή ή τριπλή μεθυλίωση) διαμορφώνεται και το μεταγραφικό αποτέλεσμα. Η

μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη της θέσης 4 (H3K4) ή της θέσης 36 (H3K36), και της αργινίνης στις ιστόνες H3 και H4 έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της μεταγραφής, όπως και η τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στην λυσίνη στη θέση 4. Αντίθετα, η διμεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη της θέσης 9 (H3K9me2) οδηγεί σε μεταγραφική αδράνεια.

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να επηρεαστεί από το μήκος των τελομερών (Telomere length, TL). Τα τελομερή συνιστούν επαναλαμβανόμενες ακολουθίες και σχετίζονται με πρωτεΐνες που καλύπτουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων των ευκαρυωτικών οργανισμών και διατηρούν την σταθερότητά τους. Η τελομεράση είναι το ένζυμο που δημιουργεί αυτές τις επαναλαμβανόμενες ακολουθίες. Στα κύτταρα που στερούνται δραστηριότητας της τελομεράσης τα τελομερή γίνονται βραχύτερα σε κάθε κυτταρική διαίρεση. Όταν ξεπεραστεί ένα κρίσιμο μήκος της περιοχής αυτής, τα κύτταρα δεν δύνανται πλέον να πολλαπλασιαστούν <sup>32,33</sup>. Μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι δυσμενείς ενδομήτριες συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν σε μικρότερο μήκος τελομερών <sup>34</sup>.

Τα τελομερή των κυττάρων του πλακούντα έχει βρεθεί ότι είναι βραχύτερα και η δραστηριότητα της τελομεράσης μικρότερη σε κυήσεις που έχουν επιπλακεί με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη, IUGR <sup>35,36</sup>. Από τις ίδιες μελέτες έχει βρεθεί ότι το μήκος των τελομερών είναι μικρότερο σε πλακούντες εμβρύων με προεκλαμψία ή προεκλαμψία με IUGR <sup>37</sup>.

Πειραματικά δεδομένα κυήσεων σε μύες υπό καθεστώς στέρησης πρωτεϊνών με ακόλουθη αναπληρωματική ανάπτυξη (catch-up growth) έδειξαν βράχυνση του μήκους των τελομερών σε κύτταρα αορτής, νεφρών και κύτταρα παγκρεατικών νησιδίων <sup>38,39</sup> (Tarry-Adkins et al. 2008, 2009).

### 3.4. Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από ομφαλίδες (UC- MSCs)

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) είναι μη αιμοποιητικά κύτταρα που αρχικά απομονώθηκαν από τον μυελό των οστών το 1976 από τον Friedenstein και τους συνεργάτες του <sup>118</sup>. Από τότε εκτεταμένες έρευνες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να απομονωθούν από μια πληθώρα οργάνων και ιστών, όπως ο εγκέφαλος, το πάγκρεας, το δέρμα, ο πνεύμονας, ο νεφρός, το ήπαρ και ο ομφάλιο λώρος. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα είναι πολυδύναμα (multipotent) και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλες τις σειρές της μέσης βλαστικής στοιβάδας, δηλαδή λιποκύτταρα (adipocytes), οστεοκύτταρα (osteocytes), μυϊκά κύτταρα (myocytes) και χονδροκύτταρα (chondrocytes).

Το 2006, η International Society for Cellular Therapy εισήγαγε τρία ελάχιστα κριτήρια ορισμού των MSCs: 1. Θα πρέπει στις κυτταροκαλλιέργειες να έχουν τη δυνατότητα να κολλούν στα πλαστικά δοχεία, 2. Θα πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα και επίσης 3. Θα πρέπει να εκφράζουν στην επιφάνειά τους τους δείκτες CD105, CD90, CD73 και να μην εκφράζουν τους δείκτες CD45, CD34, CD14 ή CD11b, CD79α ή CD19 και HLA-DR <sup>112</sup>.

Τα MSCs έχουν ιστοεπισκευαστικές, ανοσορυθμιστικές και ειδικές ανοσοφαινοτυπικές δυνατότητες. Λόγω της ικανότητάς τους να διαφεύγουν του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν πολλά υποσχόμενο μέσο επίτευξης στο μέλλον κυτταρικών θεραπειών και εφαρμογών ιστικής μηχανικής. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι τα MSCs παρουσιάζουν έναν ειδικό τροπισμό προς τα σημεία τραύματος και ανάπτυξης όγκων που αναφέρεται βιβλιογραφικά ως “**homing**”, στοιχείο που τα καθιστά ιδανικά οχήματα για στοχευμένες αντικαρκινικές θεραπείες στο μέλλον.

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από ομφαλίδες (UC-MSCs) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του γεγονότος ότι απομονώνονται από ιστούς που απορρίπτονται μετά τον τοκετό, χωρίς να είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί κάποια σωματική χειρουργική αφαιρετική διαδικασία για την πρόσκτηση του ιστού προέλευσής τους. Επίσης, δεν έχουν υποστεί τις μακροχρόνιες επιδράσεις περιβαλλοντικών παραγόντων που έχουν συσσωρευτικό χαρακτήρα. Οι όποιες επιδράσεις που αφορούν το ενδομήτριο περιβάλλον αφορούν μικρό χρονικό διάστημα, ενώ το έμβρυο ανοσολογικά βρίσκεται σε ειδικές συνθήκες και τρέφεται αποκλειστικά από τον πλακούντα με τη μεσολάβηση των οργάνων της εγκύου. Διατηρούν στο ακέραιο όλα τα βλαστικά χαρακτηριστικά τους. Είναι αυτοανανεούμενα και πολυδύναμα. Μπορούν συνεχώς να πολλαπλασιάζονται και να διαφοροποιούνται χωρίς να απορρίπτονται όταν χρησιμοποιούνται ως αλλογενή μοσχεύματα.

Σήμερα, τα περισσότερα από τα διαθέσιμα UC-MSCs συλλέγονται και φυλάσσονται από τις τράπεζες βλαστοκυττάρων. Η πρώτη άνοιξε το 2004 στο Ηνωμένο Βασίλειο και ακολούθησαν άλλες στις περισσότερες προηγμένες χώρες. Στην Ελλάδα η μεγαλύτερη τράπεζα μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από ομφαλίδες βρίσκεται στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) και έχει δημόσιο χαρακτήρα.

### **3.4.1. Εφαρμογές UC-MSCs σε κυτταρικές θεραπείες**

Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από ομφαλίδες (UC-MSCs) παρουσιάζουν ορισμένες ειδικές ιδιότητες που είναι εξαιρετικά σημαντικές για την χρήση τους σε θεραπευτικά πρωτόκολλα <sup>117</sup>:

**1.Ανοσοτροποίηση:** Εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό T και B λεμφοκυττάρων. Επάγουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων από προ-φλεγμονώδεις σε αντι-φλεγμονώδεις φαινοτύπους. Μειώνουν τη φλεγμονή επάγοντας την έκκριση ιντερλευκίνης-4 (IL-4) και ιντερλευκίνης-10 (IL-10).

**2. Παρακρινική δράση:** Εκκρίνουν διαλυτά μόρια όπως οι HGF (Hepatocyte Growth Factor), KGF (Keratinocyte Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) που οδηγούν σε ιστική αναγέννηση.

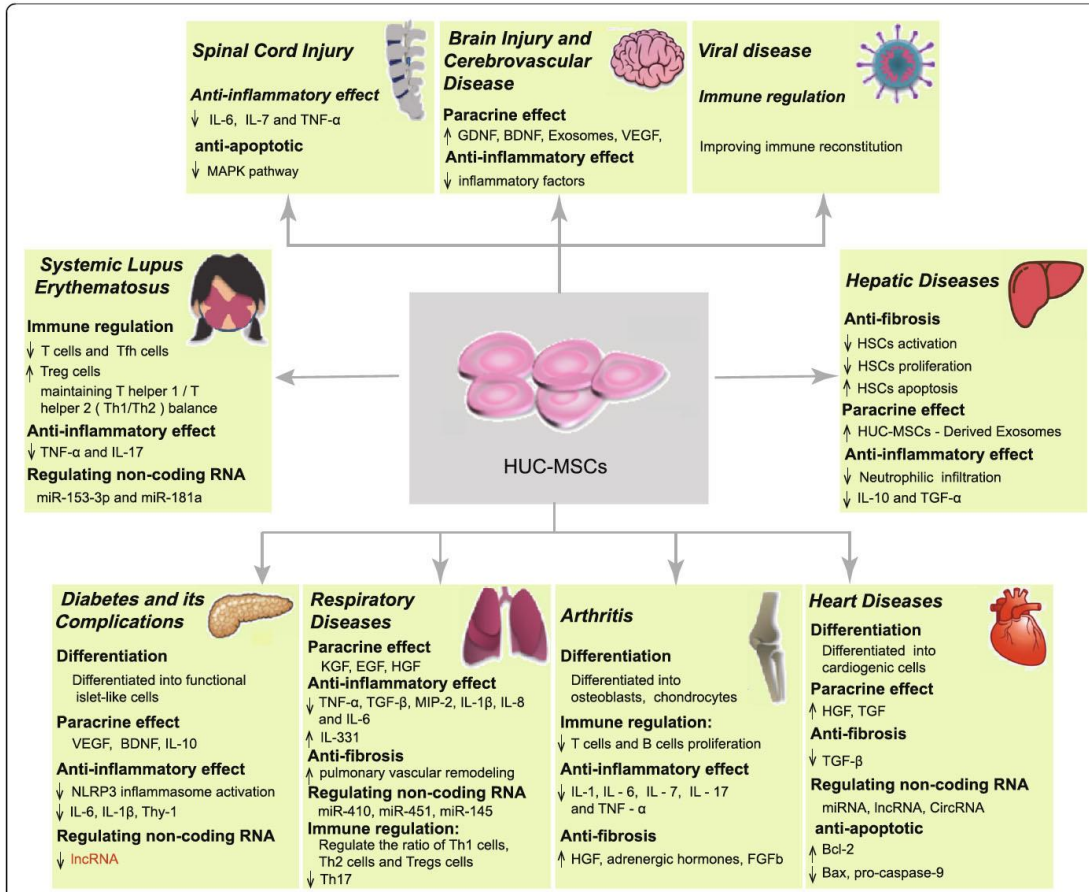
**3. Διαφοροποίηση:** Η διαφοροποίησή τους σε εξειδικευμένες κυτταρικές σειρές της μέσης στοιβάδας (χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα, μυϊκά κύτταρα) αποτελεί επισκευαστικό υλικό για τους αντίστοιχους ιστούς.

**4. Αντιφλεγμονώδη δράση:** Τα UC-MSCs καταστέλλουν την έκκριση της ιντερλευκίνης-8 (IL-8), του TNF-α (Tumor Necrosis Factor – α) και της Ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) μειώνοντας την ιστική φλεγμονή

**5. Αντι-ινωτική δράση:** Εκκρίνουν HGF (βλ. παραπάνω) και επάγουν τις αποπτωτικές διαδικασίες που σχετίζονται με την ύπαρξη ίνωσης.

**6. Επιγενετική δράση:** Τα UC-MSCs γνωρίζουμε ότι επηρεάζουν την έκφραση των μη κωδικοποιούντων RNAs: των microRNA (miRNA), των long non-coding (lncRNA) και των circular RNA (circRNA) <sup>117</sup>.

Παρακάτω περιγράφονται μερικές από τις θεραπευτικές εφαρμογές των UC-MSCs που βρίσκονται σε ερευνητικό στάδιο και η μελέτη τους άρχισε κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας διατριβής (Εικόνα 8):



*Εικόνα 8: Χρήσεις των μεσεγχυματικών κυττάρων από ομφαλίδες (UC-MSCs) για χρήσεις στην αναγεννητική ιατρική (από Xie et al, 2020<sup>117</sup>)*

**Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2:** Έχει καταδειχτεί ότι η έγχυση UC-MSCs σε πειραματόζωα με διαβήτη τύπου 2 βελτιώνει όλες τις κλινικές παραμέτρους. Μέσω του τροπισμού τους στο πάγκρεας και της διαφοροποίησής τους σε δομές που ομοιάζουν σε νησίδια απασχολούν το NLRP3 inflammasome και επιδρούν στην πώλωση των μακροφάγων μειώνοντας την φλεγμονή. Σε ανθρώπους με χρόνιες επιπλοκές του διαβήτη τύπου 2 έχει ήδη δοκιμαστεί η χορήγηση UC-MSCs και μέσω της αύξησης των VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) έχουν παρατηρηθεί θετικά επουλωτικά αποτελέσματα.<sup>117</sup>

**Ηπατικές νόσοι:** Η κίρρωση του ήπατος, η χρόνια ηπατίτιδα και ο καρκίνος του ήπατος έχουν σαν κοινή συνιστώσα την ηπατική ίνωση που επάγεται από την ενεργοποίηση των HSC (Hepatic Stellate Cells). Έχει βρεθεί ότι τα UC-MSCs καταστέλλουν τα HSC μέσω μείωσης της έκφρασης των TGF-1 (Transforming Growth Factor-1) και Smad3 και αύξησης της έκφρασης της Smad7. Επίσης, επάγουν την απόπτωση των HSC μέσω της MMP-13 (Matrix Metalloproteinase-13) και εμποδίζουν την παρακρινική σηματοδότηση που επάγει την ίνωση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι η χορήγηση UC-MSCs μπορεί και καθυστερεί ή αναστρέφει την ηπατική ίνωση <sup>119</sup>.

**Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος:** Η χορήγηση UC-MSCs σε περιπτώσεις ΣΕΛ ασκεί ανοσοτροποποιητική δράση εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό των T και Tfh κυττάρων, επάγοντας τα T ρυθμιστικά κύτταρα (Treg), μειώνοντας τα επίπεδα των TNF-α και IL-17 και επιδρώντας στην έκφραση ορισμένων miRNA<sup>120</sup>. Οι μελέτες βρίσκονται σε αρχικό στάδιο λόγω της ανοσολογικής πολυπλοκότητας της νόσου.

**Αρθρίτιδα:** Η έγχυση UC-MSCs μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της κλινικής εικόνας μέσω διαφοροποίησής τους σε χονδροκύτταρα ή οστεοκύτταρα προς επισκευή των χόνδρων, μέσω έκκρισης κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και ανοσοτροποποιητικών παραγόντων που επάγουν την αναστολή του πολλαπλασιασμού των δενδριτικών κυττάρων (DC) και των κυττάρων φυσικών φονέων (NK) <sup>121</sup>.

**Εγκεφαλικές βλάβες:** Η χορήγηση UC-MSCs έδειξε αύξηση της έκφρασης του GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) και του BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) επάγοντας νευροπροστατευτικές δράσεις, ακόμη και μετά από ενδορρινική χορήγηση σε νεογνά με εγκεφαλικές βλάβες<sup>122-123</sup>. Οι οδοί χορήγησης επηρεάζουν το αποτέλεσμα.



**Καρδιοπάθειες:** Έχει εφαρμοστεί η χορήγηση UC-MSCs για την ανακούφιση της ισχαιμίας και του εμφράγματος του μυοκαρδίου, της μυοκαρδίτιδας και της καρδιακής ανεπάρκειας. Έχει βρεθεί ότι μετά τη χορήγησή τους έχουν αντι-αποπτωτική δράση μέσω αύξησης της έκφρασης της BCL-2 και μείωσης της έκφρασης της BAX και της pro-caspase-9. Επίσης τα UC-MSCs στο σημείο της βλάβης μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα που ομοιάζουν με καρδιακά και να δημιουργήσουν παρεμβαλλόμενους δίσκους με κανονικά κύτταρα του μυοκαρδίου δημιουργώντας ένα λειτουργικό συγκύτιο και λαμβάνοντας μέρος στην συσταλτική λειτουργία της καρδιάς<sup>122-123</sup> Εξάλλου, μειώνουν το οξειδωτικό στρες επάγοντας αυξημένα επίπεδα δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SuperOxide Dismutase, SOD), γλουταθειόνης (Glutathione, GSH) και μειωμένα επίπεδα μαλονικής διαλδεΰδης (MDA, Malondialdehyde) Με τον τρόπο αυτό, όχι μόνο μειώνουν την φλεγμονή και την νεκρωτική περιοχή, αλλά συμμετέχουν και στην συσταλτική λειτουργία της καρδιάς. Αποτελούν ένα νέο, πολλά υποσχόμενο πεδίο.

**Βλάβες Νωτιαίου Μυελού:** Η έγκαιρη χορήγηση UC-MSCs έγκαιρα μετά την εμφάνιση τραυματισμών της σπονδυλικής στήλης μπορεί να μειώσει την απόπτωση των νευρώνων του νωτιαίου μυελού, να αναστείλει την οδό MAPK (mitogen-activated protein kinase) και να μειώσει τα επίπεδα προφλεγμονωδών παραγόντων (IL-6, IL-7, TNF-α)<sup>126</sup>.

**Πνευμονοπάθειες:** Η ενδοπνευμονική χορήγηση UC-MSCs έχει δείξει ότι βελτιώνει τους πνευμονικούς λειτουργικούς δείκτες σε περιπτώσεις φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως το βρογχικό άσθμα και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Η μείωση της φλεγμονής επάγεται μέσω υπερέκφρασης της IL-33 και της IL-1 receptor like-1 που δρα σαν ανταγωνιστής και μέσω υποέκφρασης των TNF-α, IL-1β, TGF-β, IL-6, IL-8. Επίσης, τα UC-MSCs επάγουν την έκκριση των παραπάνω αναφερόμενων αυξητικών παραγόντων

KGR (Keratinocyte Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), ενώ τέλος επιδρούν επιγενετικά μέσω ρυθμίσεων στην έκφραση των miR-410, miR-451 και miR-145<sup>127</sup>.

Άλλες εφαρμογές: Τα UC-MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί πρόσφατα στις μελέτες έναντι της COVID-19, του στελέχους H5N1 του ιού της γρίπης, καθώς και σε περιπτώσεις HIV ανοσοανεπάρκειας<sup>128</sup>. Επίσης αποτελούν μια ασφαλή πηγή διπλοειδών ανθρώπινων κυττάρων για την παραγωγή αντικών εμβολίων<sup>129</sup>.

### **3.4.2. Εφαρμογές UC-MSCs σε αντικαρκινικές θεραπείες**

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν χορηγηθεί μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells) σε διάφορους τύπους καρκίνων ως πειραματικές θεραπείες σε συνέχεια των κυτταρικών θεραπειών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Η χρήση τους σε καρκινικούς όγκους εμπεριέχει θεωρητικούς κινδύνους που επιβεβαιώθηκαν και κλινικά, μειώνοντας τον αρχικό ενθουσιασμό.

Στις χρόνιες εκφυλιστικές, αυτοάνοσες ή φλεγμονώδεις νόσους το ζητούμενο είναι η μείωση της φλεγμονής, η ανοσοτροποίηση, η νεοαγγείωση νεκρωτικών εστιών και η κυτταρική αναγέννηση μέσω κλωνικής επέκτασης διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων. Αντίθετα, στην καρκινογένεση τα συστήματα μεταγραφικής ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ήδη υπερλειτουργούν, οι αγγειογενετικοί παράγοντες ήδη υπερλειτουργούν και το ανοσοποιητικό σύστημα μάλλον αδυνατεί να επιτηρήσει σε ανοσολογικό επίπεδο την πληθώρα καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν ποικίλα αντιγόνα στην επιφάνειά τους. Επομένως, στη θεραπεία του καρκίνου το ζητούμενο είναι μάλλον η χορήγηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σαν παραγόντων που θα λειτουργήσουν

**σαν φορείς και οχήματα** θεραπευτικών παραγόντων που θα φέρουν πάνω στα κύτταρα του όγκου, αφού έλκονται από την ιστική βλάβη μέσω τροπισμού του μηχανισμού homing που αναφέρθηκε παραπάνω.

Ειδικότερα, μελέτες έδειξαν ότι τα MSCs έλκονται στις περιοχές ανάπτυξης των όγκων προάγοντας την επέκταση του όγκου και την αγγειογένεση μέσω διαφοροποίησής τους σε καρκινο-σχετιζόμενους μυοϊνοβλάστες, της έκκρισης αγγειογενετικών κυτταροκινών, όπως της Ιντερλευκίνης-6 (IL-6), του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), του Μετατρεπτικού Αυξητικού Παράγοντα β (Transforming Growth Factor- β, TGF-β). Επίσης, με την αύξηση της έκκρισης λυσιλοοξειδάσης προωθούσαν την επαγωγή μεταστάσεων <sup>113</sup>. Στον καρκίνο του μαστού φάνηκε ότι οι ανοσοτροποποιητικές δράσεις των MSCs στα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα, τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικού φονείς (NK) μείωναν την ανοσοκαθαριστική δράση και προήγαγαν την εξάπλωση των όγκων. Επίσης, φάνηκε ότι τα MSCs βοηθούσαν στην δημιουργία μιας γραμμής με καρκινικά βλαστικά κύτταρα για την διατήρηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού. Εξάλλου, η διαφοροποίησή τους σε περικύτταρα ή κύτταρα ομοιάζοντα με ενδοθηλιακά με παράλληλη έκκριση αγγειογενετικών παραγόντων δείχνει να επάγει την αγγειογένεση που είναι απαραίτητος παράγοντας για την διατήρηση και επέκταση των όγκων <sup>130-131</sup>. Μελέτη του 2018 έδειξε ότι η χορήγηση εξωκυτταρικών κυστίδια (Extracellular Vesicles, EV) από UC-MSCs επάγει την αύξηση αδenoκαρκινώματος του πνεύμονα με επιγενετικούς μηχανισμούς μέσω διαμεταγωγής της μη κωδικοποιούσας περιοχής miR-140 <sup>132</sup>.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι μη τροποποιημένα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα έχουν αντικαρκινικές δράσεις σε ορισμένους τύπους όγκων, όπως το γλοίωμα, το μελάνωμα και το ηπάτωμα.

Μελέτες όγκων έδειξαν ότι η πηγή εμφάνισής τους και η αιτία της αντοχής τους στη χορήγηση χημειοθεραπευτικών σχημάτων είναι η ύπαρξη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs, Cancer Stem Cells). Στον καρκίνο του ήπατος και του πνεύμονα έχουν βρεθεί CD133+ CSCs τα οποία διαφεύγουν και διαιωνίζουν το φαινόμενο. Επίσης, το μικροπεριβάλλον των όγκων που καλείται συλλογικά στρώμα (tumor stroma) παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και την ανάπτυξη των στοιχείων του όγκου. Σε συνθήκες υποξίας το στρώμα του όγκου αυξάνει την έκφραση TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF (Platelet Derived Growth Factor) και HGR (Hepatocyte Growth Factor). Μικροπεριοχές του όγκου βρίσκονται σε χρόνια ή παροδική κατάσταση υποξίας. Η υποξία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στους όγκους για την επέκταση, τη μετάσταση και την αντοχή τους στην ακτινοβολία και την χημειοθεραπεία. Ο **HIF-1** (Hypoxia – Inducible Factor-1) μαζί με τον **SDF1** (Stromal-Cell derived Factor-1), τον **CXCR4** (C-X-C motif Receptor 4) και άλλους παράγοντες έλκουν στην περιοχή τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα με τον μηχανισμό του homing. Η υποξία διαιωνίζει την έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων δικαιώνοντας τη ρήση ότι ο καρκίνος μοιάζει με μια ουλή (niche) που δεν επουλώνεται ποτέ. Για το σκοπό αυτό πλέον σχεδιάζονται ειδικές αντικαρκινικές εφαρμογές των MSCs.

Μια από αυτές είναι η χρήση εξωσωμάτων από MSCs ως οχημάτων. Τα εξωσώματα (Exosomes) είναι εξωκυτταρικά κυστίδια που έχουν μέγεθος < 100 nm και απελευθερώνονται από διάφορους τύπους κυττάρων. Παίζουν ρόλο στην διακυτταρική μεταγωγή mRNA, microRNA και πρωτεϊνών. Τα εξωσώματα από MSCs μπορούν να

φέρουν ποικίλα miRNA που να προσληφθούν από τα κύτταρα των όγκων και να εκφραστούν σε αυτά <sup>133</sup>. Για παράδειγμα η ακολουθία miR-100 απουσιάζει από τους περισσότερους τύπους καρκίνου του μαστού, ενώ είναι σε περίσσεια στα εξωσώματα των MSCs και μπορεί να μεταφερθεί στους όγκους και να καταστείλει τον μηχανισμό αγγειογένεσης μέσω τροποποίησης του άξονα σηματοδότησης mTOR/ HIF-1α / VEGF στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.

Μια άλλη στρατηγική είναι η μεταφόρτωση αντικαρκινικών παραγόντων πάνω σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα με σκοπό την επιτόπια διανομή τους στα σημεία επέκτασης του όγκου ως αποτέλεσμα της προσέλκυσης των MSCs στις περιοχές αυτές μέσω του μηχανισμού homing. Ήδη έχει δοκιμαστεί η μεταφόρτωση πακλιταξέλης (PTX, Paclitaxel) και σισπλατίνης (CDDP, Cisplatin) με θετικά αποτελέσματα <sup>134</sup>. Επίσης, έχουν δοκιμαστεί σχήματα σε άλλους τύπου καρκίνου με MSCs που έχουν υποστεί διαλοίμωξη (transfection) με αδενοϊούς και φέρουν ιντερφερόνη-γ, ιντερφερόνη-β ή και TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) ή σχήματα με αποπτωτικά γονίδια που ενώ δεν επηρεάζουν τα MSCs, εν τούτοις επηρεάζουν τα κύτταρα των όγκων στην περιοχή ενδιαφέροντος. Η πιο πρόσφατη στόχευση αφορά τους αναστολείς της αποακετυλάσης των ιστονών (HDACis, Histone Deacetylase inhibitors) που επάγουν την απόπτωση στα χημειοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα, όπως τα CD123+/CD47+ <sup>135</sup>.

Άλλοι παράγοντες που μπορούν να υπερεκφράζουν τροποποιημένα MSCs και που επηρεάζουν θετικά την έκβαση των αντικαρκινικών θεραπειών είναι η IL-18, η IL-12, καθώς και η CX3CL (CX3C Chemokine fractalkine) που είναι ελκυστής των T λεμφοκυττάρων <sup>113</sup>.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία αναφορικά με την αντικαρκινική χρήση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από ομφαλίδες (UC-MSCs) υπάρχουν δύο γνωστές εργασίες: Στην εργασία των Leng et al, 2014 η χορήγηση UC-MSCs σε σε κύτταρα καρκίνου του μαστού προκάλεσε παρεμπόδιση της αγγειογένεσης και επαγωγή της απόπτωσης με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του όγκου<sup>136</sup>. Στην εργασία των Wu et al, 2016 η χορήγηση UC-MSCs σε ηπατικές καρκινικές σειρές οδήγησε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού τους μέσω μείωσης της σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης<sup>137</sup>.

### 3.5. Ο γενικός ρόλος της IGF2BP1

Ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 2 (Insulin-like Growth Factor 2, IGF-2) είναι μέλος των πολυπεπτιδικών παραγόντων της οικογένειας της ινσουλίνης που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την αύξηση. Η έκφρασή του ελέγχεται με μεταγραφικούς και επιγενετικούς μηχανισμούς.

Ένας μετα-μεταγραφικός τρόπος ρύθμισης της έκφρασής του πραγματοποιείται με τη βοήθεια των RNA-συνδεόμενων πρωτεϊνών (RNA-binding proteins, RBPs). Οι τελευταίες προσδέονται στα μετάγραφα του IGF2 και επηρεάζουν την περαιτέρω επεξεργασία τους που περιλαμβάνει την διαφορική εντόπισή, βιοδιαθεσιμότητα και μετάφρασή τους. Έχουν αναγνωριστεί τρεις διαφορετικές συνδετικές πρωτεΐνες για τον IGF-2. Στο ανθρώπινο είδος έχουν βρεθεί τρεις ισομορφές. Τα ονόματά τους είναι **IGF2BP1**, **IGF2BP2**, **IGF2BP3** και συνδέονται με τις 3 προς 5' άκρο οδηγούς αλληλουχίες της μεταγραφικής (μη μεταφρασμένης περιοχής) του IGF-2.

Οι πρωτεΐνες αυτές οφείλουν το ρυθμιστικό τους ρόλο στην συγγένειά τους με το RNA του IGF-2 σε έξι περιοχές σύνδεσης. Αυτές είναι οι 4 ετερογενείς περιοχές με K-ομολογία (**KH**) στο C-τελικό τους άκρο (κυρίως περιοχές που χαρακτηρίζονται ως πολύ-πυριμιδινικές) και τα δύο μοτίβα αναγνώρισης (N-terminal RNA recognition motifs, **RRMs**) στο N-άκρο τους.

Για να γίνουν ακόμη πολυπλοκότερα τα πράγματα, είναι γνωστό ότι οι IGFBPs δημιουργούν ομόλογα ή ετερόλογα διμερή επί παρουσίας RNA αλληλουχιών-στόχων και ενισχύουν την σταθερότητα των συμπλόκων τους με το RNA. Πραγματοποιούνται φωσφορυλιώσεις αμινοξικών καταλείπων που επηρεάζουν την μετα-μεταγραφική τύχη των υπαρχόντων στο κυτταρόπλασμα ακολουθιών RNA.

Οι IGF-BPs εδράζονται στο κυτταρόπλασμα, όπου δημιουργούν ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (RNPs, Ribonucleoprotein Particles) με την ακολουθία-στόχο του RNA, και μπορούν να περάσουν στον πυρήνα του κυττάρου όπου μπορούν να συνδεθούν με νεοδημιουργημένα μετάγραφα. Μέσω των περιοχών KH μπορούν να ακολουθήσουν «σήματα» του πυρήνα που τα οδηγούν εκτός πυρήνα και έτσι να επιτελέσουν μεταφορικό ρόλο.

Από συγκριτικές φυλογενετικές μελέτες της οικογένειας των IGF-BP έχουν προκύψει ορισμένα ενδιαφέροντα ευρήματα. Αν υποθέσουμε ότι στα χαρακτηριστικά σπονδυλωτά και ασπόνδυλα υπάγονται ενδεικτικά ο άνθρωπος (*Homo sapiens*), ο οικιακός ποντικός (*Mus musculus*), η ερυθρά όρνιθα (κότα) (*Gallus gallus*), η μύγα του ξιδιού (*Drosophila melanogaster*) και ο Αφρικανικός ονυχοφόρος βάτραχος (*Xenopus laevis*). Φαίνεται ότι υπάρχει ένας κοινός αρχέγονος φυλογενετικός κλάδος από τον οποίον έχουν προκύψει κατιόντες αποκλίνοντες κλάδοι με διαφορεικό βαθμό ομολογίας. Το στοιχείο αυτό υποδηλώνει ότι η ευρεία οικογένεια των IGF-BPs επιτελεί διαχρονικά έναν διατηρημένο, καθολικό και κομβικό ρόλο στα βιολογικά φαινόμενα. Η **IGF2BP1** παρουσιάζει κοντινή ομολογία με την CRD-BP του ποντικού και την ZBP-1 της όρνιθος. Η **IGF2BP3** μοιράζεται κοντινή ομολογία με την Vg1RBP/Vera του βατράχου. Η *Drosophila* διαθέτει ανεξάρτητο φυλογενετικό κλάδο. Η **IGF2BP2** υποτίθεται ότι μέχρι πρόσφατα δεν παρουσίαζε κοντινή ομολογία εκτός του ανθρώπινου είδους. Ωστόσο, βρέθηκε ότι παρουσιάζει ομόλογες μορφές IGF2BP2α και IGF2BP2β στο ψάρι - ζέβρα (*Danio Retio*)<sup>70</sup>.

Αναφορικά με την **IGF2BP2** (που δεν αποτελεί στόχο της παρούσας μελέτης) έχουν υπάρξει ορισμένα ενδιαφέροντα ευρήματα. Το γονίδιο της εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 και ειδικότερα στην περιοχή **3q27.2**. Αρχικά και αυτή θεωρήθηκε ότι συνδέεται μόνο στο mRNA του IGF-2. Κατοπινές έρευνες έδειξαν ότι συνδέεται και με άλλες μεταγραφόμενες



αλληλοχίες, όπως την LAMB2, LIMS2, TRIM54, UCPI και άλλα γονίδια που κωδικοποιούν μιτοχονδριακά στοιχεία. Η **IGF2BP2** έχει βρεθεί ότι έχει παθοφυσιολογικές λειτουργίες στην εμβρυϊκή ανάπτυξη που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων, την αντοχή στην ινσουλίνη, την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την νευρωνική διαφοροποίηση και την ανάπτυξη νεοπλασμάτων. Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν μεταλλάξεις στην **IGF2BP2** στην ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Τυπικό παράδειγμα αποτελεί ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου τύπου rs4402960. Ο ίδιος πολυμορφισμός σε ορισμένες εθνολογικές ομάδες αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών παρατηρείται ανοσολογική απόκριση τύπου αυτοανοσίας έναντι της **IGF2BP2**. Το γεγονός αυτό καθιστά το μόριο αυτό βιοδείκτη (Biomarker) τόσο για την ανίχνευση, την διάγνωση και την προοπτική παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Επίσης, η υπερέκφραση της **IGF2BP2** σε αδenoκαρκίνωμα του οισοφάγου και σε ψευδοβασικό καρκίνωμα του μαστού σχετίζεται με πτωχή επιβίωση. Σε κυτταρικό επίπεδο η **IGF2BP2** ενισχύει την σταθερότητα του γονιδιώματος και επάγει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Άλλες μελέτες σχετίζουν την **IGF2BP2** με την διατήρηση του βλαστικού χαρακτήρα των καρκινικών κυττάρων, υποδηλώνοντας τον κομβικό του ρόλο για την αντοχή των όγκων αυτών στην χημειοθεραπεία και την ανάπτυξη υποτροπών. Η μη έκφραση του IGF2BP2 στο νευρικό σύστημα σταματά την νευρογένεση και προάγει τον μετασχηματισμό προς νευρογλοιακά κύτταρα. Επίσης, κομβικός είναι ο ρόλος της IGF2BP2 στην μεταφορά των αναπνευστικών στοιχείων I και IV από τον πυρήνα προς τα μιτοχόνδρια(17<sup>α</sup>).

Εμβρυολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι IGF2BPs έχουν διαφασικό πρότυπο έκφρασης, διαφορετικό σε πρώιμα και όψιμα στάδια της ανάπτυξης. Υπάρχουν διαφορές έκφρασης των IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3 στους διάφορους εμβρυϊκούς ιστούς. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι υπάρχει κάποια άδηλη ρυθμιστική ιεράρχηση.

Στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης η **IGF2BP1** και η IGF2BP3 εκφράζονται στον πρόσθιο εγκέφαλο, τον οπίσθιο εγκέφαλο, το ρύγχος, τις βραγχιακές σχισμές, το δέρμα, τα σπλάγχνα και τους ουριαίους σπονδύλους, ενώ η IGF2BP2 βρίσκεται κυρίως στον εγκεφαλικό ιστό (εγκεφαλικό φλοιό, ραβδωτο και κοιλιακό σύστημα), στην ρινική κοιλότητα, το ήπαρ, το έντερο, τους πνεύμονες, τους νεφρούς.

Προς το τέλος της εμβρυϊκής ανάπτυξης η IGF2BP3 εκφράζεται λιγότερο, ενώ η έκφραση της **IGF2BP1** παραμένει στο παχύ και λεπτό έντερο, στο ήπαρ και τους νεφρούς. Η IGF2BP2 εκφράζεται στον μυελό των οστών, τους νεφρούς, τους πνεύμονες, τον εγκέφαλο, τα σπλάγχνα, τους μύες, το ήπαρ, το πάγκρεας και τους όρχεις <sup>70,71</sup>.

Μπορεί να υποθέσει κανείς ότι σε καθεστώς διαταραγμένης λειτουργίας των παραπάνω πρωτεϊνών μπορεί να εμφανιστούν παρεμφερείς νοσολογικοί φαινότυποι.

### **3.5.1. Ο ειδικός ρυθμιστικός ρόλος της IGF2BP1**

Η **IGF2BP1**, γνωστή και ως IMP1 ή CRD-BP (Coding Region Determinant-Binding Protein), θεωρείται ογκοεμβρυϊκή mRNA-συνδετική πρωτεΐνη <sup>72</sup>. Προάγει την εξάπλωση μιας πληθώρας συμπαγών όγκων. Ενώ εκφράζεται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και της νεογνικής ηλικίας, παραμένει σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στους περισσότερους ιστούς των ενηλίκων. Υπερεκφράζεται και παράγεται De Novo σε μια

πληθώρα ανθρώπινων καρκινικών νόσων. Η αυξημένη της έκφραση σχετίζεται με μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης από τη νόσο <sup>73</sup>.

Τα χρόνια συγγραφής της παρούσης μελέτης αναγνωρίστηκε ο ρόλος της **IGF2BP1** στην μέσω του KRAS σηματοδότηση στον αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα<sup>74</sup>, καθώς και στην έκφραση γονιδίων μέσω του MYC/MYCN στο Νευροβλάστωμα <sup>75</sup>, τον καρκίνο του ήπατος<sup>76</sup> και τον καρκίνο των ωοθηκών <sup>77</sup>. Γνωστοί mRNA στόχοι της IGF2BP1 περιλαμβάνουν τα μετάγραφα των **CMYC**, **bTrCP1**, **GLI1**, **MITF**, **MDR1**, **H19**, **CD44**, και **PTGS2**.

Οι μη-μεταφραζόμενες (untranslated regions) περιοχές 5' ή 3' των mRNAs (5' ή 3'UTRs) παίζουν σημαντικό ρόλο για την ρύθμιση της τύχης των μεταγράφων mRNA, όσον αφορά την μετάφρασή τους, τον ρυθμό εναλλαγής τους (turnover control) και την υποκυτταρική χωροταξική ταξινόμησή τους. Η υποκυτταρική εντόπιση των μεταγράφων mRNA δίνει τοπογραφική ιεράρχηση στα σημεία πρωτεϊνοσύνθεσης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής πολικότητας και της κυτταρικής μετανάστευσης <sup>78</sup>.

Το μήκος των 3' μη-μεταφραζόμενων περιοχών έχει αυξηθεί φυλογενετικά κατά τη διάρκεια των αιώνων και σχετίζεται με τον βαθμό πολυπλοκότητας των οργανισμών <sup>79</sup>. Αυτό υποδηλώνει ότι η ύπαρξη μακρών 3'UTRs ακολουθιών σε μεταγραφόμενα τμήματα RNA τα καθιστά πιο πιθανά να φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία cis-, τα οποία υπόκεινται σε ρυθμιστικές επιδράσεις από στοιχεία trans-. Μελέτες εξάλειψης της IGF2BP1 σε διάφορες κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι η απουσία της στερεί τη δράση σταθεροποίησης σε πολλά γονίδια με μεταγραφόμενα RNA που διαθέτουν μεγάλο μήκος 3'UTR<sup>1</sup>.

Γνωρίζουμε ότι υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία γνωστών εσωτερικών τροποποιήσεων στις ακολουθίες mRNA. Η πιο γνωστή τροποποίησή τους στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι η **M6A** (N6- Methyladenosine). Είναι συχνή στα 3'UTRs που προαναφέρθηκαν, σε

εσωτερικά μακρά εξόνια και πλησίον των κωδικοποιούντων περιοχών τέλους (stop codon). Η M6A μεθυλίωση επηρεάζει τον μεταβολισμό των RNA ακολουθιών αναφορικά με την έξοδό τους από τον πυρήνα, τη διαδικασία ματίσματος (splicing), την μετάφραση και τις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορες πρωτεΐνες. **Η IGF2BP1 σε πρόσφατες μελέτες αναγνωρίστηκε ως ένας αναγνώστης M6A.** Ιδιαίτερα η σταθεροποίηση του mRNA με τη βοήθεια M6A ακολουθιών με την IGF2BP1 επάγει την ενισχυμένη έκφραση των γονιδίων MYC και SRF<sup>80,81</sup>.

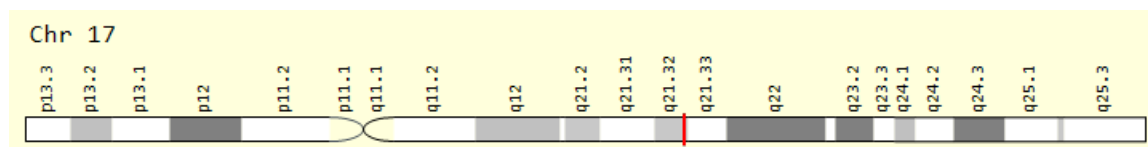
Είναι γνωστό επίσης, ότι η σταθερότητα των mRNA σχετίζεται συχνά με την ύπαρξη στοιχείων πλούσιων σε ακολουθίες AU (AU-rich elements, AREs) στις μη μεταφραζόμενες 3' περιοχές (3'UTRs). Οι AREs παρατηρούνται στο 8% περίπου των ανθρώπινων mRNA. Τα mRNA με AREs εμπλέκονται σε διαδικασίες απόπτωσης, καρκινικής επέκτασης, ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, ανοσολογικής επικοινωνίας και κυτταρικής απόκρισης σε συνθήκες stress<sup>82</sup>. Έχει βρεθεί ότι τα mRNA που αποτελούν στόχους σύνδεσης της IGF2BP1 εμφανίζουν συχνότερα αυτές τις ακολουθίες.

Γνωρίζουμε ότι η έκφραση της IGF2BP1 στο νευροβλάστωμα επάγει αντίσταση στη θεραπευτική δράση της χορηγούμενης δοξορουβικίνης (Bell et al., 2015). Ο φαρμακευτικός αποκλεισμός της σύνδεσης της IGF2BP1 με το mRNA έχει επιτευχθεί πρόσφατα με τον μικρομοριακό παράγοντα **BTYNB**. Ο τελευταίος δρα μέσω της αναστολής της E2F επαγόμενης μετα-μεταγραφικής γονιδιακής έκφρασης. Ένας δεύτερος παράγοντας που δρα συνεργικά με τον προηγούμενο είναι ο CDK4/6 αναστολέας Palbociclib. Η συγχορήγησή τους αυξάνει την δραστικότητα των χημειοθεραπευτικών σχημάτων.

Μελέτες του 2019 όσον αφορά τον τρόπο που μεθίσταται το μελάνωμα, έδειξε ότι τα εξωκυτταρικά κυστίδια των 30-150 nm (extracellular vesicles, EVs), γνωστά και ως

εξωσωμάτα (exosomes), αδυνατούν να επάγουν μεταστάσεις σε περιπτώσεις που έχει καταργηθεί η κυτταρική παραγωγή IGF2BP1.

Όλες οι παραπάνω διαπιστώσεις αφορούν μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες in vitro. Τα πράγματα μοιάζουν να είναι τελείως διαφορετικά όταν γίνονται μελέτες λειτουργικού αποκλεισμού (Knockout) in vivo. Τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου διατηρούν μια λειτουργία φραγμού ανάμεσα στον υποβλεννογόνιο ιστό και τον εντερικό αυλό. Η ακεραιότητα του εντερικού επιθηλίου διατηρείται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών, που βασικό ρόλο παίζουν οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions, TJ). Πρόσφατα, σε μελέτη του 2020 σε ενήλικους μύες μελετήθηκε η επίπτωση του αποκλεισμού της IGF2BP1 σε εντερικά κύτταρα με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης – διαμεταγωγής αλληλουχιών δίκην φουρκέτας (short hairpin RNA, small hairpin RNA, shRNA/Hairpin Vector). Βρέθηκε ότι προκλήθηκε από ήπια έως σοβαρή κολίτιδα με διαταραχή του εντερικού φραγμού. Αιτία είναι το γεγονός ότι μια βασική πρωτεΐνη των TJ είναι η occludin, Oc1n, η οποία έχει πολύ ασταθές mRNA απουσία του παράγοντα IGF2BP1<sup>83</sup>. Το πειραματικό αυτό γεγονός αφορά στοχευμένη επίδραση πάνω σε εντερικά κύτταρα. Δημιουργεί προβληματισμό σε ενδεχόμενη μελλοντική φαρμακευτική λύση αποκλεισμού της IGF2BP1 για άλλες νόσους, κυρίως νεοπλασίες<sup>84,85,86</sup>. Η IGF2BP1 εδρεύει στην περιοχή 17q21.32 (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9:** Γονιδιακή εντόπιση του γονιδίου της IGF2BP1

### 3.6. Ο γενικός ρόλος της P21 (CDKN1A)

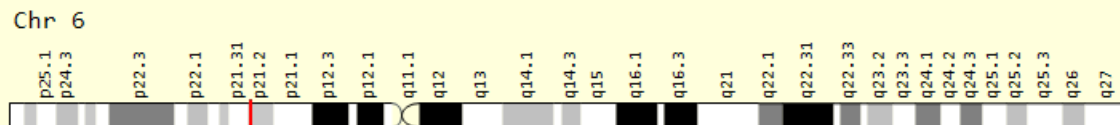
Η **P21** είναι γνωστή και ως εξαρτώμενος από κυκλίνη αναστολέας κινάσης 1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1). Είναι γνωστό από τις αρχές της δεκαετίας του '90 ότι η P21 είναι στόχος συνεργικής δράσης με την P53<sup>89</sup>.

Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο **CDKN1A** που βρίσκεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 6, στην περιοχή 6p21.2 (Εικόνα 10). Λειτουργεί ως ρυθμιστής της μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από την φάση G1 στην φάση S. Ενώνεται μέσω δύο περιοχών του με τις εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες, (CDK, cyclin-dependent kinase) και τις αδρανοποιεί. Οι περιοχές αυτές είναι το μοτίβο Cy1 στο N-τελική περιοχή και το μοτίβο Cy2 στο C-τελική περιοχή. Στόχος της P21 είναι οι CDK1, CDK2, και η CDK4/6.

Μελέτες αναφορικά με την δράση της P21 στην CDK2 έδειξαν ότι η υψηλή έκφραση της P21 σχετίζεται με κυτταρική μετάβαση στη φάση G0/ ηρεμίας, ενώ χαμηλά επίπεδα της σχετίζονται με απρόσκοπτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό<sup>90</sup>.

Παράλληλα η P21 επιδρά με τον PCNA (proliferating cell nuclear antigen) που είναι συμπαραγοντας της DNA πολυμεράσης και παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην κυτταρική φάση S αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό του DNA και την επισκευή βλαβών σε αυτό. Η P21 επομένως αναστέλλει την σύνθεση του DNA στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Σε καρκίνους όταν υπερεκφράζεται μαζί με υψηλή P53 και χαμηλή P27 η πρόγνωση είναι δυσμενής και το ελεύθερο νόσου διάστημα μειώνεται δραματικά.

Μια επιπλέον σημαντική δράση της P21 είναι ότι προκαλεί αντίσταση των αιμοποιητικών κυττάρων στην προσβολή από τον ιό HIV, καθώς δημιουργεί σύμπλοκα με την ιντεγκράση του ιού και δεν επιτρέπει την χρωμοσωμική ενσωμάτωση των προϊόνων<sup>91</sup>.



*Εικόνα 10: Γονιδιακή εντόπιση του γονιδίου της P21*

### 3.7. Ο γενικός ρόλος του NANOG

Το γονίδιο NANOG κωδικοποιεί την homeobox πρωτεΐνη NANOG (hNANOG).

Είναι μεταγραφικός ρυθμιστής της εσωτερικής μάζας κυττάρων στην εμβρυϊκή φάση της γαστριδίωσης και της αυτοανανέωσης και του πολλαπλασιασμού των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (Embryonic Stem Cells, ESC). Καθιστά τα ESC πλειοδύναμα και παρεμποδίζει τη διαφοροποίησή τους προς εξωεμβρυονικό ενδόδερμα και τροφοεξώδερμα. Συνδέεται σε ακολουθίες DNA του τύπου 5'-TAAT[GT][GT]-3' or 5'-[CG][GA][CG]C[GC]ATTAN[GC]-3' και συνδέεται στον εκκινητή του POU5F1/OCT4. Όταν υπερεκφράζεται οδηγεί τα κύτταρα να εισέλθουν στην φάση S και να πολλαπλασιαστούν.

Το γονίδιο εδράζεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 12 στην περιοχή 13.31 του βραχέος σκέλους (Εικόνα 11) και δρα συνεργικά με τα γονίδια POU5F1 (Oct-4) και SOX2 για την διατήρηση της ταυτότητας των ESC ως τέτοια. Αυτή επιτρέπει στα κύτταρα αυτά να μπορούν να παράγουν ιστούς και από τις τρεις βλαστικές στοιβάδες (ενδόδερμα, μεσόδερμα, εξώδερμα)<sup>87</sup>. Διάφοροι τύποι καρκίνων σχετίζονται με την NANOG.



*Εικόνα 11: Εντοπισμός του γονιδίου του NANOG στην περιοχή 12p13.31*

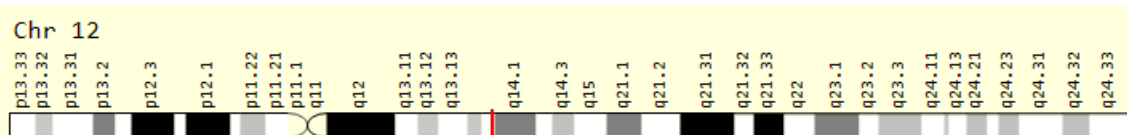
### 3.8. Ο γενικός ρόλος της GLI1

Η GLI1 είναι μια πρωτεΐνη δακτυλίων ψευδαργύρου. Απομονώθηκε αρχικά από ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (GLI), απ'όπου και προέρχεται το όνομά της, και αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας GLI που έχει τα μέλη GLI1, GLI2, GLI3, με τα οποία φέρει κάποιες κοινές ιδιότητες.

Οι GLI1 για να μεταγραφεί θα πρέπει να υπάρχει προηγούμενη ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων από τον καταρράκτη της Hedgehog (Hh) σηματοδότησης, του οποίου συστήματος λειτουργεί ως ενισχυτής δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας για άλλα γονίδια μέσω της σύνδεσής της με περιοχές 5'-GACCACCCA-3' που φέρουν δακτυλίους ψευδαργύρου στις ακολουθίες των γονιδίων - στόχων. Μεταλλάξεις στις περιοχές αυτές, της αποστερούν τη δυνατότητα να δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας. Γονιδιακά βρίσκεται στην περιοχή 12q13.3 (Εικόνα 12).

Παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της κυτταρικής μοίρας σε διάφορους τύπους κυττάρων, στην δημιουργία ιστικών προτύπων και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μακροσκοπικά, σε εμβρυολογικό επίπεδο εμπλέκεται στην κρανιοπροσωπική ανάπτυξη του εμβρύου, στον σχηματισμό των δακτύλων και την ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος και του γαστρεντερικού συστήματος.

Η GLI1 εκφράζεται φυσιολογικά στα τριχοθυλάκια, απ'όπου μπορεί να εμφανιστούν και καρκίνοι του δέρματος. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της GLI1 από μόνη της μπορεί να οδηγήσει στην ογκογένεση <sup>92</sup>.



**Εικόνα 12:** Εντοπισμός του γονιδίου του *GLI1* στην περιοχή 12q13.3



### 3.9. Ο γενικός ρόλος της OCT4 (POU5F1)

Το Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4), είναι γνωστό και ως POU5F1 (POU domain, class 5, transcription factor 1). Το γονίδιο του εδράζεται στην περιοχή 6p21.33 (Εικόνα 13). Εμπλέκεται στους μηχανισμούς αυτοανανέωσης των αδιαφοροποίητων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων. Χρησιμοποιείται ως δείκτης αδιαφοροποίητων κυττάρων. Είναι μέλος της οικογένειας POU (Pit-Oct-Unc) των μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς και που χωρίζονται σε έξι κλάσεις, από POU1 έως και POU6. Η ετυμολογία τους είναι περιέργη, καθώς προέρχεται από τα αρχικά μιας αρχικής ομαδοποίησης που περιελάμβανε τον παράγοντα **Pit-1** (που ήταν ειδικός για την υπόφυση **Pituitary**) και σήμερα γνωρίζουμε ότι ανήκει στην κλάση POU1., τους παραπάνω αναφερόμενους παράγοντες **OCT** και τον μεταγραφικό παράγοντα **Unc-86** από το νευρικό σύστημα που ανήκει στην κλάση POU4. Η κλάση POU5 μοιάζει να είναι μοναδική στα σπονδυλωτά.

Σε όλη την υποοικογένεια OCT η οκταμερής ακολουθία σύνδεσης είναι η ATGCAAAT. Μαζί με το SOX2 που αναφέρεται παρακάτω δημιουργεί ετεροδιμερή τριμερή δομή πάνω στο DNA και ελέγχει διάφορα γονίδια κατά την εμβρυονική ανάπτυξη. Σήμερα είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του πλειοδύναμου χαρακτήρα των εμβρυονικών βλαστοκυττάρων και την κυτταρική μοίρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας κατά την πρόιμη εμβρυονική ανάπτυξη. Εμπλέκεται με διάφορους τύπους καρκίνου στην ενήλικη ζωή, ενώ η υποέκφρασή του σχετίζεται με την εμφάνιση σειράς δυσπλασιών στους επιθηλιακούς ιστούς.

Εκφράζεται αρχικά στο ωάριο και παραμένει ενεργό στα έμβρυα πριν από την εμφύτευση.

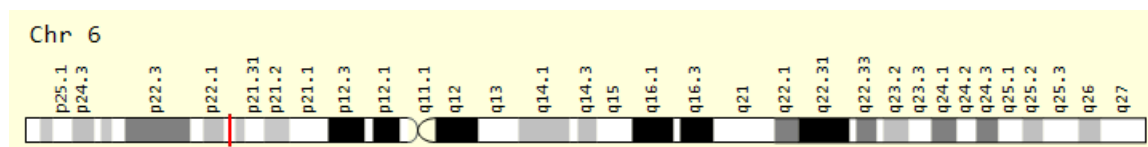
Έμβρυα με έλλειψη OCT4 ή χαμηλή έκφραση αποτυγχάνουν να δημιουργήσουν την εσωτερική κυτταρική μάζα, να διαφοροποιήσουν το τροφοεξώδερμα και χάνουν την πλειοδυναμικότητά τους <sup>93</sup>.

Έχει βρεθεί ότι στην λεπτή αυτή λειτουργική ρύθμιση συμμετέχει και το SOX2. Ειδικότερα, μια μείωση των επιπέδων του SOX2 συνοδεύεται που από αύξηση της OCT4 σε επίπεδο λιγότερο του διπλασιασμού προκαλεί διαφοροποίηση της έσω κυτταρικής μάζας σε αρχέγονο ενδόδερμα και μεσόδερμα, ενώ η OCT4 εμποδίζει την διαφοροποίηση σε εξώδερμα. Μειωμένα επίπεδα OCT4, αντίθετα, μπορούν να οδηγήσουν σε εξωδερματική διαφοροποίηση που συνοδεύεται από αύξηση στην SOX2, η οποία αναστέλλει την διαφοροποίηση προς μεσόδερμα και ενδόδερμα.

Επομένως, αυτοί οι δύο παράγοντες είναι εξαιρετικά σημαντικοί για την διαφοροποίηση των βλαστικών στοιβάδων. Βρίσκονται σε ένα ιεραρχημένο επίπεδο πάνω από το NANOG, του οποίου την μεταγραφή αλλάζουν, αφού δουλεύουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον εκκινήτή του. Απαιτείται μειωμένη έκφραση του NANOG για να προχωρήσει η διαφοροποίηση των κυτταρικών σειρών <sup>94</sup>.

Έχει βρεθεί ότι η OCT4 επάγει τον ταχύ κυτταρικό κύκλο επάγοντας την παραμονή στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου μέσω μεταγραφικής αναστολής της P21 που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Η Oct-4 είναι ένας από τους μεταγραφικούς παράγοντες (Sox2, CMYC) που χρησιμοποιούνται για την δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (induced pluripotent stem cells, iPSCs) <sup>95</sup>.



**Εικόνα 13:** Εντοπισμός του γονιδίου του OCT4 στην περιοχή 6p21.33

### 3.10. Ο γενικός ρόλος της SOX2

Ο **SOX2** (SRY BOX2, sex determining region Y -box 2) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για την αυτοανανέωση και διατήρηση της πολυδυναμικότητας των αδιαφοροποίητων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων (undifferentiated embryonic stem cells, uESC). Γονιδιακά βρίσκεται στην περιοχή 3q26.33 (Εικόνα 14). Ο SOX2 αναστέλλει την διαφοροποίηση των βλαστικών στοιβάδων προς μεσόδερμα και ενδόδερμα και επάγει τη διαφοροποίηση προς την νευροεξωδερμική βλαστική στοιβάδα, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω <sup>96</sup>.

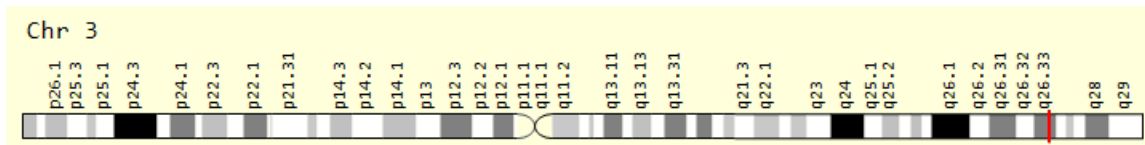
Η έλλειψη SOX2 σε πειραματόζωα έχει δείξει να προκαλεί νευρικές ανωμαλίες και εμβρυϊκό θάνατο.

Δεν είναι υπερβολή να ειπωθεί ότι για το νευρικό σύστημα το γονίδιο της SOX2 και η έκφρασή του είναι σημαντικά για την διαφοροποίηση του ανθρώπινου είδους από τα άλλα πρωτεύοντα. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *Asb11* που είναι ενισχυτής της έκφρασης της SOX2 έχουν οδηγήσει σε ανάπτυξη του νευρικού συστήματος στον άνθρωπο που έχει σαν αποτέλεσμα διαφορές στο μέγεθος του εγκεφάλου σε σχέση με τα άλλα πρωτεύοντα <sup>97</sup>.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο SOX2 σχετίζονται με αμφοτερόπλευρη ανοφθαλμία. Στην ανάπτυξη των πνευμόνων η SOX2 ελέγχει την μορφογένεση της διακλάδωσης του βρογχικού δέντρου και την διαφοροποίηση του επιθηλίου των αεραγωγών. Η έκφρασή του είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανανέωση του επιθηλίου. Η υπερέκφρασή του σχετίζεται με επιθηλιακή υπερπλασία και καρκίνωμα των πνευμόνων <sup>98</sup>.

Η έκφραση του SOX2 σχετίζεται με πτωχή ανταπόκριση προστατικών όγκων σε χορήγηση GnRH αναλόγων και στην ανταπόκριση καρκίνων του μαστού στην χορήγηση ταμοξιφαίνης <sup>99,100</sup>.

Έχει βρεθεί ότι οι θυρεοειδικές ορμόνες, και κυρίως η T3 ελέγχουν την έκφραση του SOX2 ενισχυτικά μέσω επιδράσεων στον εκκινητή του. Αυτό εξηγεί και τον φαινότυπο του κρετινισμού κατά τον υποθυρεοειδισμό του πρώτου τριμήνου της κύησης<sup>101</sup>.



*Εικόνα 14: Εντοπισμός του γονιδίου του SOX2 στην περιοχή 3q26.33*

### 3.11. Ο γενικός ρόλος της CMYC

Η MYC είναι μια οικογένεια ρυθμιστικών γονιδίων και πρωτο-ογκογονιδίων. Αποτελείται από 3 ανθρώπινα γονίδια, τα CMYC (ή απλώς MYC καθώς ανακαλύφθηκε πρώτο), το MYCL, και το MYCN.

Ετυμολογικά, το ακρωνύμιο MYC προέρχεται από το γεγονός ότι αρχικά είχε βρεθεί ομολογία ανάμεσα στο ανθρώπινο αυτό γονίδιο που εκφραζόταν σε διάφορους τύπους καρκίνου και στον ιό που προκαλεί την μυελοκυτταρομάτωση (MYeloCytomatosis) των πτηνών.

Οι πρωτεΐνες Myc είναι μεταγραφικοί παράγοντες. Από βιοχημική σκοπιά πρόκειται για φωσφοπρωτεΐνες και εδράζονται στον πυρήνα του κυττάρου. Ενεργοποιούν και ενισχύουν με μη γραμμικό τρόπο τη δράση πολλών γονιδίων που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μειώνοντας τα επίπεδα του P21 και αυξάνοντας τις κυκλίνες). Επίσης ενεργοποιούν της ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (histone acetyltransferases, HATs), οι οποίες μέσω διαφορικών ακετυλιώσεων επάγουν επιγενετικές αλλαγές στο

πακεταρισμένο DNA, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα <sup>102,103</sup>. Επίσης επάγουν την απόπτωση μέσω μείωσης της bcl-2.

Το CMYC εκφράζεται στην περιοχή **8q24.21** (Εικόνα 15). Το CMYC επάγει τον πολλαπλασιασμό των B λεμφοκυττάρων και σχετίζεται με την επιθετικότητα των αντίστοιχων τύπων πολλαπλού μυελώματος και λεμφώματος Burkitt στην περίπτωση που έχουν πραγματοποιηθεί μεταθέσεις μεταξύ των περιοχών που φέρουν τα γονίδια για τις ανοσοσφαιρίνες και το CMYC. Εξάλλου, στους διάφορους καρκίνους, όπως του τραχήλου, του στομάχου, του μαστού, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου και των πνευμόνων το CMYC εκφράζεται συνεχώς <sup>104</sup>. Τα κύτταρα της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας για να επιβιώσουν απαιτούν CMYC & P53 <sup>105</sup>.

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, το CMYC μαζί με τους παράγοντες OCT4, SOX2, KLF4 παίζουν ρόλο στην δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (**induced pluripotent stem cells iPSCs**), όπως αναγνωρίστηκε αρχικά από τις μελέτες των Yamanaka et al <sup>106</sup>.

Έχει επιχειρηθεί να πραγματοποιηθεί απευθείας θεραπευτικός αποκλεισμός του CMYC, αλλά οι προσπάθειες δεν έχουν ευδοθεί κατά το χρόνο συγγραφής της παρούσας εργασίας <sup>107</sup>. Για το λόγο αυτό επιχειρείται να πραγματοποιηθεί έμμεσος θεραπευτικός αποκλεισμός του CMYC μέσω της κατανόησης άλλων επικουρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην CMYC σηματοδότηση. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένοι από αυτούς.

Για να δράσει το CMYC έχει βρεθεί ότι απαιτείται η παρουσία της **BRD4 (Bromodomain-containing protein 4)**. Το γονίδιο της BRD4 εδράζεται στην περιοχή 19p15.24. Η BRD4 είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην κατηγορία των **BET** (bromodomain and extra terminal domain).

Κλασσικό παράδειγμα καταστροφικού καρκίνου όπου υπερεκφράζεται η **BRD4** συμπαρασύροντας και το CMYC είναι το **καρκίνωμα NUT** (NUT carcinoma) που παρουσιάζει πτωχή κυτταρική διαφοροποίηση και πτωχή επιβίωση. Η NUT1 είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται μεταξύ άλλων στους όρχεις και τις ωοθήκες και επάγει την ακετυλίωση της χρωματίνης του DNA. Αυτό είναι ειδικά χρήσιμο στις σπερματίδες. Το γονίδιο βρίσκεται στο 15q.14. Στο καρκίνωμα NUT η περιοχή του NUT1 που είναι υπεύθυνο για μεθυλιώσεις μετατίθεται και ενσωματώνεται με την περιοχή BRD4 ((t(15;19)(q13;p13.1)) και δημιουργεί το χμιαϊκό γονίδιο BRD4-NUTM1 που με τη σειρά του επάγει μεταξύ άλλων το CMYC και το SOX2 όπως έχει προαναφερθεί.

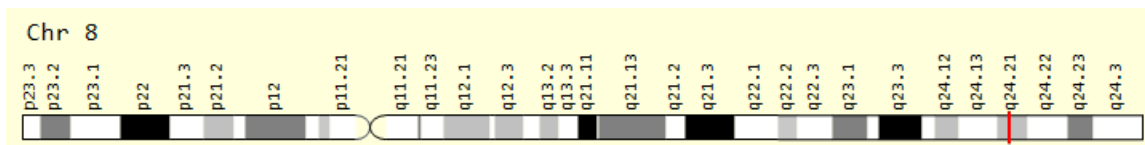
Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '90 έχουν προσπάθειες φαρμακευτικού αποκλεισμού της BRD4 με διάφορους παράγοντες, ώστε να εμποδιστεί έμμεσα η δράση του CMYC. Οι παράγοντες αυτοί αποτελούν μια ετερογενή ομάδα και ονομάζονται συλλογικά BET αναστολείς. Έχουν γίνει βήματα προόδου σε ορισμένες κατηγορίες BET, αλλά δεν έχει παραχθεί ειδικός αποκλειστής για την BRD4.

Ένα άλλο σημείο αιχμής στην θεραπεία του καρκίνου μέσω έμμεσης εξουδετέρωσης του CMYC είναι το σημείο εμπλοκής του με τα **SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier)**. Τα SUMO είναι μικρά λειτουργικά πεπτίδια με μέγεθος γύρω στα 100 αμινοξέα. Υπάρχουν 4 γνωστές ισομορφές: SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 και SUMO-4. Αποτελούν μια πρωτεϊνική οικογένεια που τροποποιεί τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών όταν συνδεθεί ομοιοπολικά πάνω τους. Πρόκειται για μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που θα μπορούσαν να αποδοθούν στα Ελληνικά ως "Σουμοϋλώσεις" (Ο αντίστοιχος διεθνής όρος είναι SUMOylations).

Οι SUMO αποτελούν μέλος των ουμπικιτινόμορφων πρωτεϊνών (ubiquitin-like protein). Η ουμπικιτίνη (ubiquitin) ως γνωστόν με την σύνδεσή της με άλλες πρωτεΐνες τις μαρκάρει αυτόματα (tag) προς αποδόμηση, κάτι που οι SUMO δεν κάνουν. Η ενεργοποιημένη SUMO προκύπτει με αποκοπή των τελευταίων 4 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο της ώστε να εκτεθεί μια γλυκίνη ώστε να μπορεί να συνδεθεί με μια λυσίνη στην πρωτεΐνη-στόχο της σύνδεσης. Μια κλασική δράση των SUMO η "Σουμοϋλώση" την πρωτεΐνης νινεΐνης (ninein) που οδηγεί στη μετακίνησή της από το κεντρόσωμα στον πυρήνα, ώστε να συνδεθούν οι μικροσωληνίσκοι στην μιτωτική άτρακτο.

Ο θεραπευτικός αποκλεισμός της δράσης των ενζύμων (SAE1, SAE2) που ενεργοποιούν τις SUMO παρουσία υψηλών επιπέδων CMYC μπορεί να δώσει ελπίδες για μελλοντικές θεραπείες <sup>108</sup>. Το σκεπτικό είναι ότι ακόμη και εάν το CMYC επάγει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η δράση του θα ακυρώνεται στην πράξη μέσω παρεμβολής στον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.

Το γονίδιο CMYC συνεχίζει να μας εκπλήσσει. Εκτός από τον κομβικό του ρόλο σε πολλούς τύπους καρκίνου φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο και στην γήρανση. Σε πρόσφατες μελέτες σε πειραματόζωα όπου είχε μειωθεί η έκφραση του CMYC παρατηρήθηκε αύξηση του προσδόκιμου ζωής <sup>109,110</sup>.



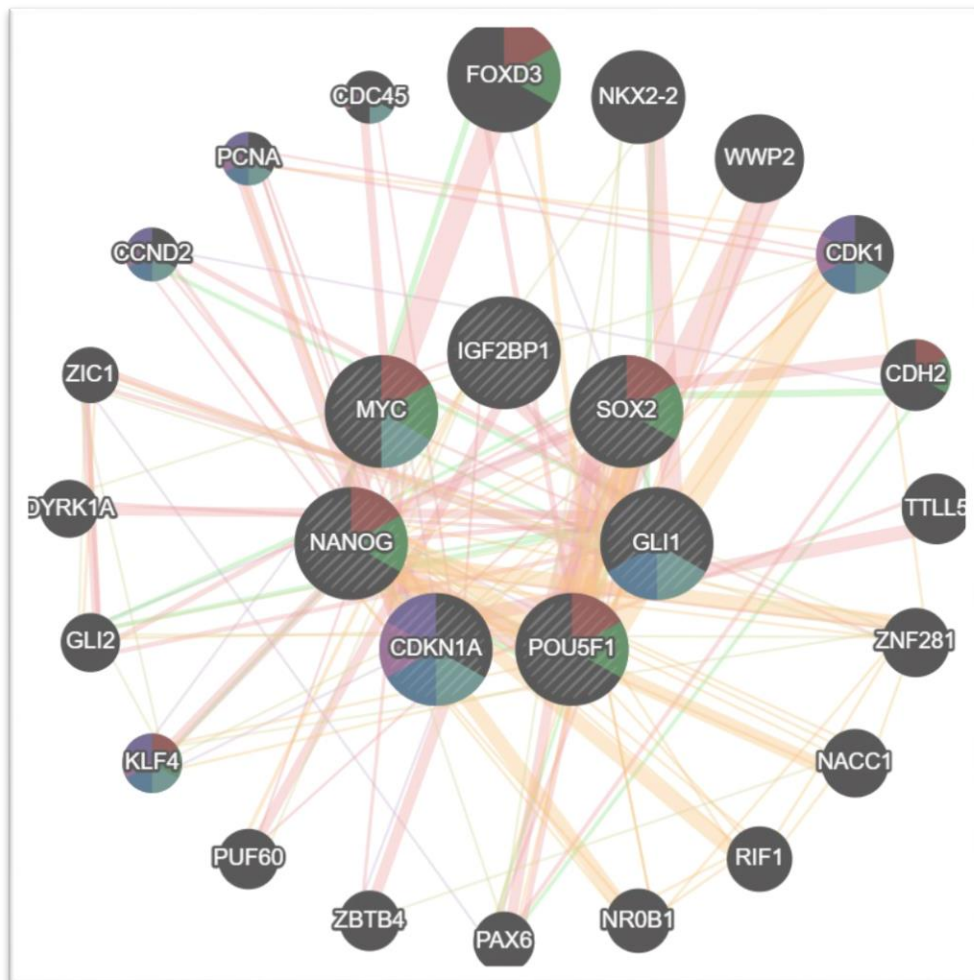
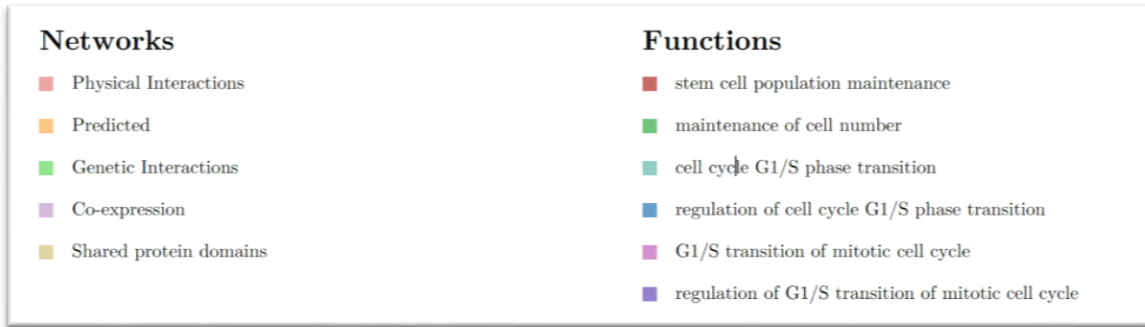
**Εικόνα 15:** Εντοπισμός του γονιδίου του CMYC στην περιοχή 8q24.21

### 3.12. Βιβλιογραφικές συσχετίσεις των υπό εξέταση γονιδίων με τη χρήση τεχνητής νοημοσύνης

Με την χρήση του λογισμικού **GeneMANIA** μελετήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των γονιδίων που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη, καθώς και οι βιολογικές λειτουργίες τους (Εικόνα). Όπως είναι γνωστό, ένα γονίδιο ασκεί τη λειτουργία του μέσω συνεργατικών αλληλεπιδράσεων με άλλα γονίδια. Οι κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες που έχουν τις ίδιες ή παρόμοιες λειτουργίες μπορούν να ρυθμίζονται κοινά ώστε να ασκήσουν τους ρόλους τους στις κατάλληλες βιολογικές διεργασίες. Η P21 εμφανίζεται ως *CDKN1A* και η OCT4 ως *POU5F1*.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 16, στο κέντρο του κύκλου φαίνονται τα επτά προς μελέτη γονίδια, ενώ οι μικρότεροι κύκλοι στην περιφέρεια παρουσιάζουν γονίδια που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις. Οι γραμμές που συνδέουν τα γονίδια παρουσιάζουν τις φυσικές αλληλεπιδράσεις (ροζ, 54.22%), τις προβλεπόμενες αλληλεπιδράσεις (πορτοκαλί, 34.42%), τις γενετικές αλληλεπιδράσεις (πράσινο, 7.51%), την ταυτόχρονη έκφραση (μοβ, 3.75%) και τις κοινές πρωτεϊνικές δομές (ανοιχτό πράσινο χρώμα, 0.10%). Οι λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται τα γονίδια ενδιαφέροντος απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα εντός των γονιδίων (Εικόνα 9). Έτσι, τα 4 από τα 7 υπό μελέτη γονίδια (*MYC*, *SOX2*, *NANOG*, *POU5F1*) εμπλέκονται στη διατήρηση του κυτταρικού αριθμού (πράσινο χρώμα) και του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων (αυτό-ανανέωση) (κόκκινο χρώμα). Τα 3 από τα 7 γονίδια (*MYC*, *GLI1*, *CDKN1A*) συμμετέχουν στη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (θαλασσί χρώμα). Επιπλέον, το *CDKN1A* συμμετέχει στη μετάβαση από την G1 στην S φάση της μίτωσης (ροζ χρώμα).



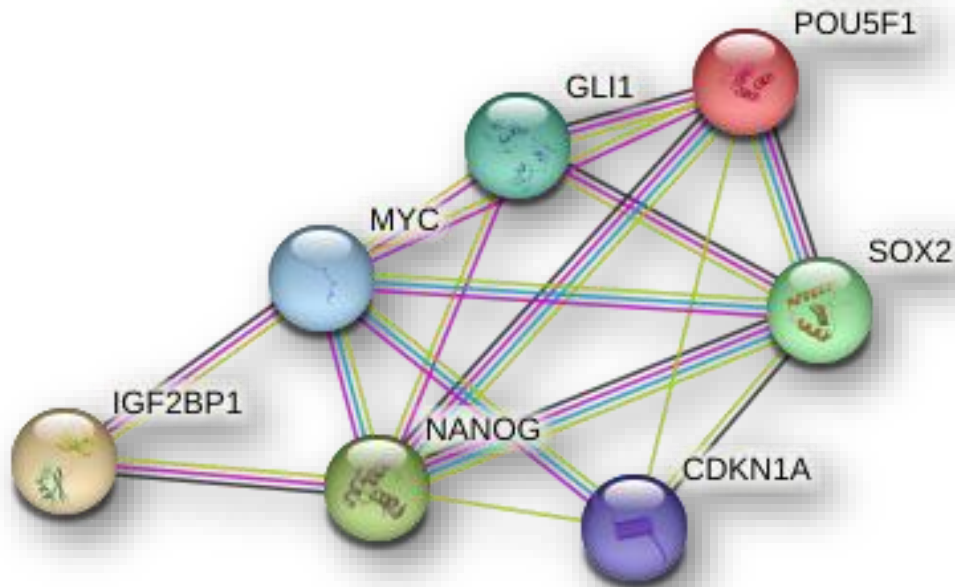


*Εικόνα 16:* Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων της ομάδας των γονιδίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Το δίκτυο κατασκευάστηκε μέσω της βάσης δεδομένων GeneMANIA. Οι κόμβοι (κύκλοι) και οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τα γονίδια και τις αλληλεπιδράσεις τους, αντίστοιχα. Τα επτά γονίδια ενδιαφέροντος αντιπροσωπεύονται στον εσωτερικό δακτύλιο, ενώ στον περιφερειακό δακτύλιο τοποθετούνται τα γονίδια με τα οποία αλληλεπιδρούν

άμεσα. Τα διαφορετικά χρώματα των γραμμών διασύνδεσης υποδηλώνουν και διαφορετικό τύπο αλληλεπίδρασης, ενώ τα διαφορετικά χρώματα εντός των κόμβων υποδηλώνουν τις διαφορετικές βιολογικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκεται το εκάστοτε γονίδιο.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων **STRING**, δημιουργήθηκε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα παραπάνω επτά γονίδια (Εικόνα 17). Η ελάχιστη απαιτούμενη βαθμολογία αλληλεπίδρασης ορίστηκε στο 0.400 (μέτρια εμπιστοσύνη). Η ανάλυση αποκάλυψε έναν μέσο βαθμό κόμβου (μέσος αριθμός ακμών ανά κόμβο) 4.57, με μέσο συντελεστή τοπικής ομαδοποίησης (ισχύς της σύνδεσης μεταξύ γειτονικών κόμβων, που κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1) 0,876 και τιμή εμπλουτισμού PPI  $8.38e-07$  (ισχύς των αλληλεπιδράσεων). Αυτές οι παράμετροι υποδεικνύουν ότι το προκύπτον δίκτυο έχει σημαντικά περισσότερες αλληλεπιδράσεις από ό,τι θα αναμενόταν για ένα τυχαίο σύνολο πρωτεϊνών του ίδιου μεγέθους και βαθμού κατανομής. Οι γραμμές που συνδέουν τις πρωτεΐνες παρουσιάζουν τις διάφορες σχετικές αλληλεπιδράσεις. Οι γραμμές που απεικονίζονται με ροζ ή γαλάζιο χρώμα αντιπροσωπεύουν γνωστές (καθορισμένες) αλληλεπιδράσεις. Ειδικότερα, με ροζ χρώμα παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις που έχουν καθοριστεί πειραματικά (GLI1/POU5F1, POU5F1 / SOX2, POU5F1 / NANOG, NANOG / IGF2BP1, SOX2 / NANOG, MYC / IGF2BP1, MYC / GLI1, POU5F1 / MYC, GLI1 / NANOG, GLI1 / SOX2, SOX2 / MYC, CDKN1A / MYC, MYC / NANOG) και με γαλάζιο χρώμα παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις που έχουν εξαχθεί από επιλεγμένες βάσεις δεδομένων (NANOG / MYC, NANOG / POU5F1, NANOG / SOX2, MYC / CDKN1A, MYC / SOX2, POU5F1 / SOX2). Ακόμα, με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις που προκύπτουν από βιβλιογραφικές αναφορές, (παρουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ όλων των πρωτεϊνών του πλέγματος), ενώ

οι μαύρες γραμμές υποδεικνύουν ότι οι αντίστοιχες πρωτεΐνες συν-εκφράζονται (GLI1 / POU5F1, POU5F1 / SOX2, SOX2 / CDKN1A, POU5F1 / NANOG, NANOG / IGF2BP1, SOX2 / NANOG, MYC / IGF2BP1).



**Εικόνα 17:** Δίκτυο αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια της παρούσας εργασίας. Το δίκτυο δημιουργήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων STRING. Οι κόμβοι και οι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες και τις αλληλεπιδράσεις τους, αντίστοιχα. Οι γεμάτοι, έγχρωμοι κόμβοι αντιπροσωπεύουν τις υπό εξέταση πρωτεΐνες με γνωστή ή προβλεπόμενη τρισδιάστατη δομή. Οι γαλάζιες και οι ροζ γραμμές αντιπροσωπεύουν γνωστές αλληλεπιδράσεις που έχουν εξαχθεί από επιλεγμένες βάσεις δεδομένων ή έχουν προσδιοριστεί πειραματικά, αντίστοιχα. Οι κίτρινες γραμμές αντιπροσωπεύουν αλληλεπιδράσεις από την βιβλιογραφική εξόρυξη κειμένου και οι μαύρες γραμμές υποδεικνύουν ότι οι αντίστοιχες πρωτεΐνες συν-εκφράζονται.

(<https://string-db.org/cgi/network?taskId=biKJ38Ieuej2&sessionId=bF8s0ZMWT6pT>)

## **4. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 4.1. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης είναι να μελετηθεί η σχετική γονιδιακή έκφραση των γονιδίων **IGF2BP1, P21, NANOG, GLI1, OCT4, SOX2, και CMYC** σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από τμήματα ομφαλίδων πλησίον του πλακούντα (Umbilical Cord - Mesencymal Stem Cells, UC-MSCs) από έμβρυα IUGR, SGA και φυσιολογικής ανάπτυξης (AGA) κοντά στη στιγμή του τοκετού, καθώς και μετά από κυτταρική ανακαλλιέργεια αυτών.

Το σκεπτικό που προκρίθηκε αυτή η πηγή του κυτταρικού υλικού για την παρούσα μελέτη εδράζεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά έχουν ορισμένα ειδικά χαρακτηριστικά:

**A.** βρίσκονται συνεχώς σε χωροταξική γειτνίαση με το αμνιακό υγρό και με τα στοιχεία που βρίσκονται τόσο στο φλεβικό, όσο και στο αρτηριακό σκέλος της κυκλοφορίας του εμβρύου με την χαλαρή παρεμβολή ενός δικτύου εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας με την μορφή της ουσίας Wharton. Επί της ουσίας βρίσκονται σε ένα μοναδικό συνδυαστικό «λουτρό» στοιχείων διάχυσης από διαφορετικά υγρά διαμερίσματα.

**B.** Με τον πλειοτροπικό βλαστικό (και όχι παγιωμένο και ιστοειδικό) τους χαρακτηήρα μπορούν θεωρητικά να αντανakλούν, λόγω δυναητικής πλαστικότητας, σε ικανότερο βαθμό πιθανές επιγενεηικές αλλαγές στην έκφραση σημανηικών γονιδίων ως απόρροια ενός διαφοροποιημένου ενδομήτριου τροφικού και παρακρινικού περιβάλλοντος.

**Γ.** Παρουσιάζουν εύκολη ενζυμαηική απομόνωση, καθώς βρίσκονται διάσπαρτα εντός μιας χαλαρής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Wharton jelly) και έχουν συμπαγή ιστολογική διάαξη. Επίσης, και μεγαλύτερες δυναότητες in vitro ανακαλλιέργειας

**Δ.** Βρίσκονται σε στοιχεία της κύησης που απορρίπτονται μετά τον τοκετό. Η λήψη του ιστού που τα περιέχει δεν προκύπτει από χειρουργική αφαιρετική διαδικασία και δεν επηρεάζει την ανατομική ακεραιότητα του εμβρύου.

**Ε.** Τα τελευταία χρόνια είναι συνήθης διεθνής πρακτική να λαμβάνονται μετά τον τοκετό τμήματα ομφαλίδας πλησίον του πλακούντα προς φύλαξη μεσεγγυματικών κυττάρων εν αναμονή μελλοντικών μεταμοσχευτικών θεραπευτικών χρήσεων. Είναι ενδιαφέρον να γνωρίζει κανείς εάν υπάρχουν κάποιες ενδεχόμενες διαφοροποιήσεις στην γονιδιακή τους έκφραση εφόσον έχουν προηγηθεί ενδομήτριες αναπτυξιακές διαφοροποιήσεις.

Τα γονίδια αυτά βρίσκονται τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο της έρευνας, καθώς εμπλέκονται σε ποικίλες μεταγραφικές διαδικασίες.

## 4.2. Υλικά και Μέθοδος

### 4.2.1 Ασθενείς και βιολογικό υλικό

Για τους σκοπούς της μελέτης επιλέχθηκαν **10 περιπτώσεις** εμβρύων με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (Intra Uterine Growth Restriction, **IUGR** (νεότερος όρος: Εμβρυϊκή υπολειπόμενη ανάπτυξη, FGR, Fetal Growth Restriction), **8 περιπτώσεις** εμβρύων με φυσιολογική ανάπτυξη (Εναλλακτικός όρος: AGA, Appropriate for Gestational Age) που χρησιμοποιούνται ως ομάδα ελέγχου (**CONTROL**) και **3 περιπτώσεις** μικρών για την ηλικία κύησης εμβρύων (**SGA**, Small for Gestational Age) που αποτελούν μια μεταβατική κλινική κατηγορία μεταξύ IUGR και AGA.

Όλα τα έμβρυα που συμμετείχαν στη μελέτη δεν έπασχαν από κάποιο γνωστό γενετικό σύνδρομο. Ένα μονάχα έμβρυο έπασχε από συγγενή καρδιοπάθεια (Τετραλογία Fallot, Tetralogy of Fallot, ToF). Επίσης, καμία γυναίκα της μελέτης δεν έπασχε από τοξιναιμία της κύησης. Η μελέτη εγκρίθηκε από το επιστημονικό συμβούλιο και την επιτροπή βιοηθικής του ΓΝ «Αλεξάνδρα» (IRB-ID 005/16.05.2013). Κλινικά δεδομένα και πληροφορίες ήταν διαθέσιμα για όλες τις περιπτώσεις. Οι δότριες είχαν δώσει γραπτή πολυσέλιδη συγκατάθεση για τη χρήση του βιολογικού τους υλικού για ερευνητικούς σκοπούς.

Στον **παθολογικό βραχίονα** επιλέχθηκαν κυήσεις με IUGR έμβρυα που πληρούσαν τα κλινικά διαγνωστικά κριτήρια της υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης. Οι περισσότερες ήταν μονήρεις κυήσεις. Σε μια περίπτωση είχαμε διχοριακή δίδυμο κύηση. Οι έγκυες γυναίκες εισήχθησαν για παρακολούθηση στο τμήμα παρακολούθησης κυήσεων υψηλού κινδύνου «Πτέρυγα Βενιζέλου» της Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής στο ΓΝΑ «Αλεξάν-

δρα». Μετά από στενή κλινικοεργαστηριακή παρακολούθηση των εμβρύων και των επιτόκων προγραμματίστηκε καισαρική τομή στον κατάλληλο χρόνο ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο περιγεννητικό αποτέλεσμα. Ο χρόνος της καισαρικής τομής ήταν σε κατάλληλη πρωινή ώρα ώστε να επιτευχθεί η ταχεία πρότυπη μεταφορά του δείγματος και η σύζευξη της διαδικασίας πρώιμης κατεργασίας του με τα τυπικά ωράρια εργασίας του εργαστηρίου μελέτης στο ΓΝΑ «Άγιος Σάββας».

Τα διαγνωστικά κριτήρια για τα IUGR έμβρυα αφορούσαν την προοδευτική απώλεια εκατοστιαίων θέσεων ανάπτυξης στην υπερηχογραφική εκτίμηση βάρους σε διαδοχικές βιομετρικές αναλύσεις κατά τη διάρκεια της κύησης και δεν εκπλήρωναν το φαινομενικό, αρχικό τους αναπτυξιακό δυναμικό. Εξ' ορισμού, τα έμβρυα είχαν καταληκτική εκατοστιαία θέση <5<sup>η</sup> ως προς τις διεθνείς πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης εμβρύων που εφαρμόζονται και για τον ελληνικό πληθυσμό (Hadlock et al).

Στον **βραχίονα ελέγχου (CONTROL)** επιλέχθηκαν 8 περιπτώσεις κύσεων με φυσιολογική, σταθερή εμβρυϊκή ανάπτυξη και καταληκτική >10<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης που υποβλήθηκαν σε καισαρική τομή για μη παθολογικούς λόγους (όπως προηγηθείσα καισαρική τομή ή επιθυμία της μητέρας). Δεν χρησιμοποιήθηκε υλικό από φυσιολογικούς τοκετούς, καθώς ο χρόνος τοκετού και υστεροτοκίας θα ήταν αβέβαιος, διαφορετικός ανά περίπτωση και δεν θα επέτρεπε οργανωτικά την ταχεία μεταφορά και σύζευξη της διαδικασίας πρώιμης κατεργασίας του δείγματος με τα ωράρια εργασίας του εργαστηρίου μελέτης.

Επίσης, μελετήθηκαν και 3 περιπτώσεις εμβρύων μικρών για την ηλικία κύησης (**SGA, Small for Gestational Age**) που παρουσιάζουν περιγραφικό ενδιαφέρον καθώς συνιστούν μια ενδιάμεση κλινική κατηγορία. Εξ' ορισμού πρόκειται για έμβρυα ακολουθούν σταθερή ενδομήτρια αναπτυξιακή τροχιά μεταξύ της 5<sup>ης</sup> και της 10<sup>ης</sup> εκατοστιαίας



θέσης ανάπτυξης και την διατηρούν ως καταληκτική θέση κατά τη γέννηση, εκπληρώνοντας το ενδογενές (χαμηλό) αναπτυξιακό τους δυναμικό. Οι έγκυες γυναίκες και στις περιπτώσεις αυτές λόγω χαμηλού εκτιμώμενου βάρους εισήχθησαν για παρακολούθηση στο τμήμα παρακολούθησης κύσεων υψηλού κινδύνου «Πτέρυγα Βενιζέλου» της Α' Πανεπιστημιακής Κλινικής στο ΓΝΑ «Αλεξάνδρα», όπου και αποκλείστηκε η περίπτωση υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης (IUGR). Μετά από στενή κλινικοεργαστηριακή παρακολούθηση των εμβρύων και των επιτόκων προγραμματίστηκε καισαρική τομή στον κατάλληλο χρόνο ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο περιγεννητικό αποτέλεσμα. Ο χρόνος της καισαρικής τομής ήταν σε κατάλληλη πρωινή ώρα ώστε να επιτευχθεί η ταχεία πρότυπη μεταφορά του δείγματος και η απρόσκοπτη σύζευξη της διαδικασίας πρώιμης κατεργασίας του με τα τυπικά ωράρια εργασίας του εργαστηρίου μελέτης στο ΓΝΑ «Άγιος Σάββας».

Τα ηλικιακά χαρακτηριστικά των εγκύων, τα βάρη των εμβρύων, ο χρόνος περάτωσης της κάθε κύησης και το άμεσο περιγεννητικό αποτελέσματα των παραπάνω περιπτώσεων αναγράφονται στον συγκεντρωτικό Πίνακα 1 που ακολουθεί.

**Πίνακας 1:** Συγκεντρωτικός πίνακας των χαρακτηριστικών προέλευσης του κάθε δείγματος και του περιγεννητικού αποτελέσματος

ID ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΒΔ ΤΟΚΕΤΟΥ	ΜΗΤΡΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)	ΕΚΑΤΟΣΤΙΑΙΑ ΘΕΣΗ	ΚΑΤΑΤΑΞΗ	ΒΑΡΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ (ΓΡΑΜΜΑΡΙΑ)	APGAR SCORE
M1	36+2	21	8,4	SGA	2320	9
M2	36+6	36	4	IUGR	2260	8
M3	36+6	42	2,4	IUGR	2170	8
M4	34+1	31	0	IUGR	940	8
M5	34+2	30	1,4	IUGR , DCDA TWIN	1660	9
M6	34+2	30	2,3	IUGR , DCDA TWIN	1730	9
M7	36+2	39	4,3	IUGR	2180	8
M8	36+5	27	8,6	SGA	2400	9
M9	38+1	41	48,4	CONTROL	3204	8
M10	37+0	37	13,8	CONTROL	2610	8
M11	32+1	31	15,7	CONTROL	1670	8
M12	35+5	25	0,4	IUGR	1710	8
M13	35+6	24	3,5	IUGR	1770	7
M14	39+3	37	56,1	CONTROL	3470	9
M15	34+1	28	9,1	SGA , MCDA TWIN	1940	8
M16	34+1	28	89,7	CONTROL , MCDA TWIN	2860	6
M17	37+3	38	2,3	IUGR ,	2240	8
M18	36+3	32	17,6	CONTROL	2530	9
M19	38+6	32	79,6	CONTROL	3700	9
M20	38+5	40	18,8	CONTROL	2910	9
M21	33+4	32	0,4	IUGR	1380	8

#### 4.2.2. Προφίλ ασθενών και κριτήρια κατάταξης των δειγμάτων σε κατηγορίες

Συνολικά απομονώθηκαν 21 δείγματα. Υπήρξαν 17 δείγματα από μονήρεις κήσεις και δύο ζεύγη δειγμάτων από δίδυμες κήσεις: ένα ζεύγος από διχοριακά δίδυμα και ένα ζεύγος από μονοχοριακά διαμνιακά δίδυμα. Επομένως, ο συνολικός αριθμός των εγκών ήταν 19.

Παρακάτω αναφέρεται επιγραμματικά το προφίλ κήσης σε κάθε περίπτωση και το σκεπτικό κατηγοριοποίησης του κάθε δείγματος:

### 1<sup>ο</sup> δείγμα (M1)

Το δείγμα M1 προέρχεται από II τόκο μητέρα 21 ετών με προηγηθείσα καισαρική τομή προ ζετίας που εισάγεται στις 35 εβδομάδες κύησης με πρόωρες συστολές. Από τον υπερηχογραφικό έλεγχο το βάρος του εμβρύου εκτιμάται στην 2,9<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση και τίθεται η υποψία συμμετρικής υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης. Οι τιμές της περιφέρειας της κεφαλής, της περιφέρειας της κοιλιάς και του μήκους του μηριαίου του εμβρύου βρίσκονται συμμετρικά σε αντίστοιχες χαμηλές θέσεις. Τα ντόπλερ του εμβρύου στην ομφαλική (PI= 0,92, RI= 0,58) και μέση εγκεφαλική αρτηρία (PI= 1,42) ήταν φυσιολογικά. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 36+2 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 9 και βάρος γέννησης 2320 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 8,4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **SGA**.

### 2<sup>ο</sup> δείγμα (M2)

Το δείγμα M2 προέρχεται από I τόκο μητέρα 36 ετών με σακχαρώδη διαβήτη κύησης υπό ινσουλίνη που εισάγεται με γνωστή υπολειπόμενη ανάπτυξη στις 36+2 εβδομάδες. Από τον υπερηχογραφικό έλεγχο το βάρος του εμβρύου εκτιμάται στην 2,7<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση και τίθεται η υποψία συμμετρικής υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης. Οι τιμές της περιφέρειας της κεφαλής, της περιφέρειας της κοιλιάς και του μήκους του μηριαίου του εμβρύου βρίσκονται συμμετρικά σε αντίστοιχες χαμηλές θέσεις. Η ανάλυση φάσματος ντόπλερ του εμβρύου στην ομφαλική (PI= 0,70, RI= 0,52) και μέση εγκεφαλική αρτηρία (PI= 1,52) ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 36+6 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με

APGAR Score 9 και βάρος γέννησης 2260 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR**.

### 3<sup>ο</sup> δείγμα (**M3**)

Το δείγμα M3 προέρχεται από 42<sup>η</sup> πρωτοτόκο μητέρα με IVF σύλληψη που πρωτοεισάγεται για στενή παρακολούθηση στις 34+6 εβδομάδες κύησης με υπερηχογραφική διάγνωση συμμετρικής υπολειπόμενης ανάπτυξης περί την 4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση. Η ανάλυση φάσματος ντόπλερ του εμβρύου στην ομφαλική (PI= 1,04, RI= 0,65) και μέση εγκεφαλική αρτηρία (PI= 1,74) ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 36+6 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό θήλυ έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 2170 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 2,4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR**.

### 4<sup>ο</sup> δείγμα (**M4**)

Το δείγμα M4 προέρχεται από I τόκο μητέρα 31 ετών που εισάγεται για παρακολούθηση στις 28+5 εβδομάδες με διάγνωση υπολειπόμενης εμβρυϊκής ανάπτυξης και προδρομικό πλακούντα. Στο υπερηχογράφημα εισαγωγής παρατηρείται διαλείπουσα απουσία τελοδιαστολικού κύματος στην ομφαλική αρτηρία και εκτιμώμενο υπερηχογραφικό βάρος περί τα 790 γραμμάρια που αντιστοιχεί σε 0,3<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση. Οι τιμές της περιφέρειας της κεφαλής, της περιφέρειας της κοιλιάς και του μήκους του μηριαίου του εμβρύου βρίσκονται συμμετρικά σε λίαν χαμηλές εκατοστιαίες θέσεις. Η ανάλυση φάσματος ντόπλερ του εμβρύου στην ομφαλική (PI= 1,86, RI= 0,91) και μέση εγκεφαλική αρτηρία (PI= 1,26) δημιουργεί συνθήκες ανακατανομής της εμβρυϊκής κυκλοφορίας, αλλά με θετικό

κύμα α στον φλεβώδη πόρο. Η μητέρα τίθεται υπό στενή παρακολούθηση. Παρέμεινε νορμοτασική καθ' όλη τη νοσηλεία και δεν ανέπτυξε δείκτες τοξιναιμίας. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 34+1 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 940 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 0<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR** και μάλιστα **βαρύ**.

5<sup>ο</sup> και 6<sup>ο</sup> δείγμα (**M5** και **M6**)

Τα δείγματα **M5** και **M6** προέρχονται από δίδυμο διχοριακή κύηση IVF από πρωτότοκο μητέρα 30 ετών. Η έγκυος εισήχθη στις 33 εβδομάδες κύησης με υπερηχογραφική διάγνωση υπολειπόμενης ανάπτυξης και στα δύο έμβρυα και ολιγάμνιο και στους δύο σάκους κύησης. Οι αντίστοιχες εκατοστιαίες θέσεις των εμβρύων στην υπερηχογραφική εκτίμηση βάρους ήταν 1,5<sup>η</sup> και 1,9<sup>η</sup> αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό ήταν ότι η περίμετρος της κοιλιάς υπολειπόταν και στα δύο έμβρυα σημαντικά σε σχέση με τις περιμέτρους της κεφαλής και τα μήκη των μηριαίων οστών. Από τον βιοχημικό – τοξιναιμικό έλεγχο της μητέρας ο μόνος παράγοντας που ήταν αυξημένος ήταν το ουρικό οξύ με τιμή 7,3 mg/dl. Προγραμματίζεται καισαρική τομή στις 34+2 εβδομάδες κύησης. Το πρώτο έμβρυο είναι θήλυ, έχει βάρος γέννησης 1660 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 1,4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση, και APGAR Score 9, ενώ το δεύτερο έμβρυο είναι άρρεν, έχει βάρος γέννησης 1730 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 2,3<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση, και APGAR Score 9. Τα δείγματα ταξινομούνται ως **IUGR** και μάλιστα, σε δίδυμο διχοριακή κύηση και συγχρονισμένης υπολειπόμενης ανάπτυξης.

#### 7<sup>ο</sup> δείγμα (M7)

Το δείγμα **M7** προέρχεται από δευτεροτόκο μητέρα 39 ετών με προηγηθείσα καισαρική τομή προ 11ετίας που πραγματοποιήθηκε την 38<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης σε έμβρυο βάρους 2750 γραμμαρίων που αντιστοιχούσε σε 16<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση. Ο λόγος της καισαρικής τομής αφορούσε εμπλοκή του ομφαλίου λώρου. Στην παρούσα κύηση διαπιστώνεται υπερηχογραφικά υπολειπόμενη ανάπτυξη περί την 4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση με φυσιολογικά ντόπλερ. Προγραμματίζεται καισαρική τομή στις 36+2 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό θήλυ έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 2180 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 4,3<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR**.

#### 8<sup>ο</sup> δείγμα (M8)

Το δείγμα **M8** προέρχεται από πρωτοτόκο μητέρα 27 ετών με σακχαρώδη διαβήτη κύησης υπό δίαιτα που εισάγεται για παρακολούθηση στις 35+4 εβδομάδες κύησης λόγω γνωστής υπολειπόμενης ενδομήτριας ανάπτυξης και μη καθησυχαστικού καρδιοτοκογραφήματος. Στο υπερηχογράφημα εισαγωγής παρατηρείται ανάπτυξη στην 6,5<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση. Οι τιμές της περιφέρειας της κεφαλής, της περιφέρειας της κοιλιάς και του μήκους του μηριαίου του εμβρύου βρίσκονται συμμετρικά σε αντίστοιχες χαμηλές θέσεις, όλες πάνω από την αντίστοιχη 5<sup>η</sup> εκατοστιαία. Η ανάλυση φάσματος ντόπλερ του εμβρύου στην ομφαλική (PI= 0,83, RI= 0,57) και μέση εγκεφαλική αρτηρία (PI= 1,7) ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 36+5 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό θήλυ έμβρυο με APGAR Score 9 και βάρος γέννησης 2400 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 8,6<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **SGA**.

#### 9<sup>ο</sup> δείγμα (M9)

Το δείγμα **M9** προέρχεται από δευτεροτόκο μητέρα 41 ετών με σακχαρώδη διαβήτη κύησης υπό δίαιτα και προηγηθείσα καισαρική τομή προ 5ετίας στις 40 εβδομάδες κύησης και βάρος γέννησης νεογνού 3240 γραμμάρια που χαρακτηρίζεται εντός των φυσιολογικών ορίων. Το έμβryo προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 38+1 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβryo με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 3204 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 48,4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**.

#### 10ο δείγμα (M10)

Το δείγμα **M10** προέρχεται από τεταρτοτόκο μητέρα 37 ετών με τρεις προηγηθείσα καισαρική τομή. Ο βιοχημικός έλεγχος δεν ανέδειξε παθολογικές τιμές και η μελέτη ντόπλερ ήταν φυσιολογική. Το έμβryo προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 38+1 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό θήλυ έμβryo με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 2610 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 13,8<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**.

#### 11<sup>ο</sup> δείγμα (M11)

Το δείγμα **M11** προέρχεται από πρωτοτόκο μητέρα 31 ετών που εισάγεται ως SGA έμβryo στις 30+2 εβδομάδες κύησης με ολιγάμνιο. Στον υπερηχογραφικό έλεγχο εισαγωγής η ανάλυση φάσματος ντόπλερ του εμβρύου στην ομφαλική (PI= 1,04, RI= 0,68) ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων και η εκτιμώμενη εκατοστιαία θέση ήταν η 13<sup>η</sup>. Η

μητέρα παρέμεινε νορμοτασική και δεν σημείωσε παθολογικές βιοχημικές και αιματολογικές τιμές. Το ολιγάμνιο παρέμεινε. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 32+1 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό θήλυ έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 1670 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 15,7<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**.

#### 12<sup>ο</sup> δείγμα (M12)

Το δείγμα **M12** προέρχεται από πρωτοτόκο μητέρα 25 ετών που εισάγεται στις 33+3 εβδομάδες κύησης με έμβρυο υπολειπόμενης ανάπτυξης για παρακολούθηση. Στην εισαγωγή η εκτιμώμενη εκατοστιαία θέση του εμβρύου είναι η 2<sup>η</sup>. Οι αντιστάσεις στην ομφαλική αρτηρία αρχικά βρίσκονται εντός των ανώτερων φυσιολογικών επιπέδων (PI = 1,25) με PI=1,65 στην μέση εγκεφαλική αρτηρία, ενώ κατά τη διάρκεια των επόμενων ημερών η εικόνα επιδεινώνεται με έντονη ανακατανομή ροών που συνέβαλε στην απόφαση για περάτωση της κύησης. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 35+5 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 1710 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 0,4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR**.

#### 13<sup>ο</sup> δείγμα (M13)

Το δείγμα **M13** προέρχεται από πρωτοτόκο μητέρα 24 ετών που εισάγεται στις 31+6 εβδομάδες κύησης με έμβρυο υπολειπόμενης ανάπτυξης και ολιγάμνιο για παρακολούθηση. Η ανάλυση φάσματος ντόπλερ του εμβρύου στην ομφαλική (PI= 1,1, RI= 0,7) και μέση



εγκεφαλική αρτηρία (PI= 1,66) ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 35+6 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό θήλυ έμβρυο με APGAR Score 7 και βάρος γέννησης 1770 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 3,5<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR**.

#### 14<sup>ο</sup> δείγμα (M14)

Το δείγμα **M14** προέρχεται από πρωτοτόκο μητέρα 37 ετών που εισάγεται στις 39+3 εβδομάδες για προγραμματισμένη καισαρική τομή (επιθυμία μητέρας). Γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 9 και βάρος γέννησης 3470 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 56,1<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**.

#### 15<sup>ο</sup> και 16<sup>ο</sup> δείγμα (M15 και M16)

Το δείγμα **M15** και το δείγμα **M16** προέρχονται από μονοχοριακή διαμνιακή δίδυμο κύηση σε δευτεροτόκο μητέρα 28 ετών. Η προηγούμενη κύησή της ήταν μονήρης, τελειόμηνη και είχε πραγματοποιηθεί προ έτους με φυσιολογικό τοκετό, ενώ το βάρος του εμβρύου ήταν φυσιολογικό. Στην τρέχουσα κύηση πραγματοποιείται εισαγωγή στις 32+4 εβδομάδες κύησης λόγω υπερηχογραφικής έντονης διαφοράς βάρους στα έμβρυα. Τα ντόπλερ και η ποσότητα αμνιακού υγρού είναι φυσιολογικά και στα δύο έμβρυα. Η διαφορά αποδίδεται σε selective IUGR του πρώτου εμβρύου. Δεν τίθεται υποψία για σύνδρομο ενδομήτριας μετάγγισης διδύμων. Η καισαρική τομή πραγματοποιείται στις 34+1 εβδομάδες. Προηγήθηκε επεισόδιο δύσπνοιας της εγκύου με αυξημένες τιμές d-

dimers όπου τίθεται η υπογία πνευμονικής εμβολής. Το πρώτο έμβρυο είναι ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 1940 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 9,1η εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **SGA**. Το δεύτερο έμβρυο είναι ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 6 και βάρος γέννησης 3470 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 89,7<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**

#### 17<sup>ο</sup> δείγμα (**M17**)

Το δείγμα **M17** προέρχεται από πρωτοτόκο μητέρα ηλικίας 38 ετών με σύλληψη IVF και γνωστή υπολειπόμενη ανάπτυξη και καρδιοπάθεια του εμβρύου (τετραλογία Fallot). Η εισαγωγή γίνεται στις 35+4 εβδομάδες κύησης. Η υπερηχογραφική εκτίμηση ανάπτυξης τοποθετεί το έμβρυο στην 3,3<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση, το αμνιακό υγρό είναι φυσιολογικό, ενώ η μελέτη ντόπλερ στην ομφαλική αρτηρία (PI= 0,98) και στην μέση εγκεφαλική αρτηρία (PI = 1,51) είναι εντός των φυσιολογικών ορίων. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 37+3 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 2240 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 2,3<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR**.

#### 18<sup>ο</sup> δείγμα (**M18**)

Το δείγμα **M18** προέρχεται από πρωτοτόκο μητέρα ηλικίας 32 ετών που εισάγεται στις 32+6 εβδομάδες λόγω πρόωρων συσπάσεων και μειωμένου αμνιακού υγρού. Καθ' όλη τη διάρκεια της νοσηλείας οι βιοχημικές και αιματολογικές παράμετροι βρίσκονται εντός των φυσιολογικών ορίων και η έγκυος παραμένει νορμοτασική. Τα ντόπλερ παραμένουν

εντός των φυσιολογικών ορίων (PI=0,6 στην ομφαλική αρτηρία). Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 36+3 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό θήλυ έμβρυο με APGAR Score 9 και βάρος γέννησης 2530 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 17,6<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**.

#### 19<sup>ο</sup> δείγμα (M19)

Το δείγμα **M19** προέρχεται από δευτεροτόκο μητέρα ηλικίας 32 ετών με προηγηθείσα καισαρική τομή προ δετίας. Η προηγούμενη κύηση ήταν τελειόμηνος, στις 38 εβδομάδες και το βάρος του εμβρύου ήταν 3800 γραμμάρια, σαφώς εντός των φυσιολογικών ορίων. Στην τρέχουσα κύηση η καισαρική τομή πραγματοποιείται στις 38+6 εβδομάδες κύησης. Γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 9 και βάρος γέννησης 3700 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 79,6<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**.

#### 20<sup>ο</sup> δείγμα (M20)

Το δείγμα **M20** προέρχεται από δευτεροτόκο μητέρα ηλικίας 40 ετών με προηγηθείσα καισαρική τομή προ 10ετίας. Αναφέρεται ότι αυτή πραγματοποιήθηκε τότε στις 35+4 εβδομάδες κύησης με βάρος νεογνού 1930 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 2,1<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση, λόγω υπολειπόμενης ανάπτυξης και παθολογικών ντόπλερ. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 38+5 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό έμβρυο με APGAR Score 9 και βάρος γέννησης 2910 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 18,8<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **CONTROL**.

## 21<sup>ο</sup> δείγμα (M21)

Το δείγμα **M21** προέρχεται από δευτεροτόκο μητέρα ηλικίας 32 ετών με προηγηθείσα καισαρική τομή προ 4ετίας. Αναφέρεται ότι αυτή πραγματοποιήθηκε σε τελειόμηνο κύηση (δεν διευκρινίζεται εβδομάδα με βάρος νεογνού πάνω από 3200 γραμμάρια. Στην τρέχουσα κύηση πραγματοποιείται εισαγωγή για παρακολούθηση στις 25+6 εβδομάδες λόγω βαριάς υπολειπόμενης ανάπτυξης και ολιγαμνίου. Καθ' όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης οι μελέτες ντόπλερ ήταν φυσιολογικές (PI=0,86 στην ομφαλική αρτηρία και PI=1,45 στην μέση εγκεφαλική αρτηρία), ενώ η εκατοστιαία θέση στην υπερηχογραφική εκτίμηση βάρους βρίσκονταν στην 0,1<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση. Επίσης και οι βιοχημικές και αιματολογικές παράμετροι δεν διαταράχθηκαν. Η έγκυος δεν παρουσίασε αυξημένη αρτηριακή πίεση. Το έμβρυο προγραμματίζεται για καισαρική τομή στις 33+4 εβδομάδες κύησης και γεννιέται ένα φυσιολογικό άρρεν έμβρυο με APGAR Score 8 και βάρος γέννησης 1380 γραμμάρια που αντιστοιχεί στην 0,4<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση ανάπτυξης. Το δείγμα ταξινομείται ως **IUGR**

### 4.2.3. Λήψη και μεταφορά του βιολογικού υλικού

Κατά τη διάρκεια της καισαρικής τομής των παραπάνω περιπτώσεων υπήρχε αυτοπρόσωπη παρουσία του γράφοντος εντός της χειρουργικής αίθουσας με στολή χειρουργείου για την απομόνωση του δείγματος, χωρίς επίσημη συμμετοχή στη σύνθεση της χειρουργικής ομάδας, ώστε να υπάρχει δυνατότητα απεμπλοκής μετά την λήψη του δείγματος.

Η χειρουργική ομάδα ήταν ενήμερη για τον σκοπό της μελέτης ώστε το σημείο απολίνωσης του ομφαλίου λώρου να βρίσκεται όσο το δυνατόν περιφερικότερα από την έκφυση της ομφαλίδος από τον πλακούντα.

Μετά την υστεροτομία ο πλακούντας και το τμήμα της ομφαλίδος μαζί με την λαβίδα που έφερε παραλαμβάνονταν από τον γράφοντα και τοποθετούνταν σε άσηπτο μεταλλικό δοχείο επί άσηπτου επικουρικού δίσκου εργαλειοδοσίας που είχε διατεθεί ειδικά για το σκοπό αυτό ώστε να μην διαταράσσει τη ροή εργαλειοδοσίας. Ακολουθούσε ταχεία οπτική επισκόπηση του πλακούντα για τυχόν ελλείμματα όπως προβλέπεται από το πρωτόκολλο τοκετών και τοποθέτηση δύο (2) αιμοστατικών λαβίδων. Η πρώτη εξ' αυτών τοποθετούνταν στην έκφυση του ομφαλίου λώρου πλησίον του πλακούντα και η δεύτερη σε απόσταση 10 cm από αυτήν. Ακολουθούσε εκτομή εκατέρωθεν και επί τα εκτός των λαβίδων υπό άσηπτες συνθήκες με χειρουργικό ψαλίδι και προσεκτική κατακόρυφη τοποθέτησή των τμημάτων ομφαλίδος σε στερεωμένο κατακόρυφο στείρο δοχείο Falcon με διαδοχική αφαίρεση των λαβίδων και με επιμέλεια ώστε να μην έρθει σε επαφή το δείγμα με το χείλος ή τα εξωτερικά τοιχώματα του δοχείου μεταφοράς και να μην υπάρχει αιματηρή ρύπανσή του εξωτερικού τοιχώματος. Ακολουθούσε τοποθέτηση του βιδωτού πώματος υπό άσηπτες χειρουργικές συνθήκες, η απομάκρυνσή του δοχείου Falcon από τη χειρουργική αίθουσα και η εγγραφή των στοιχείων αναγνώρισης του δείγματος (Barcode) στο εξωτερικό τοίχωμά.

Τα δοχεία Falcon έφεραν μέχρι τη μεσότητά τους ειδικό μέσο συντήρησης (διάλυμα PBS 5% v/v FCS) που είχε δημιουργηθεί την προηγούμενη ημέρα και φυλάσσονταν εντός ψυγείου σε θερμοκρασία 5° C μέχρι λίγα λεπτά προ της λήψης του δείγματος. Μετά την

τοποθέτηση του κοίλου δείγματος (ομφαλίδα) η στάθμη του υγρού ανέρχονταν ελαφρά και ουδέποτε έφτασε σε οριακό σημείο υπερχειλίσης.

Ακολουθούσε η άμεση (εντός δεκαλέπτου) και σε κατακόρυφη θέση ισοθερμική και χωρίς έκθεση στο φως μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο.

Κλινικά δεδομένα και πληροφορίες ήταν διαθέσιμα για όλες τις περιπτώσεις. Οι δότριες είχαν δώσει γραπτή συγκατάθεση για τη χρήση του βιολογικού τους υλικού για ερευνητικούς σκοπούς.

Τονίζεται ότι η περιοχή δειγματοληψίας των ομφαλίδων επιλέχθηκε καθώς σε αυτήν παρατηρείται αυξημένος αριθμός μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (Mesenchymal Stem Cells, MSC).

#### **4.2.4. Παραλαβή και κατεργασία των δειγμάτων**

Ακολούθως για κάθε δείγμα πραγματοποιούνταν η απομόνωση των **μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs)** στο Κέντρο Ανοσολογίας και Ανοσοθεραπείας του Καρκίνου του Α.Ο.Ν.Α «Ο Άγιος Σάββας» κάτω από την επίβλεψη της Δρ. Λουίζας Μαχαίρα και της συντονίστριας έρευνας του Κέντρου Δρ Σόνιας Περές<sup>+</sup>, με την σύμφωνη γνώμη του Αναπληρωτή Διευθυντή του Κέντρου Δρ. Κωνσταντίνου Μπαξεβάνη. Το κέντρο είναι πιστοποιημένο και διαθέτει όλο τον εργαστηριακό εξοπλισμό για την διενέργεια κυτταροκαλλιιεργειών, φαινοτυπικού και λειτουργικού χαρακτηρισμού των κυττάρων και μοριακών αναλυτικών τεχνικών.

#### **4.2.5. Απομόνωση και συνθήκες καλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ομφάλιου λώρου**

Για την απομόνωση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από τα δείγματα ομφαλίδος πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ξεχωριστά η ακόλουθη διαδικασία:

Κάτω από στείρες συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow) BH-EN-2004 (Faster, Italy) απομονώθηκε τμήμα του ομφαλίου λώρου μήκους περίπου 5 cm, χωρίς αιμάτωμα και αφαιρέθηκαν τα αιμοφόρα αγγεία.

Η περιοχή ξεπλύθηκε δις με PBS-Dulbecco (Merck SA, Greece) και τεμαχίσθηκε σε μικρά κομμάτια. Στη συνέχεια, τα κομμάτια τοποθετήθηκαν σε T175 φιάλη καλλιέργειας (Greiner Bio-One GmbH, Merck SA, Greece), που περιείχε αMEM σε τελική συγκέντρωση 20% v/v FCS και μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (Pen/Strep) σε τελική συγκέντρωση 1%.

Για την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων η επώαση γίνονταν στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 95% αέρα και 5% CO<sub>2</sub> εντός επωαστικού κλιβάνου (Thermo Scientific, USA). Μετά από 24 ώρες τα μικρά κομμάτια απομακρύνονταν και το καλλιεργητικό υλικό ανανεώνονταν. Η ανανέωση του καλλιεργητικού υλικού πραγματοποιούνταν κάθε 3-4 ημέρες και τα κύτταρα παρατηρούνταν σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Euromex, Holland). Το χρονικό αυτό σημείο αποτελούσε το **Passage 0 (P0)**.

Δύο με τρεις εβδομάδες μετά την αρχική καλλιέργεια, και εφόσον είχαν σχηματιστεί πυκνές αποικίες, πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανακαλλιέργεια που αναφέρεται ως **Passage 1 (P1)** με διάλυμα 0.25% v/v τρυψίνης-EDTA (1x, Gibco). Το διάλυμα αυτό προστέθηκε στα κύτταρα και πραγματοποιήθηκε επώαση για 5 λεπτά στον επωαστικό θάλαμο μέχρι να ξεκολλήσουν αυτά από το υπόστρωμα.

Σε νέα φιάλη τοποθετήθηκαν 250 κύτταρα ανά  $\text{cm}^2$  με καλλιεργητικό υλικό αMEM με 10% v/v FCS. Το καλλιεργητικό υλικό ανανεωνόταν 2 φορές την εβδομάδα και κάθε νέα ανακαλλιέργεια πραγματοποιούνταν όταν η πυκνότητα της καλλιέργειας άγγιζε το 80% της επιφάνειας της φιάλης.

Τα υπόλοιπα κύτταρα καταψύχονταν στους  $-80^\circ\text{C}$ , για λιγότερο από έξι μήνες. Σε διάστημα 2-4 εβδομάδων, πραγματοποιήθηκαν 4 ανακάλλιέργειες των MSCs (passage P0-P4).

#### **4.2.6. Κατάψυξη κυττάρων**

Για την κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε αρχικά πλύση με 1X PBS για να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και τα παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού αφού πρώτα είχε απορριφθεί το παλιό θρεπτικό μέσο.

Παρασκευάστηκε διάλυμα 1X PBS με 10% τρυψίνη (0.5% Trypsin-EDTA (10X) της Gibco) το οποίο προστέθηκε στα κύτταρα για 5 λεπτά στον επωαστικό θάλαμο μέχρι να ξεκολλήσουν από το υπόστρωμα. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη θρεπτικού μέσου για την απενεργοποίηση της τρυψίνης και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1200 rpm (rpm= revolutions per minute = περιστροφές ανά λεπτό) για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η παλέτα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 0.9ml FCS. Ακολούθησε προσθήκη 10% του τελικού όγκου DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Applichem GmbH) (για την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων πάγου) και ύστερα από γρήγορη και καλή ανάδευση το διάλυμα διαμοιράστηκε σε ειδικά σωληνάκια του 1 mL τα οποία τοποθετήθηκαν για φύλαξη σε υγρό άζωτο.



#### 4.2.7. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας και του αριθμού των κυττάρων

Η μέτρηση του αριθμού κυττάρων και η εκτίμηση του ποσοστού επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής του κυανού του τρυπανίου (**Trypan blue**). Υπενθυμίζεται ότι το κυανό του τρυπανίου διαπερνά την πλασματική μεμβράνη μόνο των νεκρών κυττάρων, με αποτέλεσμα να τους προσδίδει μπλε χρώμα και να τα καθιστά ευδιάκριτα από τα ζωντανά κύτταρα που παραμένουν διαυγή. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο τύπου **Neubauer** με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου.

Συνοπτικά, 50-100  $\mu\text{L}$  κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρθηκαν σε φρεάτιο μικροπλάκας 96 φρεατίων και αναμείχθηκαν με ορισμένη ποσότητα χρωστικής Trypan blue σε τελική συγκέντρωση χρωστικής 0.2%.

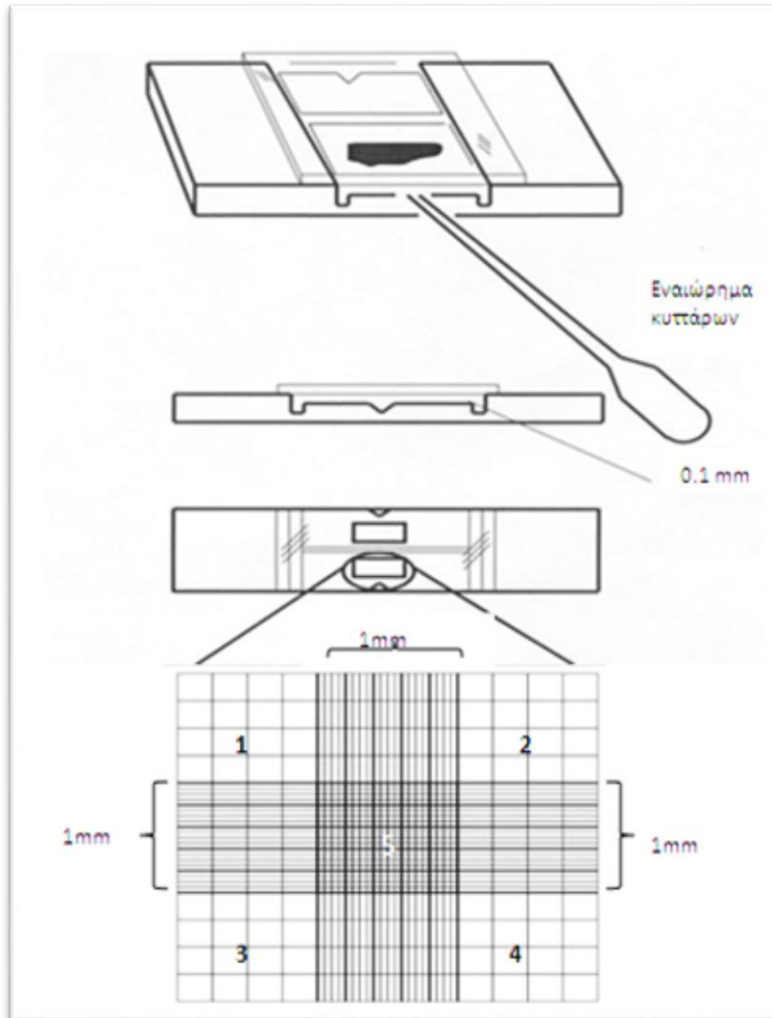
Μετά την τοποθέτηση καλυπτρίδας, μικρή ποσότητα του κυτταρικού εναιωρήματος μεταφέρθηκε στο θάλαμο μέτρησης της πλάκας Neubauer, η οποία με τη βοήθεια τριχοειδικών φαινομένων απλώθηκε στη βαθμονομημένη επιφάνεια (Εικόνα 18).

Ο φακός εστιάστηκε στην περιοχή μέτρησης. Η τελευταία αποτελείται από κάθετες και οριζόντιες γραμμές και περιέχει εννέα επιμέρους μικρότερες περιοχές, ίσου εμβαδού ( $1 \text{ mm}^2$ ) και ίσου όγκου ( $0,1 \text{ mm}^3$ ). Η καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στα 25 κεντρικά τετράγωνα της δομής του σταυρού του αιμοκυτταρόμετρου. Μετρήθηκαν ξεχωριστά τα ζωντανά (άχρωμα) και τα νεκρά (μπλε) κύτταρα.

Υπολογίστηκε η συγκέντρωση και η βιωσιμότητα των κυττάρων από τις ακόλουθες σχέσεις:

Αριθμός κυττάρων/ mL διαλύματος = αριθμός ζωντανών κυττάρων  $\times$  συντελεστής αραιώσης  $\times 10^4$  (για κάθε τετράγωνο 1,2,3,4 ή 5, **Εικόνα 18**)

% βιωσιμότητα = αριθμός ζωντανών κυττάρων  $\times 100$  / συνολικός αριθμός κυττάρων



**Εικόνα 18:** Αναπαράσταση της αιμοκυτταρομετρικής πλάκας τύπου Neubauer και της εικόνας του θαλάμου μέτρησης κατά την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο. Η κάθε περιοχή μέτρησης στο κέντρο του θαλάμου έχει πλευρές 1 mm, ενώ ο όγκος της μετά την τοποθέτηση της καλυπρίδας ισούται με  $0,1 \text{ mm}^3$ . Μπορούν να μετρηθούν τα κύτταρα στα τετράγωνα 1,2,3,4 ή 5.

#### 4.2.8. Χαρακτηρισμός μεσεγχυματικών κυττάρων με ανοσοφθορισμό

Πραγματοποιήθηκε η συλλογή κυττάρων από την καλλιέργεια και ακολούθησε έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα FACS (1xPBS + 2% FBS + 0.1% N<sub>3</sub>Na).

Στη συνέχεια, κατάλληλος αριθμός κυττάρων (περίπου 10<sup>5</sup>) επώαστηκε με τα κατάλληλα αντισώματα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Κάθε αντίδραση ανοσοφθορισμού πραγματοποιήθηκε σε 100μL τελικό όγκο. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων είχε προσδιοριστεί μετά από τιτλοδότηση του κάθε αντισώματος.

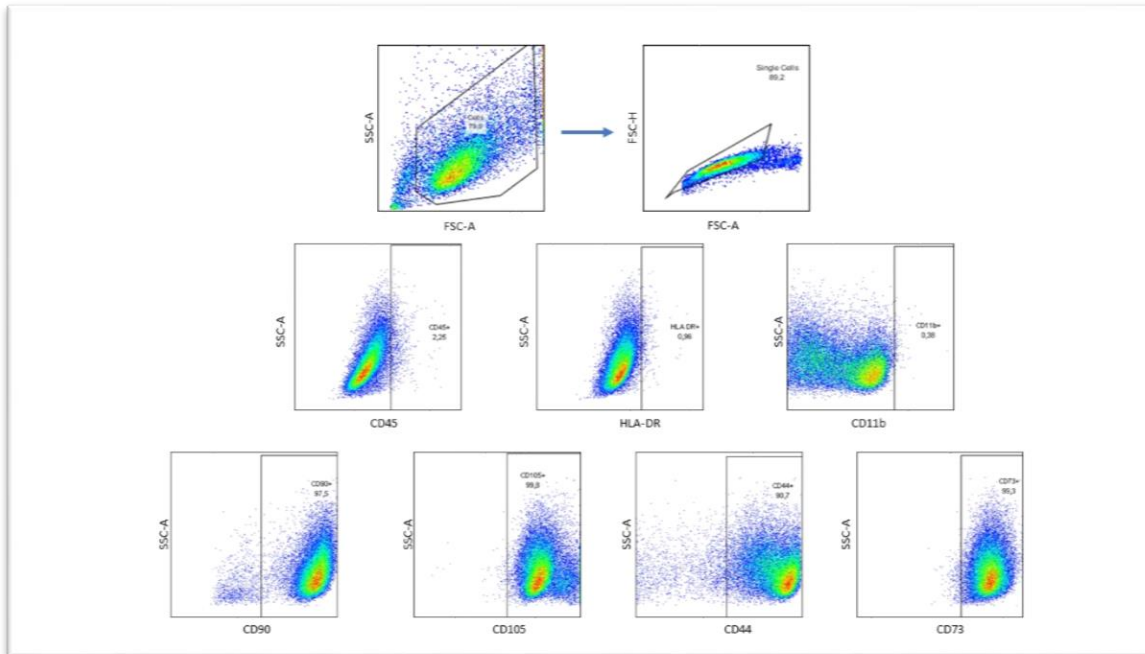
Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων ήταν τα εξής (Πίνακας 2): **CD45-FITC** (Clone: HI30), **CD44-PE/Cy7** (Clone: BJ18), **CD11b-APC/Cy7** (Clone: ICRF44), **HLA-DR-PE** (Clone: L243), **CD90-Briliant Violet 421** (Clone: 5E10), **CD105-APC** (Clone: 43A3), **CD73-PerCP5.5** (Clone: AD2) από την Biolegend.

**Πίνακας 2:** Επιφανειακοί δείκτες χαρακτηρισμού των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) και κριτήρια διαχωρισμού.

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	CD45	HLA-DR	CD11B	CD105	CD73	CD90	CD44
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	-	-	-	+	+	+	+

Μετά το πέρας των 15 λεπτών ακολούθησε έκπλυση (2x) των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα FACS για απομάκρυνση των αδέσμευτων αντισωμάτων. Στη συνέχεια επαναωρήθηκαν τα κύτταρα σε διάλυμα 1% παραφορμαλδεΰδης (PFA) σε PBS σε 200 μL τελικό όγκο.

Με **κυτταρομετρία ροής** (Εικόνα 19) ελέγχθηκε η έκφραση των επιφανειακών δεικτών για τον χαρακτηρισμό των MSCs. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν σε μηχάνημα **FACSCanto II** (BD, Becton Dickinson Biosciences, NJ, USA) και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το κατάλληλο αντίστοιχο του κατασκευαστή λογισμικό, **FACS DIVA** (BD Biosciences), καθώς και με το **FlowJo-V10**.



**Εικόνα 19.** Ενδεικτικά στικτογράμματα όπως προέκυψαν από την ανάλυση στο λογισμικό *FlowJo* για τον χαρακτηρισμό των μεσεγχυματικών κυττάρων ενός δείγματος. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα δεν εκφράζουν τους δείκτες *CD45*, *HLA-DR* και *CD11b*, ενώ είναι θετικά για τους δείκτες *CD90*, *CD105*, *CD44* και *CD73*.

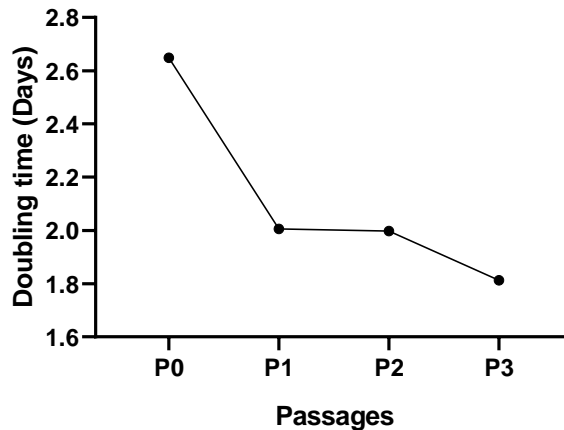
#### 4.2.9. Υπολογισμός χρόνου διπλασιασμού και διπλασιασμών πληθυσμού των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων στην πλάκα Neubauger που αναφέρθηκε παραπάνω αποσκοπεί στην ποσοτική εκτίμηση των στοιχείων πυκνότητας της κυτταροκαλλιέργειας μέσα από διάφορους δείκτες που εκφράζουν τα ποιοτικά της χαρακτηριστικά. Παρακάτω αναφέρονται διάφοροι σχετικοί δείκτες.

Ο χρόνος διπλασιασμού (**Doubling Time,  $T_D$** ) υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$T_D = \ln 2 * Dt / (\ln N_t - \ln N_0),$$

όπου, Dt είναι ο χρόνος σε ημέρες που μεσολαβεί από την αρχική καλλιέργεια μέχρι την ανακαλλιέργεια των κυττάρων,  $N_t$  ο αριθμός των κυττάρων κατά την ανακαλλιέργεια και  $N_0$  ο αριθμός των κυττάρων στην αρχική καλλιέργεια (Εικόνα 20).



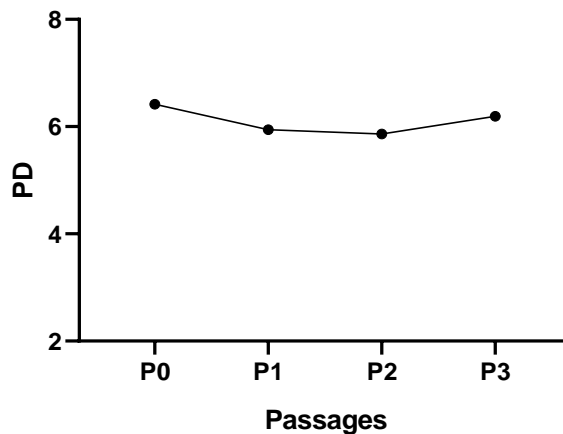
*Εικόνα 20. Χρόνος διπλασιασμού ( $T_D$ ) σε ημέρες μεταξύ των διαφορετικών ανακαλλιεργειών των κυττάρων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή*

Το σύνολο των διπλασιασμών του πληθυσμού (**Population Doublings, PD**)

υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$PD = (\log N_t - \log N_0) / \log 2,$$

όπου,  $N_t$  ο αριθμός των κυττάρων κατά την ανακαλλιέργεια και  $N_0$  ο αριθμός των κυττάρων στην αρχική καλλιέργεια (Εικόνα 21).



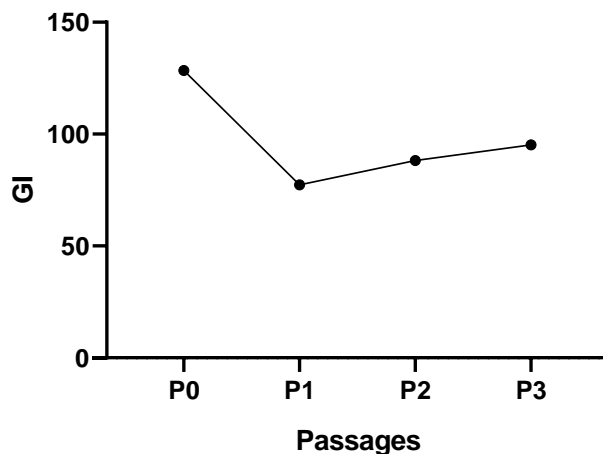
*Εικόνα 21. Σύνολο διπλασιασμών πληθυσμού (PD) των κυττάρων μεταξύ διαδοχικών ανακαλλιεργειών. Παρουσιάζεται η μέση τιμή*

#### 4.2.10. Υπολογισμός δείκτη αύξησης και σωρευτικού δείκτη αύξησης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων

Ο δείκτης αύξησης (**Growth Index, GI**) υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$GI = N_t / N_0,$$

όπου,  $N_t$  ο αριθμός των κυττάρων κατά την ανακαλλιέργεια και  $N_0$  ο αριθμός των κυττάρων στην αρχική καλλιέργεια (Εικόνα 22).



*Εικόνα 22. Δείκτης αύξησης (GI) μεταξύ των διαφορετικών ανακαλλιιεργειών των κυττάρων. Παρουσιάζεται η μέση τιμή*

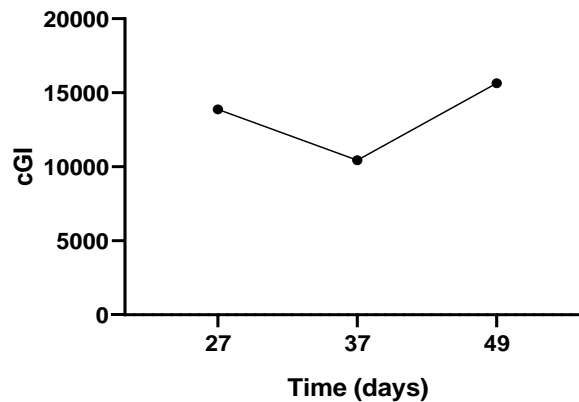
Ο σωρευτικός δείκτης αύξησης (cumulative Growth Index, cGI) υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$cGI = GI_n * GI_{n-1},$$

όπου,  $GI_n$  ο δείκτης αύξησης στην υπό εξέταση ανακαλλιέργεια και  $GI_{n-1}$  ο δείκτης αύξησης στην ακριβώς προηγούμενη ανακαλλιέργεια.

Παρατηρήσαμε πως ο δείκτης αύξησης παρουσιάζει μία πτώση από το Passage 0 στο passage 1, που πιθανά να δικαιολογείται από το γεγονός ότι τα MSCs που καλλιεργούνται δεν έχουν προσαρμοστεί στις συνθήκες καλλιέργειας, απουσία αυξητικών παραγόντων.

Σε μετέπειτα στάδια, ο δείκτης αύξησης σταθεροποιήθηκε καθώς τα κύτταρα προσαρμόστηκαν στις συνθήκες καλλιέργειας (Εικόνα 23).



*Εικόνα 23. Σωρευτικός δείκτης αύξησης (cGI) των κυττάρων μεταξύ διαδοχικών ανακαλλιεργειών. Παρουσιάζεται η μέση τιμή*

#### 4.2.11. Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα MSCs χρησιμοποιήθηκε το **Nucleospin RNA II kit**<sup>®</sup> (Macherey- Nagel GmbH&Co, Germany). Μετά την τρυψινοποίηση της κάθε καλλιέργειας (passage P0-P4), τα κύτταρα πλύθηκαν δις με διάλυμα PBS-Dulbecco (Biochrom AG) και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 500 x g. Στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων, είτε χρησιμοποιήθηκε απευθείας για την απομόνωση του ολικού RNA, είτε αποθηκεύτηκε στους -80°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Ακολουθήθηκε το κατάλληλο πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του ολικού RNA βασίζεται στη χρήση στηλών διοξειδίου του πυριτίου (SiO<sub>2</sub>), που επιτρέπουν την επιλεκτική και παροδική πρόσδεση του γενετικού υλικού στη στήλη. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι σε υψηλές συνθήκες αλατότητας τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεοτίδια εμφανίζουν μεγάλη συγγένεια ως προς τα θετικά φορτισμένα μόρια πυριτίου της μεμβράνης, με

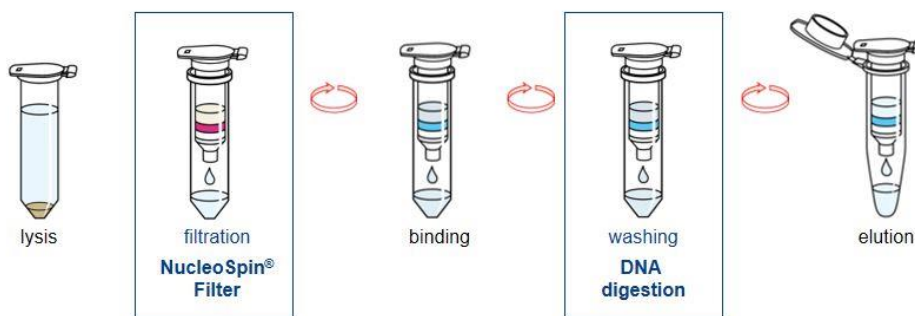


αποτέλεσμα τη δέσμευση τους στο εσωτερικό της. Η σχέση αυτή αναστρέφεται και το RNA αποδεσμεύεται κάτω από συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος με RNase-free H<sub>2</sub>O.

Το πρώτο βήμα για την απομόνωση του ολικού RNA είναι η λύση των κύτταρων με διάλυμα ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, ένα ισχυρό χαστροπικό διάλυμα που διασπά τα κύτταρα ενώ συγχρόνως απενεργοποιεί τις ριβονουκλεάσες, ενώ δημιουργεί τις απαραίτητες συνθήκες αλατότητας για την πρόσδεση του RNA στο φίλτρο πυριτίου. Προστίθεται επίσης διάλυμα που περιέχει αιθανόλη 70%. Η παρουσία αιθανόλης απομακρύνει τα κυτταρικά κατάλοιπα που πιθανώς έχουν παραμείνει στη μεμβράνη και κατακρημνίζει το γενετικό υλικό, ώστε κατά την έκλουσή του να μπορεί να απομακρυνθεί ολόκληρο.

Ένα από τα κυρίαρχα προβλήματα που πρέπει να υπερκεραστεί κατά τη διαδικασία απομόνωσης του RNA, είναι η παρουσία DNA, το οποίο επίσης προσδένεται στην μεμβράνη πυριτίου. Για την αποδόμηση και απομάκρυνση του DNA χρησιμοποιήθηκε διάλυμα rDNase (Εικόνα 24).

Το ξέπλυμα της μεμβράνης πυριτίου με διαφορετικά διαλύματα συμβάλει στην απομάκρυνση του άλατος, των μεταβολιτών και των λοιπών κυτταρικών στοιχείων.



**Εικόνα 24:** Σχηματική παράσταση ορισμένων βημάτων απομόνωσης mRNA με το *Nucleospin RNA II kit*®

Ακολουθεί το πρωτόκολλο της διαδικασίας βήμα προς βήμα.

- Λύση των κυττάρων. Προσθήκη RA1 Buffer και διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης.
- Διήθηση διαλύματος. Προσθήκη ολόκληρης της ποσότητας του διαλύματος σε NucleoSpin<sup>®</sup> Filter και φυγοκέντρηση.
- Δέσμευση του RNA. Προσθήκη αιθανόλης 70% στο ομογενοποιημένο διάλυμα, μεταφορά του διαλύματος σε NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Column και φυγοκέντρηση.
- Απομάκρυνση του άλατος από τη μεμβράνη πυριτίου. Προσθήκη του διαλύματος MDB και φυγοκέντρηση. Η απομάκρυνση του άλατος διευκολύνει την επακόλουθη πέψη με το ένζυμο rDNase.
- Πέψη του DNA. Πάνω στη μεμβράνη πυριτίου προστίθεται το διάλυμα DNase reaction mixture, ώστε να πραγματοποιηθεί η απομάκρυνση του γενομικού DNA. Πραγματοποιείται επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNase reaction mixture αποτελείται από το ένζυμο rDNase και το διάλυμα Reaction Buffer for rDNase.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης πυριτίου. Προσθήκη του διαλύματος Buffer RAW2 και φυγοκέντρηση. Για το δεύτερο και τρίτο ξέπλυμα γίνεται προσθήκη του διαλύματος Buffer RA3 και ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση.
- Έκλουση του RNA. Η μεμβράνη πυριτίου τοποθετείται σε καθαρό και ελεύθερο από ριβονουκλεάσες σωληνάριο Eppendorf και γίνεται προσθήκη RNase-free H<sub>2</sub>O και ακολουθεί φυγοκέντρηση και συλλογή του καθαρού ολικού RNA.

Το απομονωμένο ολικό RNA αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

#### 4.2.12. Ποσοτικός έλεγχος και έλεγχος καθαρότητας RNA

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του ολικού RNA που απομονώθηκε έγινε με φωτομετρία. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση (optical density, OD) του δείγματος στα 260nm και στα 280nm. Η πρώτη τιμή αντιπροσωπεύει την απόλυτη ποσότητα ( $1 \text{ OD}=40\mu\text{g/mL}$ ), ενώ ο λόγος των δύο τιμών ( $A_{260}/A_{280}$ ) χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος. Στο καθαρό ολικό RNA ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  ισούται περίπου με 2. Εάν το δείγμα περιέχει πρωτεϊνικές προσμείξεις, τότε ο λόγος μειώνεται.

#### 4.2.13. Αντίστροφη μεταγραφή και σύνθεση cDNA

Η μέθοδος βασίζεται στη μοναδική ικανότητα του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών να συνθέτει μόρια DNA με μήτρα μόρια RNA. Χρησιμοποιήθηκε 1  $\mu\text{g}$  ολικού RNA για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) με τη χρήση του PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa).

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, 1  $\mu\text{g}$  ολικού RNA αναμίχθηκε με 1  $\mu\text{L}$  τυχαίων εξαμερών (συγκέντρωσης 100  $\mu\text{M}$ ) και oligo dT εκκινήτων (συγκέντρωσης 50  $\mu\text{M}$ ). Χρησιμοποιώντας τόσο τα τυχαία εξαμερή, όσο και τους εκκινήτες εξασφαλίζεται η σύνθεση επαρκούς ποσότητας cDNA. Έγινε επίσης προσθήκη 1  $\mu\text{g}$  του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (PrimeScript RT Enzyme Mix I) και 4  $\mu\text{g}$  ρυθμιστικού διαλύματος 5x PrimeScript Buffer. Συμπληρώθηκε RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  μέχρι τελικού όγκου 20  $\mu\text{L}$ .

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής σε θερμικό κυκλοποιητή (SimpliAmp Thermal Cycler, Thermo Fisher) ακολουθήθηκαν οι εξής συνθήκες επώασης:

- Αντίστροφη μεταγραφή: 37°C για 15 λεπτά
- Θερμική επεξεργασία για την απενεργοποίηση του ενζύμου: 85 °C για 5 δευτερόλεπτα
- Αναμονή: 4°C

Το συμπληρωματικό DNA (cDNA) αποθηκεύτηκε στους -20 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

#### **4.2.14. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR)**

Η μέθοδος της PCR βασίζεται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων των νουκλεοτιδίων στη διπλή έλικα του DNA. Για την ενίσχυση μόνο της περιοχής του DNA που μας ενδιαφέρει, είναι απαραίτητη η χρήση μορίων εκκινητών (primers), οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί ως προς το τμήμα στόχο, καθώς και η ύπαρξη του ενζύμου Taq DNA Polymerase, το οποίο προσθέτει νουκλεοτίδια κατά τη φορά 5' → 3', με μήτρα τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA, χρησιμοποιώντας ως δομικά στοιχεία ελεύθερα τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs).

Κάθε κύκλος ενίσχυσης της PCR αποτελείται από τρία επιμέρους στάδια:

- την αποδιάταξη του γενετικού υλικού, με αύξηση της θερμοκρασίας (94-96°C) (Denaturation)
- τον υβριδισμό των εκκινητών, με μείωση της θερμοκρασίας στους 45-60°C (ανάλογα με τη θερμοκρασία των εκκινητών) (Annealing)

- την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA, στη βέλτιστη για το ένζυμο θερμοκρασία (Elongation)

Σήμερα έχουν δημιουργηθεί αρκετές παραλλαγές πέραν της κλασσικής PCR, όπως η αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR). Η βασική αρχή στην οποία στηρίζεται η τεχνολογία αυτή εμπεριέχει την αρχή λειτουργίας της συμβατικής PCR με κύρια διαφορά την ποσοτικοποίηση του προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης, ανιχνεύοντας ειδικό φθορισμό που εκλύεται από το συντιθέμενο προϊόν. Η διαδικασία αυτή απαιτεί τη χρήση μορίων φθορισμού για την ανίχνευση του προϊόντος που σχηματίζεται σε κάθε κύκλο και ένα ειδικό θερμοκυκλοποιητή για την ανίχνευση του φθορισμού που εκπέμπεται και την καταγραφή των αποτελεσμάτων. Ο φθορισμός αυτός, έχει ένταση ανάλογη της ποσότητας του προϊόντος που έχει συντεθεί. Το αποτέλεσμα της μέτρησης του φθορισμού ανά κύκλο είναι μία **καμπύλη ενίσχυσης (amplification curve)**.

Οι φάσεις που δομούν μια καμπύλη ενίσχυσης είναι τέσσερις:

- Βασική γραμμή (baseline): Ο φθορισμός δεν ξεπερνά την τιμή του ορίου που ορίζεται πάνω από ένα συγκεκριμένο μη ειδικό σήμα φθορισμού.
- Εκθετική φάση (exponential phase): Η εκπομπή φθορισμού είναι εκθετική και ανάλογη της αύξησης των αντιγράφων. Στη φάση αυτή τα συστατικά της PCR βρίσκονται σε περίσσεια. Επίσης, στη φάση αυτή, η ένταση του φθορισμού φτάνει ένα όριο καταγραφής (cycle threshold, Ct). Η τιμή Ct αντιστοιχεί στον κύκλο στον οποίο το προϊόν μας έφτασε στο σημείο threshold. Χαμηλότερη τιμή Ct υποδηλώνει υψηλότερη συγκέντρωση αρχικού υποστρώματος.

- Γραμμική φάση (linear phase): Τα συστατικά της PCR αρχίζουν να εξαντλούνται και παράγοντες ανασταλτικοί ως προς τον πολλαπλασιασμό αρχίζουν να συσσωρεύονται. Ο πολλαπλασιασμός του προϊόντος δεν είναι πλέον εκθετικός.
- Φάση κορεσμού (plateau phase): Η ενίσχυση του προϊόντος τελικά σταματά και η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε ένα plateau.

Στην παρούσα μελέτη, η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της έκφρασης εμβρυικών γονιδίων σε MSCs προερχόμενα από ομφάλιο λώρο. Η qPCR πραγματοποιήθηκε στο σύστημα Real Time PCR QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), με χρήση του το KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Karabiosystems).

Σχεδιάστηκαν οι **εκκινητές (primers)** που χρησιμοποιήθηκαν για τα επτά προς μελέτη γονίδια (**IGF2BP1, NANOG, SOX2, GLI1, P21, CMYC, OCT4**), καθώς και για το **γονίδιο αναφοράς** (Housekeeping gene), που στην προκειμένη περίπτωση είναι το **GAPDH**. παρουσιάζονται παρακάτω στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Ακολουθίες Εκκινητών (Primers) που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε γονίδιο που μελετήθηκε

<u>Gene</u>		<u>Primer sequence</u>	<u>Annealing Temperature</u>
<b>GAPDH</b>	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	59°C
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC	
<b>IGF2BP1</b>	<u>Forward</u>	GACCCAGTCCAAGATAGACG	60 °C
	Reverse	GTGTCCTTAGCCTCTTATGC	
<b>NANOG</b>	<u>Forward</u>	CCTGTGATTTGTGGCCTG	60 °C
	Reverse	GACAGTCTCCGTGTGAGGGAT	
<b>SOX2</b>	Forward	GTATCAGGAGTTGTCAAGGCAGAG	60 °C
	Reverse	TCCTAGTCTTAAAGAGGCAGCAAAC	
<b>GLI1</b>	Forward	GTGCAAGTCAAGCCAGAACA	59 °C
	Reverse	ATAGGGGCCTGACTGGAGAT	
<b>P21</b>	Forward	CAGCATGACAGATTTCTACCAC	60 °C
	Reverse	AGACTAAGGCAGAAGATGTAGAG	
<b>CMYC</b>	Forward	CCAGCAGCGACTCTGAGGA	59 °C
	Reverse	GAGCCTGCCTCTTTCCACAG	
<b>OCT4</b>	Forward	CTCCTGGAGGGCCAGGAATC	54 °C
	Reverse	CCACATCGGCCTGTGTATAT	

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της real-time PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης για κάθε δείγμα ήταν 20 µL. (Πίνακας 4)

**Πίνακας 4:** Πρωτόκολλο ανάμειξης στοιχείων στην real-time PCR

Component	Volume per reaction	Final concentration
PCR-grade water	6.8 $\mu$ L	
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10 $\mu$ L	1x
10 $\mu$ M forward primer	0.4 $\mu$ L	200 nM
10 $\mu$ M reverse primer	0.4 $\mu$ L	200 nM
Template cDNA	2 $\mu$ L	<20ng
50x ROX High/Low	0.4 $\mu$ L	1x

Οι συνθήκες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε η real-time PCR στο σύστημα **Real Time PCR QuantStudio 5<sup>®</sup>** προγραμματίστηκαν σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο και τις οδηγίες του κατασκευαστή (Πίνακας 5):

**Πίνακας 5:** Παράμετροι χρόνου και θερμοκρασίας στην real-time PCR.

Step	Temperature	Duration	Cycle
Enzyme activation	95 °C	20 sec	1
Denaturation/Annealing/ extension/data acquisition	95 °C	1 sec	40
	54-60 °C*	20 sec	
	72 °C	20 sec	
Dissociation	95 °C	1 sec	1

*\*Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται υβριδοποίηση εξαρτάται από το κάθε ζευγάρι εκκινητών (annealing temperature).*

Τα σχετικά επίπεδα mRNA των γονιδίων υπολογίστηκαν βάσει της **συγκριτικής μεθόδου  $\Delta\Delta C_t$**  και αντιπροσωπεύουν την **ποσότητα του γονιδίου στόχου ομαλοποιημένη ως προς το ενδογενές γονίδιο αναφοράς, GAPDH**, σε σχέση με ένα δείγμα



αναφοράς. Όλα τα εμβρυικά γονίδια (IGF2BP1, NANOG, SOX2, GLI1, P21, C MYC, OCT4) που διερευνήθηκαν στα MSC ομαλοποιήθηκαν προς μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα φυσιολογικού ομφάλιου λώρου (Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs).

Συγκεκριμένα, προκύπτει ο αριθμός  $\Delta Ct = Ct (\text{γονιδίου στόχου}) - Ct (\text{γονιδίου αναφοράς})$  για κάθε ένα γονίδιο που αντιπροσωπεύει την κανονικοποιημένη τιμή έκφρασης του. Η αφαίρεση αυτή απομακρύνει τις διαφορές στην έκφραση ανάμεσα στα διαφορετικά δείγματα. Η τιμή  $\Delta Ct$  ονομάζεται **τιμή κανονικοποιημένων πρωτογενών δεδομένων (normalized raw data)**. Στη συνέχεια, το  $\Delta Ct$  του κάθε γονιδίου για τον υπό εξέταση ασθενή αφαιρείται από αυτό του ίδιου γονιδίου για την ομάδα αναφοράς (UC-MSCs) και προκύπτει η τιμή  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{δείγματος υπό εξέταση}) - \Delta Ct (\text{δείγματος ομάδας αναφοράς})$  για το κάθε γονίδιο. Η σχετική έκφραση των γονιδίων των υπό εξέταση δειγμάτων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου υπολογίζεται από τον τύπο:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4.2.15. Στατιστική ανάλυση

Οι στατιστικές αναλύσεις και τα διαγράμματα που παρουσιάζονται έγιναν με χρήση του λογισμικού GraphPad Prism<sup>®</sup> version 8.4.3 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της διάμεσης τιμής (median) των επιπέδων έκφρασης (FC) κάθε γονιδίου στα διαφορετικά passages. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική στατιστική δοκιμασία Mann-Whitney U-test, Two-tailed, με επίπεδο σημαντικότητας  $P < 0.05$ .

## **4.3. Αποτελέσματα**

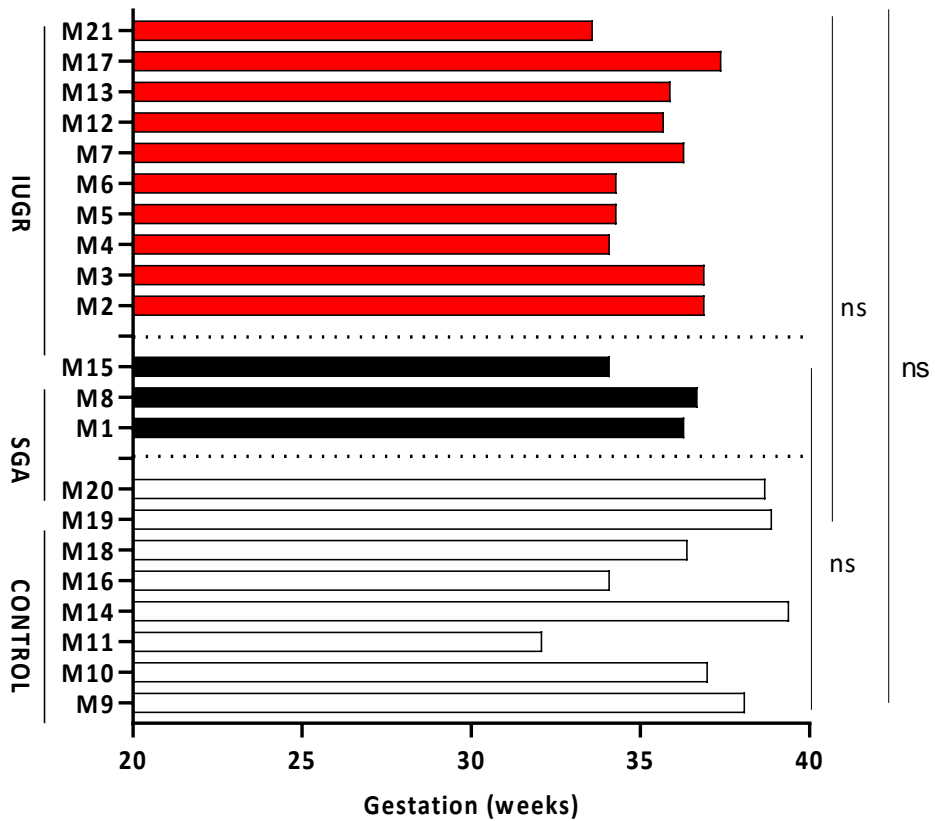
### **4.3.1. Συγκριτική ανάλυση περιγεννητικού αποτελέσματος**

#### **4.3.1.1. Εβδομάδα περάτωσης της κύησης**

Αναλύονται στατιστικά οι τρεις ομάδες (CONTROL, SGA, IUGR) ως προς την εβδομάδα περάτωσης της κύησης. Επειδή ο αριθμός των δειγμάτων είναι σχετικά μικρός, γίνεται χρήση μη παραμετρικών δοκιμασιών (Mann-Whitney U-test, Two-tailed).

Η ηλικία τοκετού με μορφή δεκαδικού αριθμού προκύπτει σε κάθε περίπτωση μετατρέποντας το μη ακέραιο σε εβδομάδες τμήμα της ηλικίας κύησης σε δεκαδικό αριθμό διαιρώντας τον αριθμό ημερών που δεν συμπληρώνουν εβδομάδα με το 7 και προσθέτοντας το πηλίκο (μέχρι δύο δεκαδικά ψηφία) στις ολόκληρες εβδομάδες κύησης.

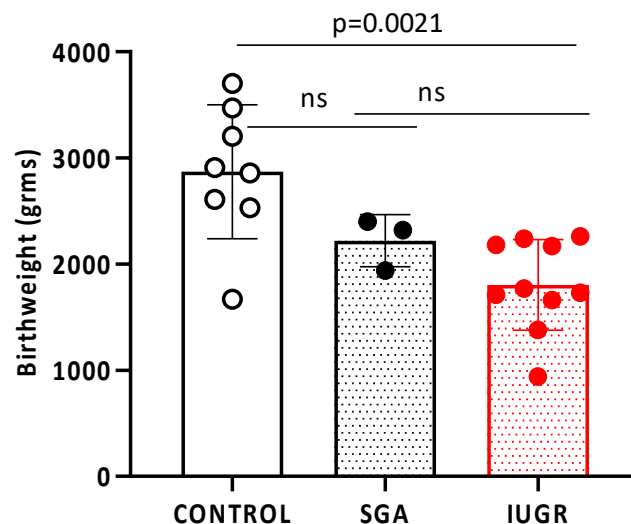
Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL (Γράφημα 1) οι διάμεσες τιμές είναι 36,3 έναντι 37,55 εβδομάδων ( $P=0.2970$ ). Στην σύγκριση των ομάδων IUGR vs CONTROL έχουμε διάμεσες τιμές 35,80 έναντι 37,55 εβδομάδων ( $P= 0.1272$ ) και τέλος στην σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA έχουμε διάμεσες τιμές 35,80 έναντι 36,30 εβδομάδων ( $P>0.999$ ). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αναφορικά με την εβδομάδα κύησης που τερματίζονται οι κυήσεις και λαμβάνονται τα δείγματα, στοιχείο υποδηλωτικό ότι οι προς μελέτη ομάδες είναι συγκρίσιμες χρονικά.



**Γράφημα 1:** Ηλικία κύησης (σε εβδομάδες) στον τοκετό προέλευσης κάθε δείγματος. Οι οριζόντιες ράβδοι αναπαριστούν ομαδοποιημένες τις ηλικιακές τιμές προέλευσης κάθε δείγματος (αριθμημένοι ως M1-M21). Δέκα δείγματα ταξινομήθηκαν στην ομάδα IUGR (κόκκινο), τρία δείγματα στην ομάδα SGA (μαύρο) και οχτώ δείγματα στην ομάδα ελέγχου, CONTROL (λευκό). Οι αριθμητικές τιμές των εβδομάδων κύησης στον τοκετό για κάθε δείγμα εμφανίζονται εξάλλου και στον πίνακα 1, τρίτη στήλη. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns).

#### 4.3.1.2. Βάρος γέννησης νεογνών

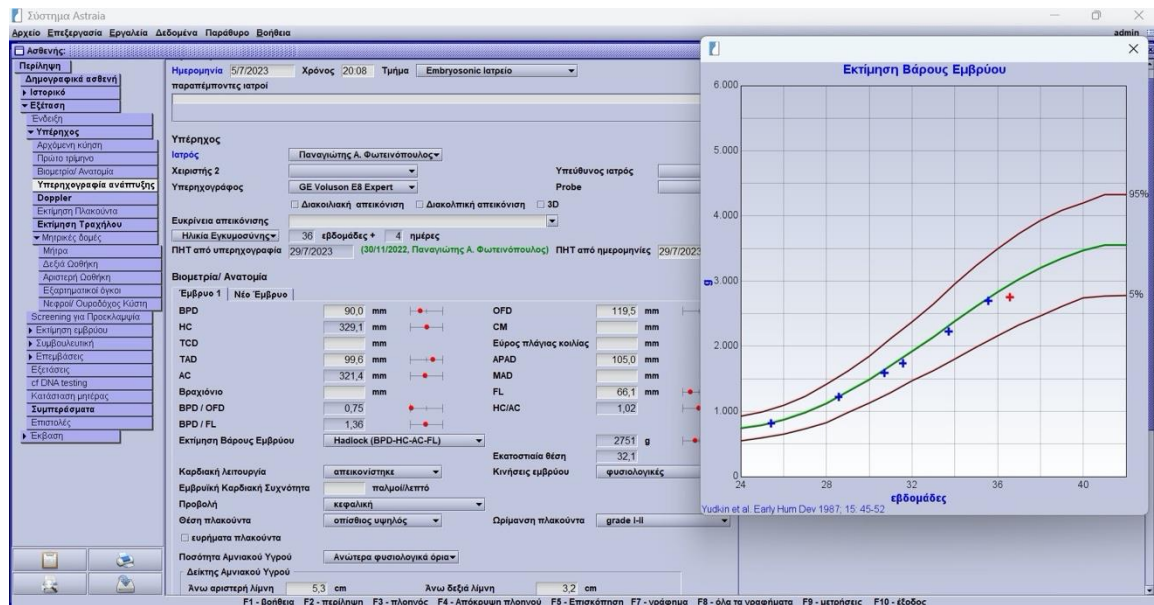
Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 1750 έναντι 2885 γραμμαρίων ( $p=0.0021$ ) διαφέρουν λίαν σημαντικά, στοιχείο αναμενόμενο. Από την σύγκριση IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 1750 έναντι 2320 γραμμαρίων ( $p=0.077$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση. Τέλος, στην σύγκριση SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 2320 έναντι 2885 γραμμαρίων ( $p=0.0848$ ) και δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (Γράφημα 2).



**Γράφημα 2:** Συγκριτική ανάλυση βάρους γέννησης νεογνών (γραμμάρια) στις συγκρινόμενες ομάδες. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

### 4.3.1.3. Εκατοστιαίες θέσεις βάρους γέννησης νεογνών

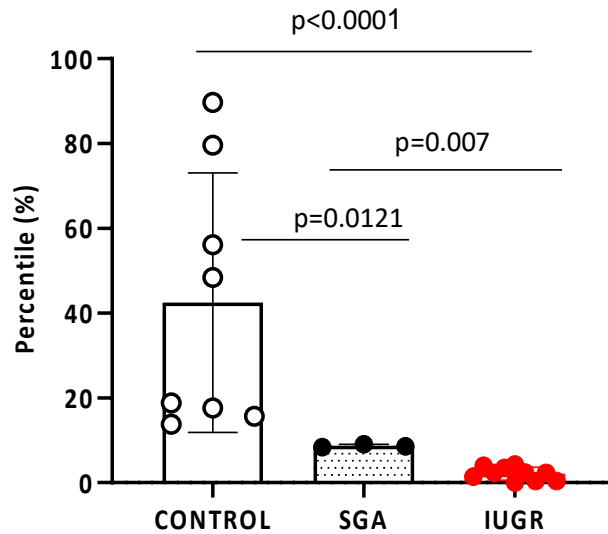
Τα παραπάνω στοιχεία αντικειμενικοποιούνται περισσότερο (Εικόνα 25) εάν αναχθούν σε εκατοστιαίες θέσεις (percentiles) στις πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης των Hadlock et al με τη βοήθεια του προγράμματος Astraia<sup>®</sup> Έκδοση 1.27.2 (Astraia Software GmbH, Ismaning, Germany).



**Εικόνα 25:** Ενδεικτική χρήση του προγράμματος Astraia<sup>®</sup> για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας θέσης του βάρους του νεογνού σύμφωνα με τις πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 2,3 έναντι 33,6 εκατοστιαίας θέσης ( $P < 0.0001$ ) διαφορά λίαν σημαντική, στοιχείο εξ' ὄρισμού αναμενόμενο. Στην σύγκριση IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 2,3 έναντι 8,6 εκατοστιαίας θέσης ( $P = 0.0070 < 0.05$ ) με διαφορά στατιστικά σημαντική, ενώ στην σύγκριση SGA vs

CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 8,6 έναντι 33,6 εκατοστιαίας θέσης ( $P=0.0121 < 0.05$ ) και διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 3).



**Γράφημα 3:** Συγκριτική ανάλυση εκατοστιαίων θέσεων (percentile) βάρους γέννησης νεογνών στις συγκρινόμενες ομάδες. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Με βάση την αναγωγή αυτή ισχυροποιείται ο βαθμός στατιστικής σημαντικότητας της διαφοροποίησης ανάμεσα στην ομάδα των SGA και την ομάδα ελέγχου ως λίαν σημαντικός, κάτι που δεν αποτυπώνεται στην ανάλυση του προηγούμενου υποκεφαλαίου με τις απόλυτες τιμές του βάρους σε γραμμάρια.

#### 4.3.1.4. Κλίμακα APGAR Score

Η κλίμακα APGAR (APGAR score) είναι ένας δείκτης που εισήχθη από την Virginia Apgar το 1953 με σκοπό την αξιολόγηση της κλινικής κατάστασης του νεογνού το πρώτο λεπτό της ζωής του προκειμένου να αναγνωριστούν στοιχεία που επιβάλλουν την ανάληψη μέτρων<sup>116</sup>. Περιλαμβάνει στοιχεία για το χρώμα, την καρδιακή συχνότητα, τα αντανακλαστικά, τον μυϊκό τόνο και τη συχνότητα αναπνοών (Εικόνα 26).

Apgar Scoring System				
Indicator		0 Points	1 Point	2 Points
A	Activity (muscle tone)	Absent	Flexed limbs	Active
P	Pulse	Absent	< 100 BPM	> 100 BPM
G	Grimace (reflex irritability)	Floppy	Minimal response to stimulation	Prompt response to stimulation
A	Appearance (skin color)	Blue Pale	Pink body Blue extremities	Pink
R	Respiration	Absent	Slow and irregular	Vigorous cry

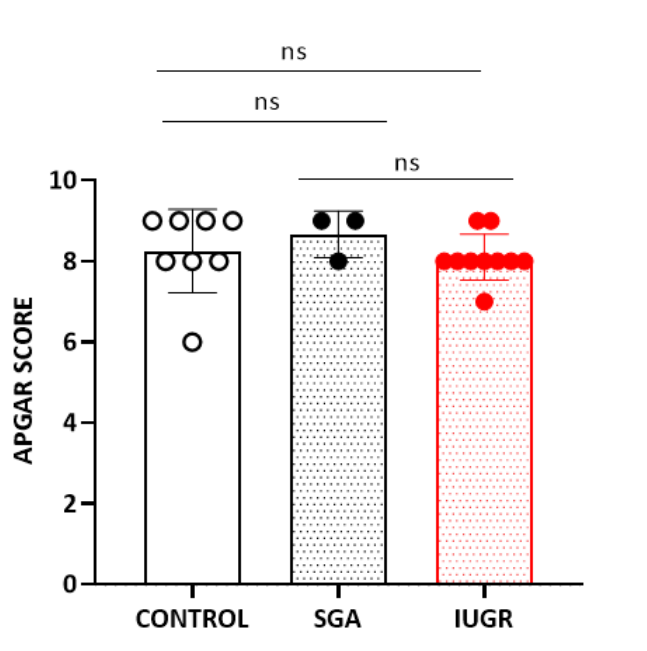
*Εικόνα 26: Παράμετροι ορισμού της κλίμακας APGAR*

Η μέγιστη βαθμολογία είναι το 10 εφόσον ικανοποιούνται πλήρως και τα πέντε κριτήρια. Παλαιότερα η βαθμολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε καταχρηστικώς ως ασφυκτικός δείκτης δημιουργώντας νομικές απαιτήσεις έναντι μαιευτήρων. Ωστόσο, σήμερα αναγνωρίζεται ο μη απόλυτος χαρακτήρας του σε σχετικά υψηλές τιμές. Στην παρούσα μελέτη η αναφορά γίνεται για λόγους συγκρισιμότητας των ομάδων.

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL (Γράφημα 4) οι διάμεσες τιμές είναι 8,00

έναντι 8 ( $P=0.361$ ), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Στη σύγκριση IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 8,00 έναντι 9,00 ( $P=0.279$ ) και δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 9,00 έναντι 8,50 ( $P=0.909$ ) και δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Από την στατιστική ανάλυση της βαθμολόγησης κατά APGAR δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές και στις τρεις ομάδες, στοιχείο υποδηλωτικό της άριστης περιγεννητικής φροντίδας που έτυχαν οι επίτοκες και τα έμβρυά τους στο τμήμα παρακολούθησης κήσεων υψηλού κινδύνου, ώστε και στις τρεις κατηγορίες να περιλαμβάνονται έμβρυα με παρόμοια κατάσταση οξυγόνωσης κατά τον τοκετό.



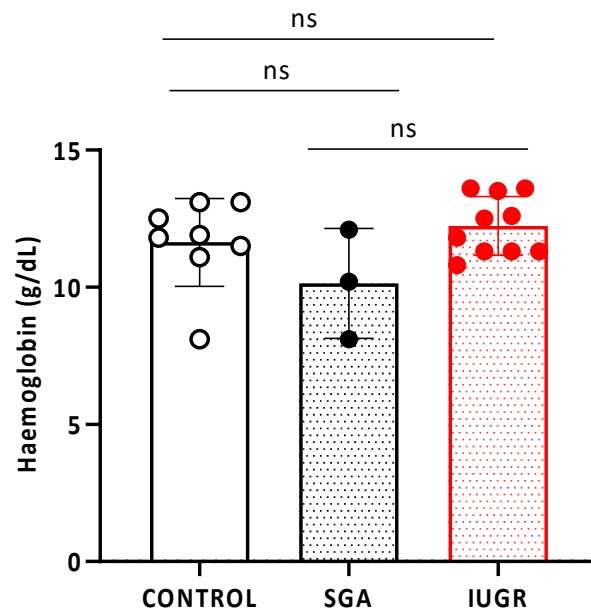
**Γράφημα 4:** Συγκριτική ανάλυση της βαθμολογίας κατά APGAR των νεογνών και στις τρεις ομάδες. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)



## 4.3.2. Συγκριτική ανάλυση βιοχημικών – αιματολογικών παραμέτρων επιτόκων

### 4.3.2.1. Αιμοσφαιρίνη περιφερικού αίματος μητέρας

Η αιμοσφαιρίνη των εγκύων γυναικών είναι ένας έμμεσος δείκτης, υποδηλωτικός της επέκτασης του ενδαγγειακού όγκου κατά την εγκυμοσύνη. Στις περιπτώσεις που δεν επιτυγχάνεται αυτή η επέκταση η αιμοσφαιρίνη παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα και προδιαθέτει για την μελλοντική εμφάνιση προεκλαμψίας που περιπλέκει την κύηση.

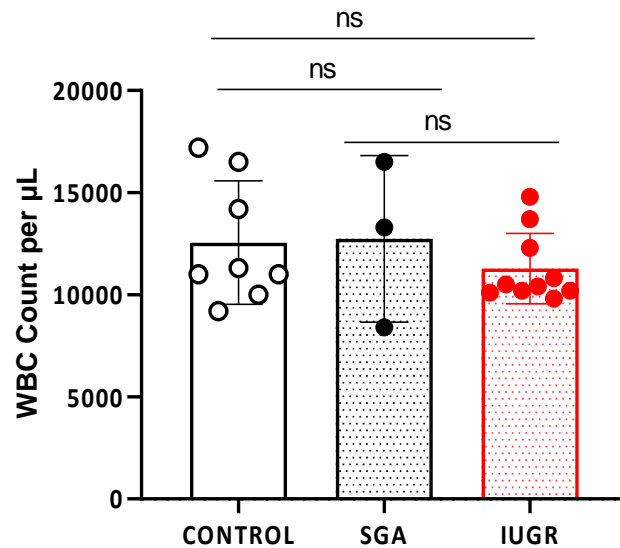


**Γράφημα 5:** Συγκριτική μελέτη των τιμών αιμοσφαιρίνης (g/dl) περιφερικού αίματος των εγκύων γυναικών που έφεραν έμβρυα των τριών κατηγοριών. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές της αιμοσφαιρίνης ήταν 12,15 έναντι 11,85 gr/dl (P=0.617), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Από την σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές της αιμοσφαιρίνης ήταν 12,15 έναντι 10,20 gr/dl (P=0.101) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, η σύγκριση των ομάδων SGA vs CONTROL είχε διάμεσες τιμές αιμοσφαιρίνης 10,20 έναντι 11,85 gr/dl (P=0.315) που δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά (Γράφημα 5).

#### 4.3.2.2. Αριθμός Λευκών Αιμοσφαιρίων περιφερικού αίματος μητέρας

Τα λευκά αιμοσφαίρια αυξάνονται μεταξύ άλλων σε περιπτώσεις λοιμώξεων και στρες.

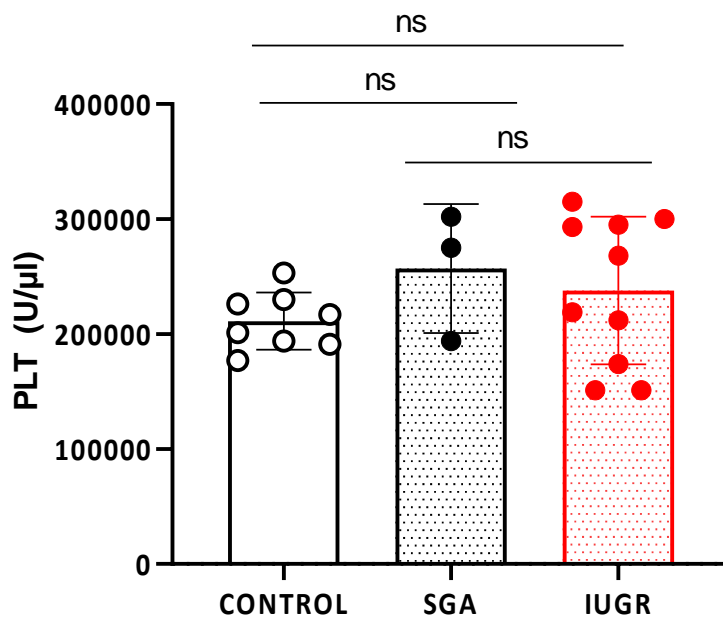


**Γράφημα 6:** Συγκριτική μελέτη του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων ανά µL στο περιφερικό αίμα των εγκύων στις 3 ομάδες μελέτης. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL (Γράφημα 6) οι διάμεσες τιμές του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων είναι 10450 έναντι 11150/μL (P=0.348) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 10450 έναντι 10450/μL (P=0.664) και δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Τέλος, η σύγκριση των ομάδων SGA vs CONTROL έχει διάμεσες τιμές 13300 έναντι 11150 / μL (P=0.988) και δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά.

#### 4.3.2.3. Αριθμός Αιμοπεταλίων περιφερικού αίματος μητέρας

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων της μητέρας είναι σημαντική παράμετρος, καθώς οποιαδήποτε πτώση τους μπορεί να υποδηλώνει μικροαγγειοπαθητική καταστροφή τους ή και προβαθμίδα του συνδρόμου HELLP και να πλήττει την ομοιογένεια των ομάδων



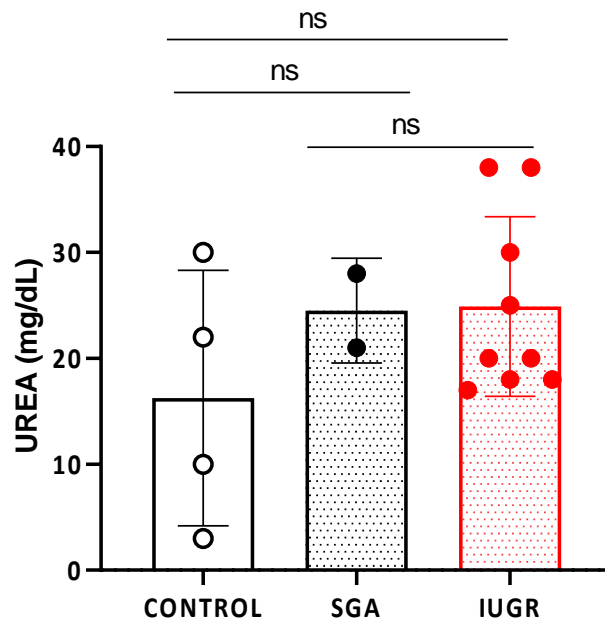
*Γράφημα 7: Συγκριτική απεικόνιση του αριθμού των αιμοπεταλίων (U/μl) στο περιφερικό αίμα των εγκύων που συμμετείχαν στην μελέτη. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη*

παραμετρικού *Mann-Whitney U-test*, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (*non-significant*, ns)

Από την στατιστική ανάλυση (*Mann-Whitney U-test*, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL (Γράφημα 7) οι διάμεσες τιμές του αριθμού των αιμοπεταλίων είναι 243.500 έναντι 209.000/ $\mu\text{L}$  ( $P=0.444$ ) χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 243.500 έναντι 275.000/ $\mu\text{L}$  ( $P=0.667$ ) και δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Τέλος, η σύγκριση των ομάδων SGA vs CONTROL έχει διάμεσες τιμές 275.000 έναντι 209.000 /  $\mu\text{L}$  ( $P=0.212$ ) και δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά.

#### **4.3.2.4. Ουρία περιφερικού αίματος μητέρας**

Η ουρία του περιφερικού αίματος αποτελεί προϊόν σύζευξης αμινοομάδων που προκύπτουν από την οξειδωτική απαμίνωση αμινοξέων. Οι τιμές αναφοράς είναι μεταξύ mg/dl και οι τιμές είναι χαμηλές σε καταστάσεις υποθρεψίας και υψηλές σε περιπτώσεις υπερβολικής κατανάλωσης αμινοξέων ως ενεργειακά υποστρώματα στον κύκλο του Crebs λόγω έλλειψης άλλων υποστρωμάτων.

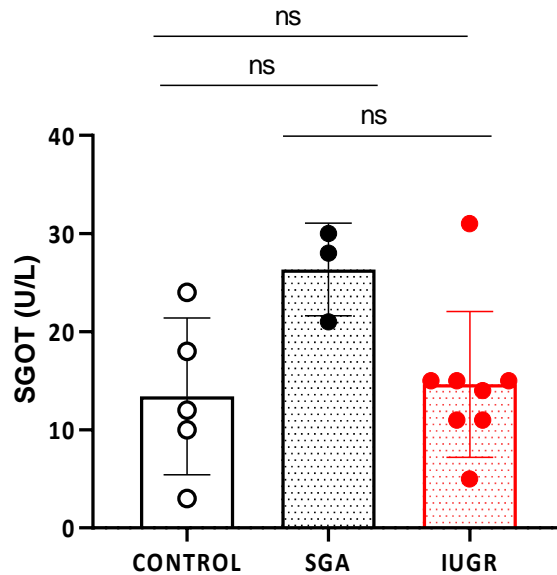


**Γράφημα 8:** Συγκριτική απεικόνιση τιμών ουρίας (mg/dl) στο περιφερικό αίμα των εγκύων που συμμετείχαν στην μελέτη. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων (Γράφημα 8) προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές ήταν 20 έναντι 16 mg/dl ( $P=0.325$ ) και δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στην σύγκριση SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές ήταν 24,50 έναντι 16 mg/dl ( $P=0.80$ ) και δεν υπήρχε διαφορά. Τέλος, στην σύγκριση IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές ήταν 20 έναντι 24,50 mg/dl ( $P=0.65$ ) και η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

#### 4.3.2.5. SGOT περιφερικού αίματος μητέρας

Η οξυαλοξική τρανσαμινάση (SGOT) στο περιφερικό αίμα της μητέρας αυξάνεται σε περιπτώσεις ηπατοκυτταρικής βλάβης.



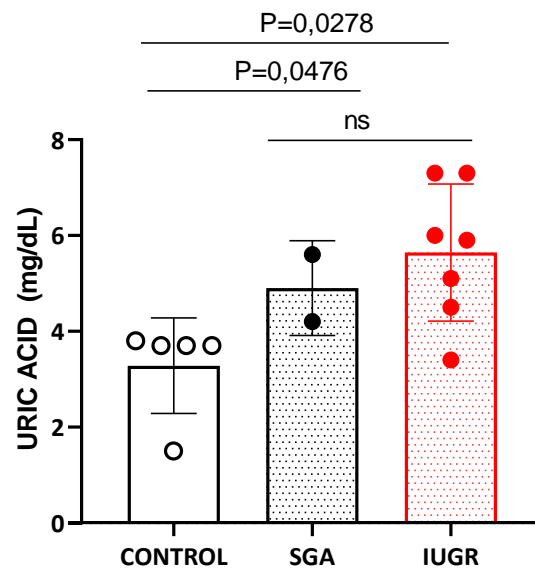
**Γράφημα 9:** Συγκριτική απεικόνιση τιμών SGOT (U/L) στο περιφερικό αίμα των εγκύων που συμμετείχαν στην μελέτη. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων (Γράφημα 9) προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές ήταν 14,50 έναντι 12 U/L ( $P=0.80$ ) και δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά. Στην σύγκριση SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές ήταν 28 έναντι 12 U/L ( $P=0.07$ ) και δεν υπήρχε διαφορά. Τέλος, στην σύγκριση IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές ήταν 14,50 έναντι 28 U/L ( $P=0.066$ ) και η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

#### 4.3.2.6. Ουρικό οξύ περιφερικού αίματος μητέρας

Το ουρικό οξύ του περιφερικού αίματος της μητέρας αντανακλά την νεφρική της λειτουργία. Είναι μεταβολικό παράγωγο κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης των πουρινών από τον οργανισμό. Απεκκρίνεται από τους νεφρούς και η συγκέντρωσή του στο περιφερικό αίμα αυξάνεται ως αποτέλεσμα διαταραγμένης νεφρικής λειτουργίας.

Κατά το μέσο και τελευταίο τρίμηνο της κύησης ο έλεγχος των τιμών του ουρικού οξέως είναι επιβεβλημένος για την πρόιμη αναγνώριση στοιχείων τοξιναιμίας της κύησης.



**Γράφημα 10:** Συγκριτική απεικόνιση τιμών ουρικού οξέως (mg/dl) στο περιφερικό αίμα των εγκύων που συμμετείχαν στην μελέτη. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων (Γράφημα 10) προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 5,9





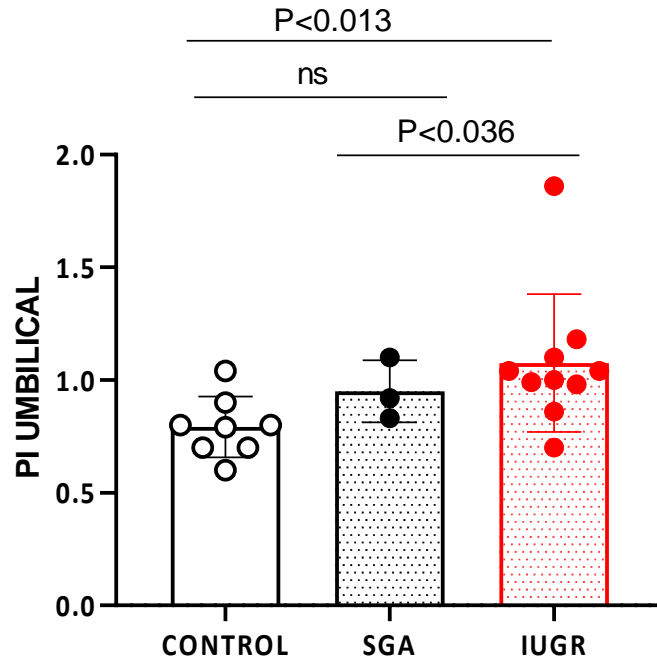
*Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)*

Από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων (Γράφημα 11) προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 0,95 και 1,00 ( $P=0.496$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Από την σύγκριση των ομάδων SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 1,00 έναντι 1,00 ( $P=0.393$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, από την σύγκριση IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 0,95 έναντι 1,00 ( $P=0.972$ ) και δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

### **4.3.3. Συγκριτική ανάλυση ανάλυσης φάσματος ντόπλερ εμβρύων**

#### **4.3.3.1. Ντόπλερ ομφαλικής αρτηρίας εμβρύων**

Η ανάλυση του φάσματος ροών στην ομφαλική αρτηρία του εμβρύου έδειξε ορισμένες διαφορές στις διάφορες ομάδες.



**Γράφημα 12:** Συγκριτική απεικόνιση των τιμών του δείκτη παλμικότητας της ομφαλικής αρτηρίας στις ομάδες της μελέτης. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Ειδικότερα, από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων (Γράφημα 12) προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές του PI της ομφαλικής αρτηρίας είναι 1,02 έναντι 0,795 ( $P=0.01$ ) και η διαφορά ήταν στατιστικώς σημαντική. Επίσης, στην σύγκριση των ομάδων SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές του PI της ομφαλικής αρτηρίας είναι 0,92 έναντι 0,795 ( $P=0.084$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Τέλος, στην σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές του PI της ομφαλικής αρτηρίας είναι 1,02 έναντι 0,92 ( $P=0.50$ ) και δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά.

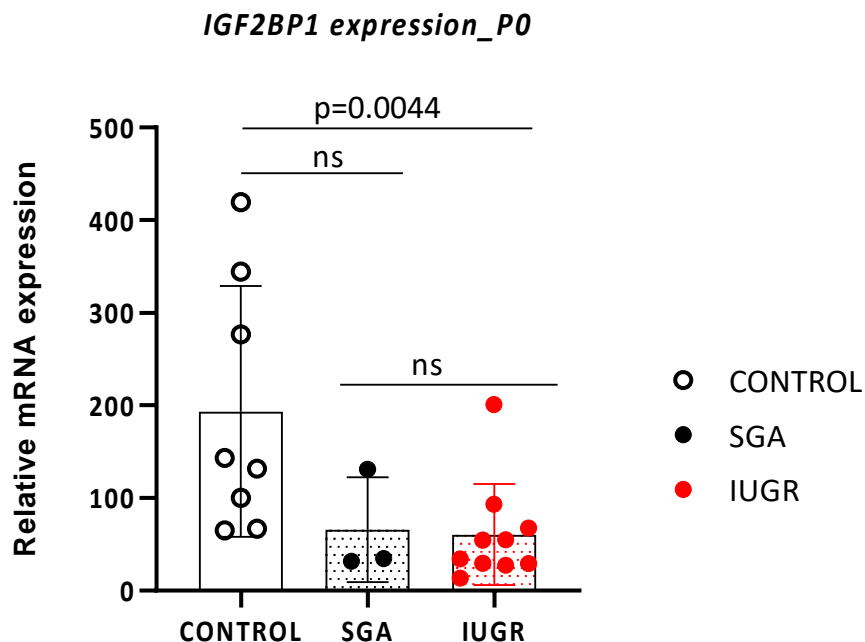
#### **4.3.4. Συγκριτική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μεσεγχυματικών κυττάρων σε καλλιεργητικές σειρές**

Μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων IGF2BP1, P21, NANOG, GLI1, OCT, SOX2 και CMYC σε πληθυσμούς των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSC) από τις ομφαλίδες των εμβρύων.

Η έκφραση στην P0 (Passage 0) σειρά αφορούσε το χρονικό σημείο αμέσως μετά την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των κυττάρων, ενώ η σειρά P1 (Passage 1) προέκυπτε από την πρώτη ανακαλλιέργεια των κυττάρων.

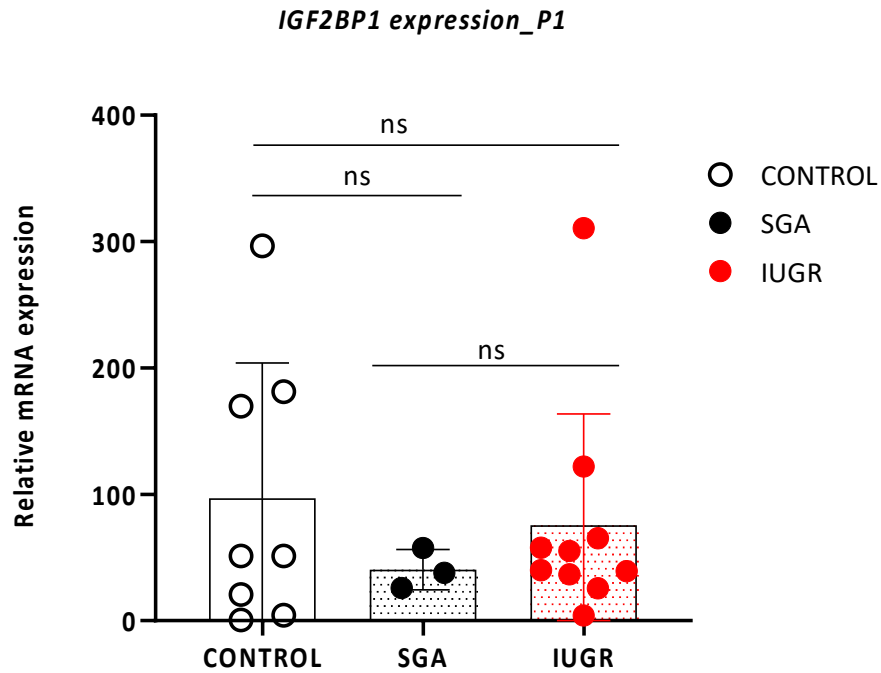
##### ***4.3.4.1. Έκφραση της IGF2BP1***

Στο Passage 0 (**P0**), αναφορικά με την έκφραση της **IGF2BP1** (Γράφημα 13), από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 44,37 έναντι 137,4 ( $P=0.0044 < 0.001$ ) και η διαφορά είναι στατιστικώς λίσαν σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 34,44 έναντι 137,4 ( $P=0.08 > 0.05$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 44,37 έναντι 34,44 ( $P=0.69$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 13:** Συγκριτική έκφραση της *IGF2BP1* στην P0. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού *Mann-Whitney U-test, two tailed*. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (*non-significant, ns*)

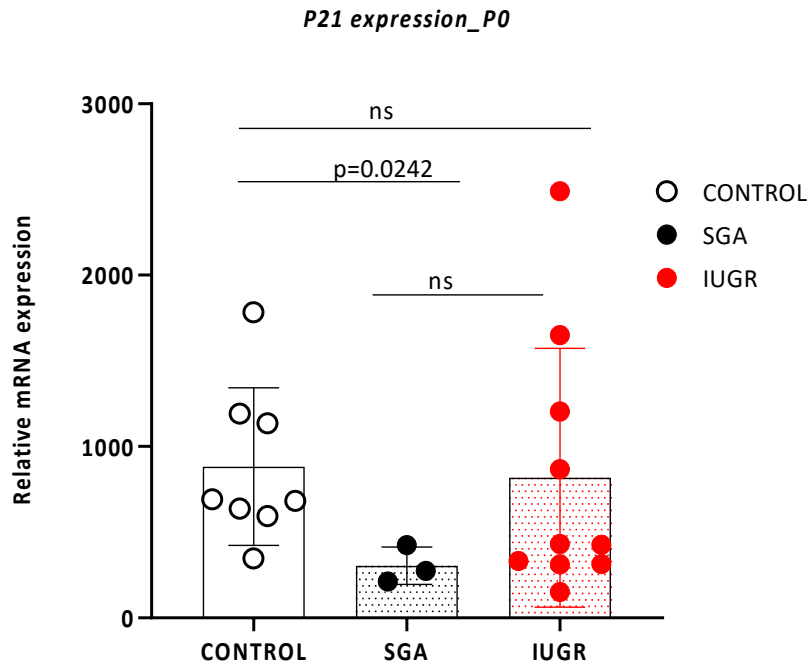
Στο Passage 1 (P1), αναφορικά με την έκφραση της **IGF2BP1** (Γράφημα 14), από την αντίστοιχη στατιστική ανάλυση (*Mann-Whitney U-test, Two-tailed*) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 47,53 έναντι 51,18 ( $P=0.965$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως αποτέλεσμα του κλεισίματος της ψαλίδας τιμών. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 37,92 έναντι 51,18 ( $P=0.9212$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 47,53 έναντι 37,92 ( $P=0.57$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά



**Γράφημα 14:** Συγκριτική έκφραση της *IGF2BP1* στην *P1*. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού *Mann-Whitney U-test, two tailed*. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (*non-significant, ns*)

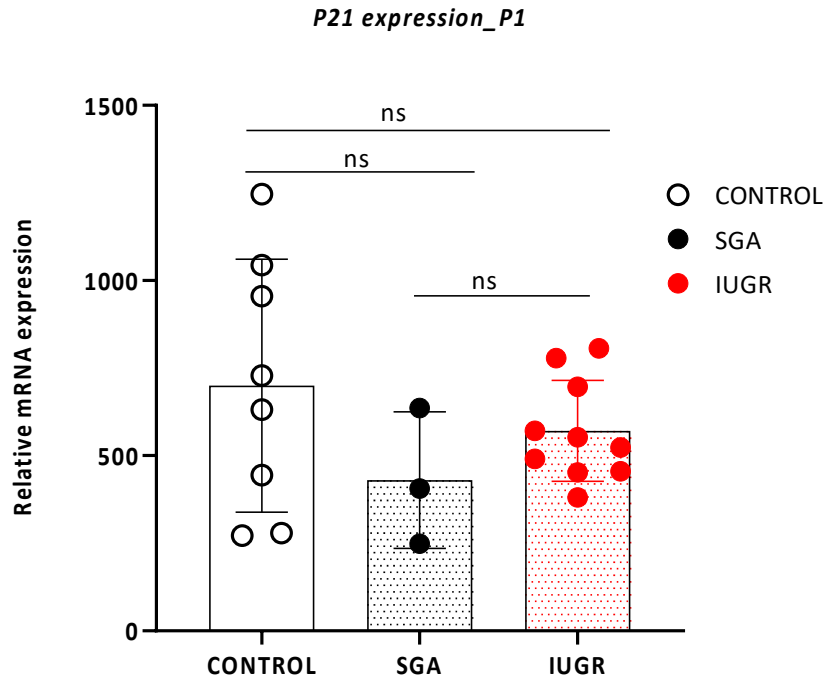
#### 4.3.4.2. Έκφραση της *P21*

Στο Passage 0 (**P0**) αναφορικά με την έκφραση της **P21** (Γράφημα 15), από την στατιστική ανάλυση (*Mann-Whitney U-test*) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 428,7 έναντι 687,1 ( $P=0.359$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 274,3 έναντι 687,1 ( $P=0.0242 < 0.05$ ) με στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 428,7 έναντι 274,3 ( $P=0.1608$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 15:** Συγκριτική έκφραση της P21 στην P0. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

Στο Passage 1 (P1) αναφορικά με την έκφραση της P21 (Γράφημα 16), από την αντίστοιχη στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 537,9 έναντι 680,2 ( $P=0.633$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 406,3 έναντι 680,2 ( $P=0.278$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 537,9 έναντι 406,3 ( $P=0.286$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 16:** Συγκριτική έκφραση της P21 στην P1. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

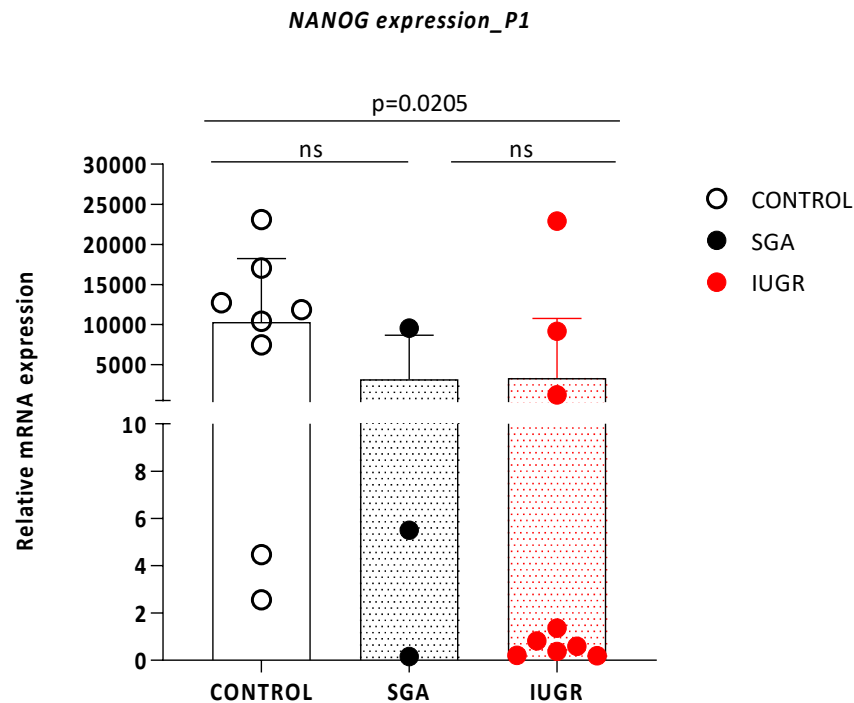
#### 4.3.4.3. Έκφραση της NANOG

Στο Passage 0 (P0) αναφορικά με την έκφραση της NANOG (Γράφημα 17), από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 1,051 έναντι 22,23 ( $P=0.0434 < 0.05$ ) και η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 0,689 έναντι 22,23 ( $P=0.497$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές





διάμεσες τιμές είναι 1,090 έναντι 5,503 ( $P>0.999$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.

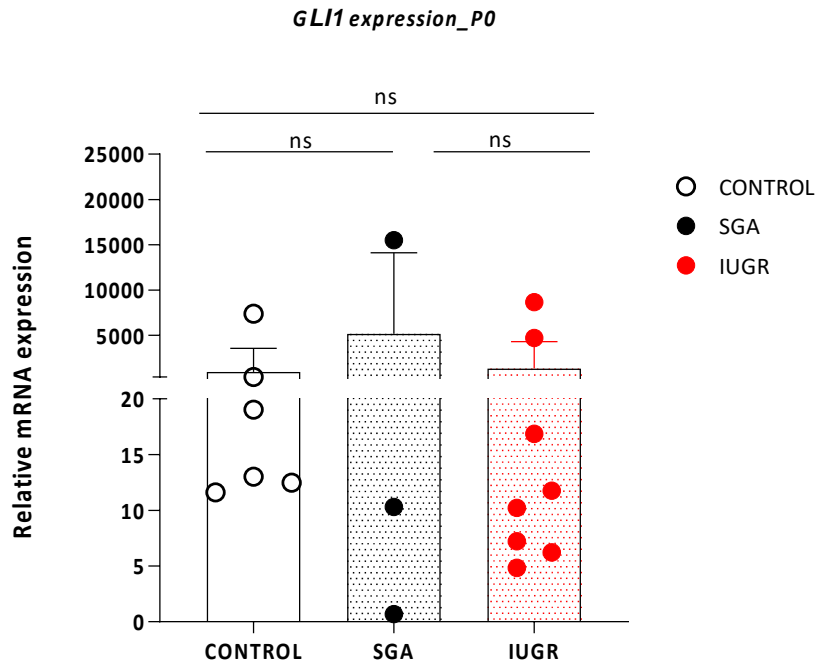


**Γράφημα 18:** Συγκριτική έκφραση της NANOG στην P1. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

#### 4.3.4.4. Έκφραση της GLI1

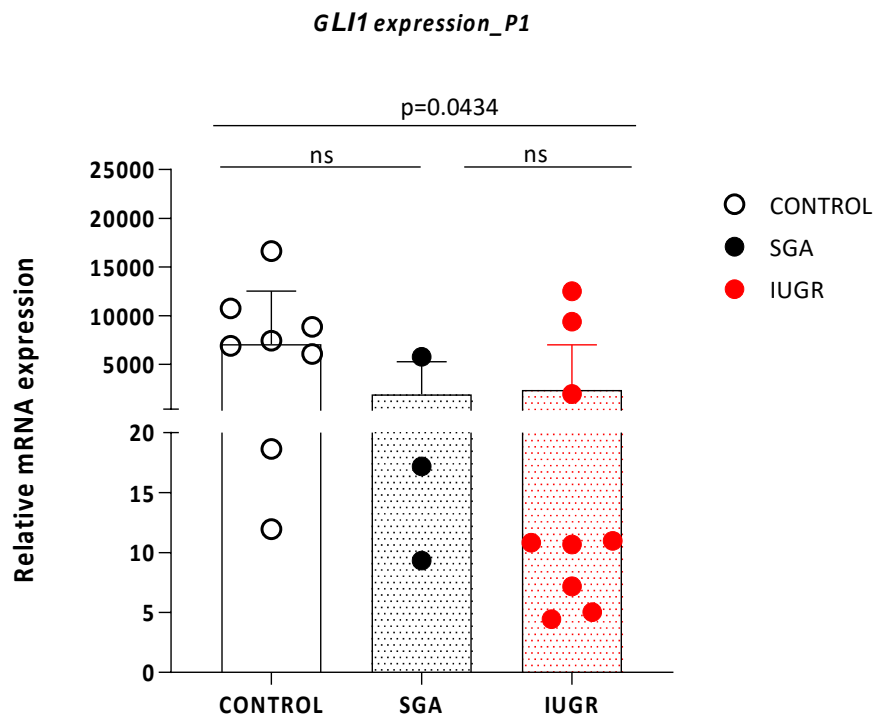
Στο **Passage 0 (P0)** αναφορικά με την έκφραση της **GLI1** (Γράφημα 19), από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 14,31 έναντι 19,76 ( $P=0.459$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 10,30 έναντι 19,76 ( $P=0.497$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική

διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 14,31 έναντι 10,30 ( $P>0.937$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 19:** Συγκριτική έκφραση της *GLI1* στην P0. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

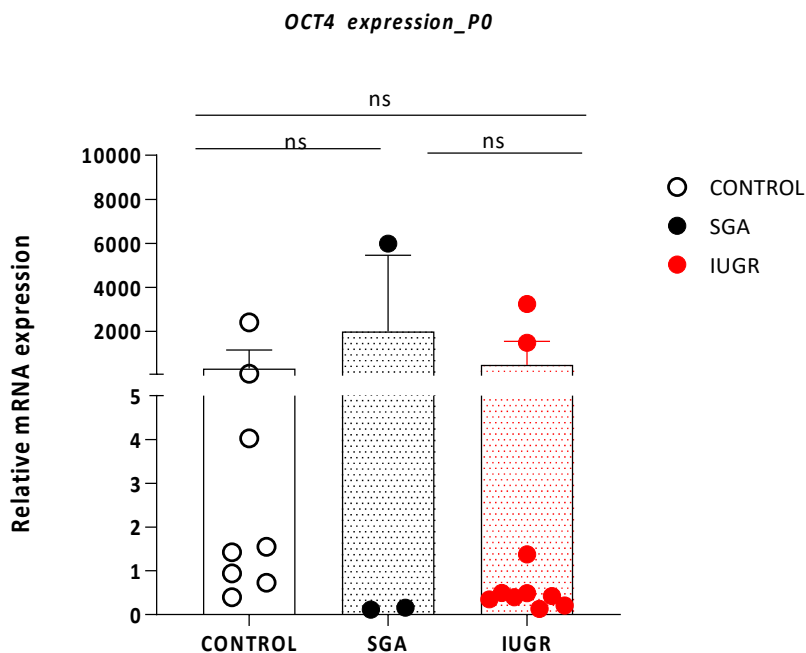
Στο **Passage 1 (P1)** αναφορικά με την έκφραση της **GLI1** (Γράφημα 20), από την αντίστοιχη στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 10,91 έναντι 7170 ( $P=0.0434 < 0.05$ ) και υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 17,19 έναντι 7170 ( $P=0.084$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές είναι 10,91 έναντι 17,19 ( $P=0.811$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 20:** Συγκριτική έκφραση της *GLI1* στην *P1*. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού *Mann-Whitney U-test, two tailed*. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (*non-significant, ns*)

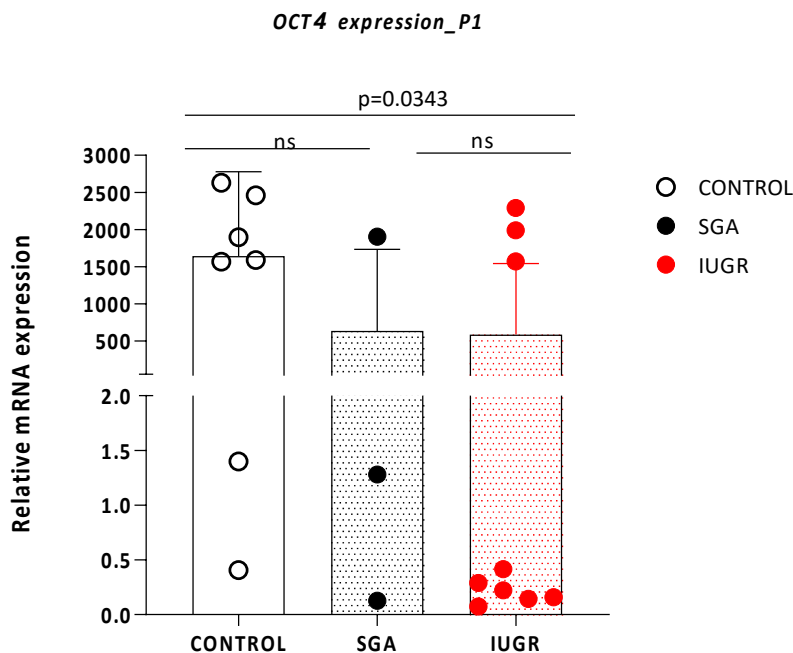
#### 4.3.4.5. Έκφραση της *OCT4*

Στο **Passage 0 (P0)** αναφορικά με την έκφραση της **OCT4** (Γράφημα 21), από την στατιστική ανάλυση (*Mann-Whitney U-test, Two-tailed*) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 0,4584 έναντι 1,487 ( $P=0.122$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 0,1615 έναντι 1,487 ( $P=0.497$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 0,4584 έναντι 0,1615 ( $P=0.573$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 21:** Συγκριτική έκφραση της OCT4 στην P0. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

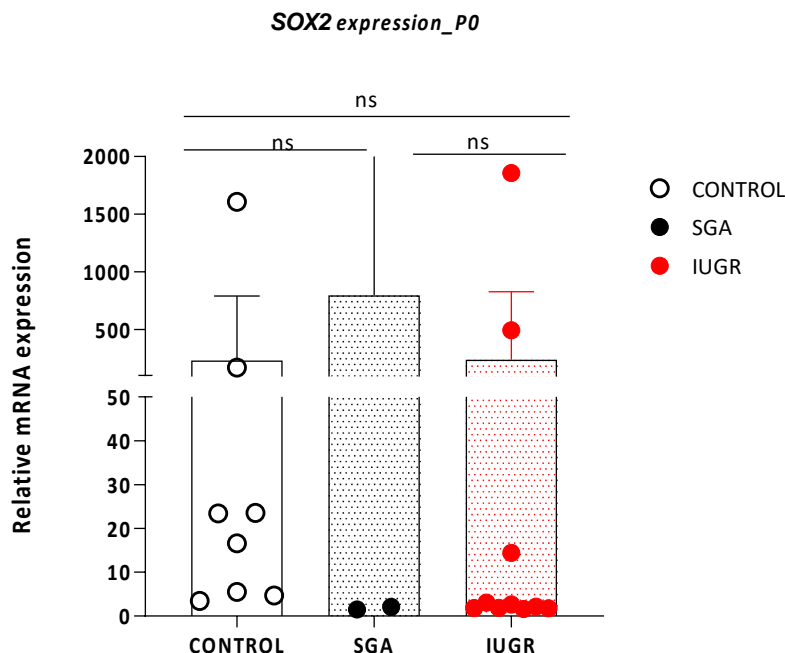
Στο **Passage 1 (P1)** αναφορικά με την έκφραση της **OCT4** (Γράφημα 22), από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 0,3527 έναντι 1744 ( $P=0.0343 < 0.05$ ) και η διαφορά είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 1,279 έναντι 1744 ( $P=0.278$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 0,3527 έναντι 1,279 ( $P > 0.999$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 22:** Συγκριτική έκφραση της OCT4 στην P1. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. (n=10 IUGR, n=3 SGA και n=8 CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P > 0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

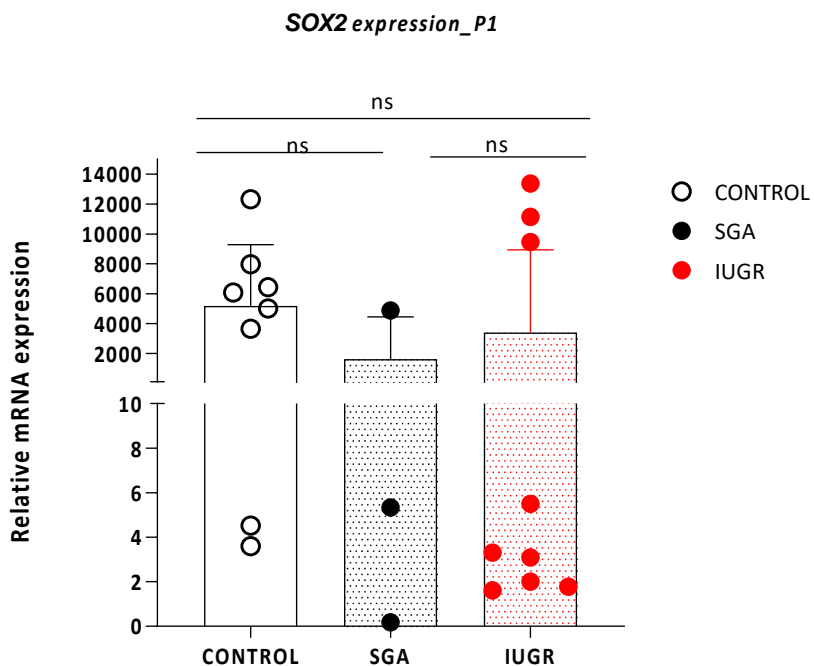
#### 4.3.4.6. Έκφραση της SOX2

Στο **Passage 0 (P0)** αναφορικά με την έκφραση της **SOX2** (Γράφημα 23), από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 2,383 έναντι 20,01 ( $P=0.0545$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 2,090 έναντι 20,01 ( $P=0.497$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 2,383 έναντι 2,090 ( $P=0.937$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 23:** Συγκριτική έκφραση της *SOX2* στην P0. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού Mann-Whitney U-test, two tailed. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (non-significant, ns)

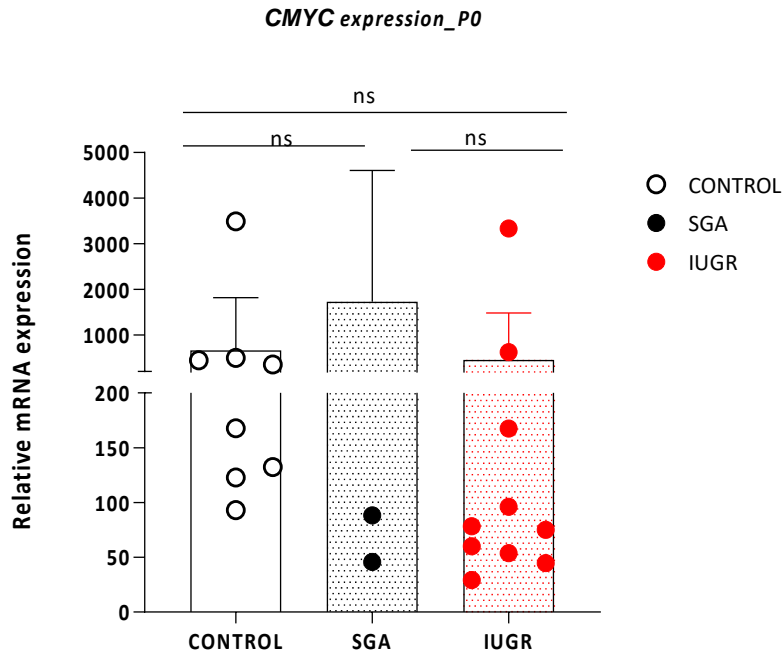
Στο **Passage 1 (P1)** αναφορικά με την έκφραση της **SOX2** (Γράφημα 24), από την στατιστική ανάλυση (Mann-Whitney U-test, Two-tailed) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 4,403 έναντι 5546 ( $P=0.2375$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 5,335 έναντι 5546 ( $P=0.1939$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 4,403 έναντι 5,335 ( $P=0.692$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 24:** Συγκριτική έκφραση της *SOX2* στην *P1*. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού *Mann-Whitney U-test, two tailed*. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (*non-significant, ns*)

#### 4.3.4.7. Έκφραση της *CMYC*

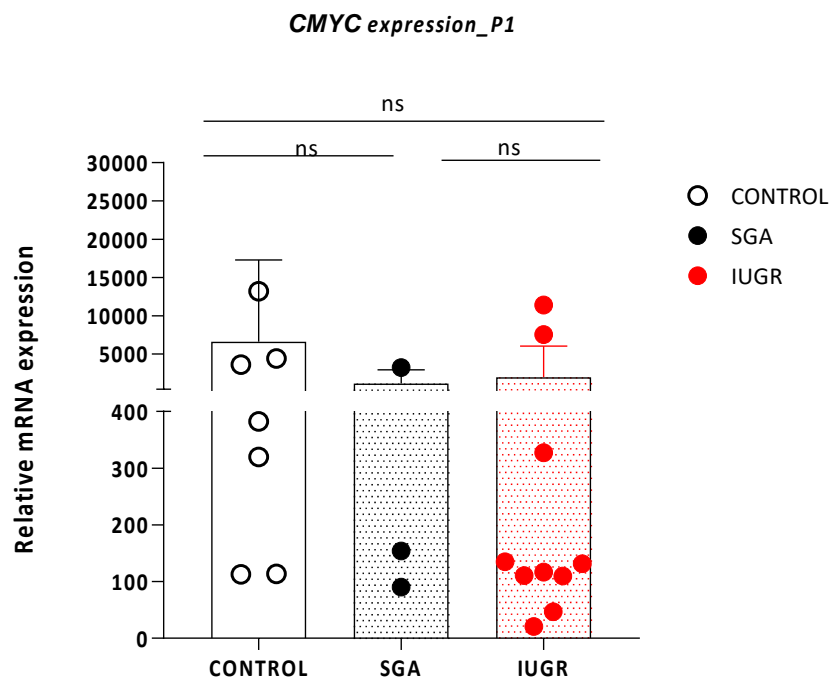
Στο **Passage 0 (P0)** αναφορικά με την έκφραση της *CMYC* (Γράφημα 25), από την στατιστική ανάλυση (*Mann-Whitney U-test, Two-tailed*) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 76,65 έναντι 261,9 ( $P=0.0545$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 88,22 έναντι 261,9 ( $P=0.497$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 76,65 έναντι 88,22 ( $P=0.692$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.



**Γράφημα 25:** Συγκριτική έκφραση της *CMYC* στην P0. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού *Mann-Whitney U-test, two tailed*. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (*non-significant, ns*)

Στο **Passage 1 (P1)** αναφορικά με την έκφραση της *CMYC* (Γράφημα 26), από την στατιστική ανάλυση (*Mann-Whitney U-test, Two-tailed*) των ομάδων προκύπτει ότι στην σύγκριση IUGR vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 124 έναντι 2009 ( $P=0.101$ ) και η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συγκρίνοντας τις ομάδες SGA vs CONTROL οι διάμεσες τιμές είναι 154,1 έναντι 2009 ( $P=0.278$ ) χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στη σύγκριση των ομάδων IUGR vs SGA οι διάμεσες τιμές των ομάδων είναι 124 έναντι 154,1 ( $P=0.811$ ) και δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά.





**Γράφημα 26:** Συγκριτική έκφραση της *CMYC* στην *P1*. Για την στατιστική ανάλυση έγινε χρήση μη παραμετρικού *Mann-Whitney U-test, two tailed*. Οι έγχρωμες κουκίδες αναπαριστούν τις αντίστοιχες τιμές από διαφορετικά δείγματα προερχόμενα από κάθε ομάδα. ( $n=10$  IUGR,  $n=3$  SGA και  $n=8$  CONTROL). Στατιστικές διαφορές  $P>0.05$  θεωρούνται ως μη-σημαντικές (*non-significant, ns*)

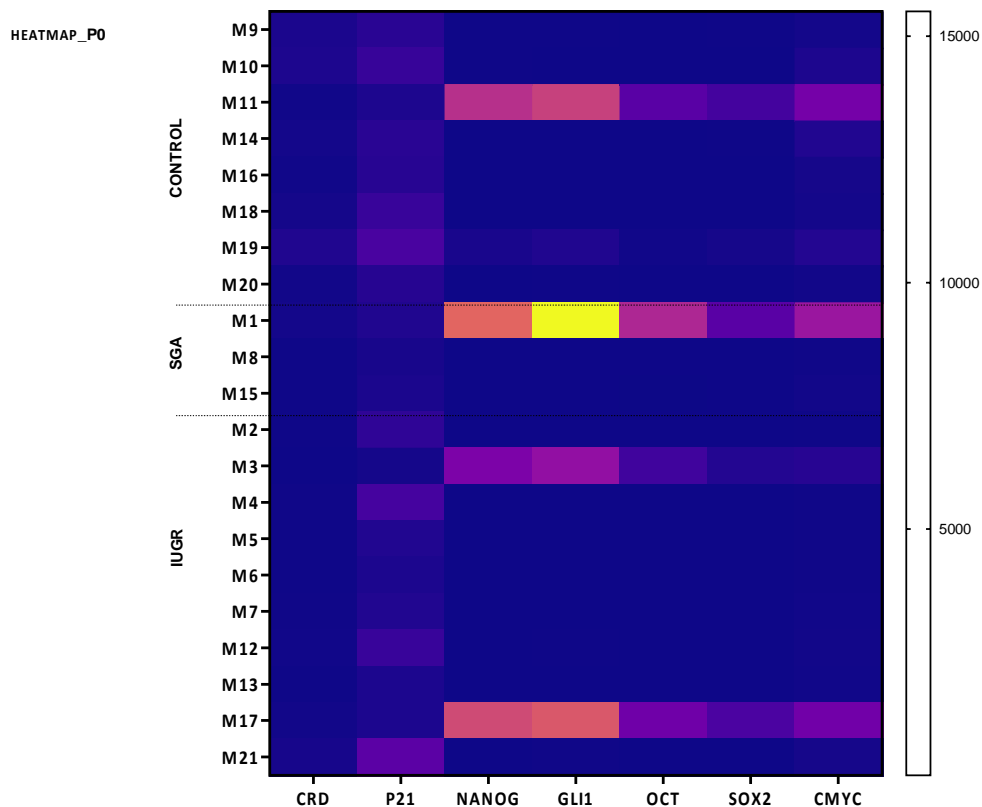
#### 4.3.4.8. Συνολική σχετική έκφραση γονιδίων

Οι εξατομικευμένες διαφορές στην έκφραση κάποιων γονιδίων σε κάποια δείγματα μπορούν να ανιχνευτούν εφόσον το επίπεδο ανίχνευσής τους διαφέρει σημαντικά. Ένας απλός τρόπος παρουσίασης είναι η δημιουργία θερμικού χάρτη “Heat Map” όπου μια φασματική αποτύπωση υποδηλώνει χρωματικά το ποσοτικό επίπεδο έκφρασης.

Για το Passage 0 (P0) παρατηρούνται διαφορές κυρίως στο M1, M11, M17 και M3. Το **M1** εκφράζει σε λίαν υψηλό επίπεδο το **GLI1** και ακολουθεί το NANOG, το OCT3 και

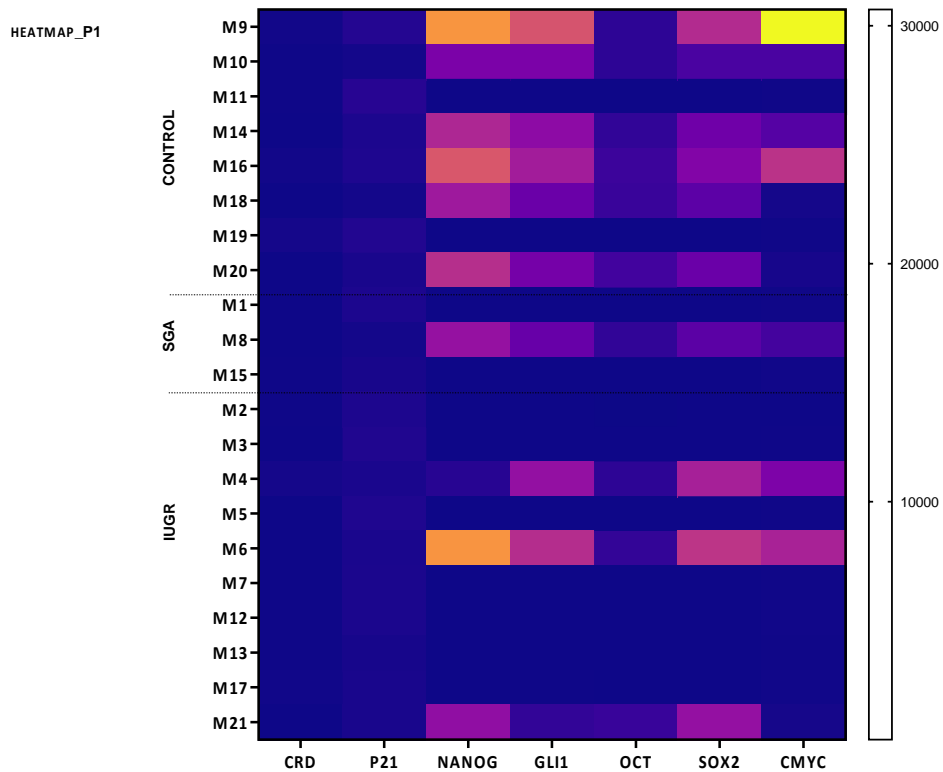
το CMYC σε μικρότερο βαθμό. Η μητέρα αυτή ήταν η νεότερη της μελέτης (21 ετών) και νοσηλεύτηκε 9 ημέρες λόγω πρόωρων συστολών έως ότου το SGA έμβρυο χαρακτηριστεί τελειόμηνο. Το M11 εκφράζει κυρίως το GLI1 (σε χαμηλότερο επίπεδο) και ακόμη λιγότερο το NANOG και το CMYC. Το έμβρυο είχε παραμένον ολιγάμνιο.

Το M17 δείγμα εκφράζει κυρίως την GLI1 και σε μικρότερο βαθμό το NANOG και ακόμη μικρότερο βαθμό το OCT4 και το CMYC. Είναι από IUGR έμβρυο με τετραλογία Fallot. Η μητέρα ήταν 38 ετών και η σύλληψη με IVF. Το M3 δείγμα εκφράζει κυρίως το GLI1 και σε μικρότερο βαθμό το NANOG, OCT4, CMYC. Η μητέρα ήταν 42 ετών και η σύλληψη με IVF (Γράφημα 27).



**Γράφημα 27:** Συνολική συγκριτική έκφραση γονιδίων στην P0 με τη μορφή θερμικού χάρτη (Heat Map)

Για το **Passage 1 (P1)** παρατηρούνται μεγάλες χρωματικές διαφορές (Γράφημα 28). Τα δείγματα M1, M11, M17 και M3 που προαναφέρθηκαν, δεν εκφράζουν πλέον κάποιο γονίδιο σε υπερβάλλοντα βαθμό σε σχέση με την βάση αναφοράς.



**Γράφημα 28:** Συνολική συγκριτική έκφραση γονιδίων στην P1 με τη μορφή θερμικού χάρτη (Heat Map)

Πλέον, στην **P1** διακρίνονται με σειρά έντασης τα δείγματα M9, M6, M16 και σε λιγότερο βαθμό τα M4, M14, M18, M20. Μεσοσταθμικά υπάρχει υψηλότερη έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων στα CONTROL δείγματα. Για το δείγμα **M9** υπάρχει λίαν υψηλή έκφραση του CMYC και ακολούθως του NANOG, GLI1 και σε μικρότερο βαθμό του SOX2. Η μητέρα ήταν 41 ετών με σακχαρώδη διαβήτη κύησης. Το **M6** εκφράζει σε υψηλότερο βαθμό το NANOG και σε λιγότερο βαθμό το GLI1, SOX2 και CMYC. Το

δείγμα αφορά το ένα από τα διχοριακά IUGR έμβρυα, ενώ το άλλο έμβρυο δεν υπερέκφραζει κάποιο από τα εξεταζόμενα γονίδια. Η σύλληψη ήταν με IVF. Το **M16** εκφράζει περισσότερο το NANOG και το **CMYC**, ενώ σε μικρότερο βαθμό το GLI1 και το SOX2. Είναι το σχετικά μεγάλο έμβρυο από τα μονοχοριακά δίδυμα (89<sup>η</sup> εκατοστιαία θέση), ενώ το άλλο έμβρυο ταξινομήθηκε ως SGA.

Από τα υπόλοιπα δείγματα που παρουσίασαν κάπως αυξημένη την έκφραση κάποιων γονιδίων πέρα από τα συνήθη επίπεδα αναφοράς έχουμε για το M4 έκφραση  $SOX > GLI1 > CMYC$ , για το M14  $NANOG > GLI1 > SOX 2$ , για το M18  $NANOG > GLI1=SOX2$  και τέλος για το M20  $NANOG > GLI1 > SOX2$ .

Συνολικά μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι στη φάση αυτή κυριαρχεί η υπερέκφραση του NANOG, και σε μικρότερο βαθμό του SOX2 και του GLI1. Στην πρώτη ανακαλλιέργεια βλέπουμε ότι σχεδόν σε όλα τα CONTROL δείγματα υπάρχει υπερέκφραση μέσου βαθμού σε αρκετά προς εξέταση γονίδια, ενώ δεν παρατηρείται ίδια εικόνα στα SGA και IUGR έμβρυα όπου έχουμε σποραδικά κάποιες περιπτώσεις υπερέκφρασης.

## 4.4. Συζήτηση

Η απομόνωση, επώαση και καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων από τις ομφαλίδες εμβρύων είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη αλυσίδα εργαστηριακών διαδικασιών που θα πρέπει να εκκινήσει τα πρώτα λεπτά μόλις λεπτά μετά την γέννηση του κάθε εμβρύου.

Επίσης, τα IUGR έμβρυα είναι μια σχετικά σπάνια και ειδική κατηγορία ασταθών εμβρύων που τυγχάνουν κατάλληλης στενής προγεννητικής παρακολούθησης μόνο σε ειδικά τμήματα παρακολούθησης κύσεων υψηλού κινδύνου.

Τα πολύ ασταθή IUGR έμβρυα με εντόνως διαταραγμένες ροές στα ντόπλερ και παθολογικό καρδιοτοκογράφημα οδηγούνται σε ιατρογενή πρόωρο τοκετό δια επείγουσας καισαρικής τομής σε ώρες και ημέρες της εβδομάδας που δεν μπορεί να οργανωθεί άμεση ειδική λήψη, μεταφορά και εργαστηριακή κατεργασία τμημάτων της ομφαλίδας τους. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το συλλεχθέν υλικό να είναι αριθμητικά περιορισμένο και να προέρχεται από τις πιο «προβλέψιμες» και σταθερές περιπτώσεις εμβρύων IUGR που κατάφεραν μετά από νοσηλεία και παρακολούθηση να γεννηθούν με προγραμματισμένες πρωινές καισαρικές τομές. Κατά συνέπεια υπήρξε μια εκ των πραγμάτων (De Facto) μετατόπιση ενδιαφέροντος προς τις περιπτώσεις, είτε σταθερών πρώιμων IUGR που επέτρεπαν μεγαλύτερους χρόνους προγεννητικής νοσηλείας της μητέρας, είτε όψιμων IUGR που χαρακτηρίζονται από ομαλότερες ροές στα ντόπλερ και ομαλότερα πρότυπα μεταβλητότητας παλμών στα καρδιοτοκογραφήματα παρακολούθησης.

Για τον λόγο αυτό καταβλήθηκε προσπάθεια και οι περιπτώσεις της ομάδας ελέγχου (CONTROL) και των μικρών για την εβδομάδα κύησης (Small for Gestational Age, SGA)

εμβρύων να προέρχονται μεσοσταθμικά από τις ίδιες εβδομάδες κύησης για να είναι τα δείγματα συγκρίσιμα ως προς τους χρόνους παραμονής σε ενδομήτριο περιβάλλον.

Πράγματι, στην ανάλυση του υποκεφαλαίου 4.3.1.1. προκύπτει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στον χρόνο περάτωσης της κύησης σε CONTROL, SGA, IUGR έμβρυα.

Η **σύγκριση του βάρους γέννησης** και στις τρεις κατηγορίες στο υποκεφάλαιο 4.3.1.2 έδειξε στατιστικώς λίαν σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου (CONTROL) και των IUGR, κάτι το αναμενόμενο, αφού πρόκειται για αυτοεκπληρούμενη συνέπεια του ορισμού των IUGR εμβρύων. Μεταξύ ομάδας ελέγχου και SGA δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, κάτι που συμβαδίζει και με την κλινική αντίληψη ότι τα SGA έμβρυα είναι πλησιέστερα στο βάρος τους προς το φυσιολογικό. Επίσης, βρέθηκε στατιστικώς λίαν σημαντική διαφορά στο βάρος γέννησης μεταξύ των SGA και IUGR εμβρύων, που ωστόσο, ενδεχομένως και να μην χρειαζόταν να την λάβουμε υπόψιν λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων στην ομάδα SGA και της μικρής διασποράς τιμών ως συνέπεια της μικρής διακύμανσης στην εβδομάδα τοκετού.

Για το λόγο αυτό ήταν απαραίτητο στις τρεις ομάδες μελέτης να πραγματοποιηθεί **αναγωγή των απολύτων τιμών βάρους γέννησης** στις αντίστοιχες για την εβδομάδα και ημέρα κύησης **εκατοστιαίες θέσεις ανάπτυξης**, όπως αυτές προκύπτουν από τις συνήθειες πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται στο Δυτικό κόσμο (Hadlock et al). Με την αναγωγή αυτή (βλ. 4.3.1.3) **ισχυροποιήθηκε η διαφορά** μεταξύ ομάδας ελέγχου και IUGR (έγινε  $p < 0.0002$  από  $p < 0.01$ ) και μεταξύ ομάδας ελέγχου και SGA ( $p < 0.01$  έναντι μη σημαντικής διαφοράς), ενώ αποδυναμώθηκε η διαφορά μεταξύ SGA και IUGR ( $p < 0.05$  έναντι  $p < 0.0015$ ) εξακολουθώντας να είναι στατιστικώς σημαντική.

Η ανάλυση διαφορών στο άμεσο περιγεννητικό αποτέλεσμα μέσω της **κλίμακας APGAR** που είναι έμμεσα ένας ασφυκτικός δείκτης (βλ.4.3.1.4) δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές, ωστόσο το εύρημα αυτό μάλλον συνηγορεί υπέρ της καλής περιγεννητικής φροντίδας, όσο και ενδεχομένως της καλής κατάστασης των IUGR εμβρύων που τελικά μετείχαν στην μελέτη.

Η σύγκριση των **αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων** των μητέρων (βλ Κεφάλαιο 4.3.2.) που μετείχαν στην μελέτη πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί έμμεσα η παρόμοια μητρική κατάσταση και στις τρεις ομάδες.

Όπως προαναφέρθηκε, η **αιμοσφαιρίνη** των εγκύων γυναικών είναι ένας έμμεσος δείκτης, υποδηλωτικός της επέκτασης του ενδαγγειακού όγκου κατά την εγκυμοσύνη. Καθώς προχωρά η κύηση η τιμή της πέφτει, λόγω αιμοαραίωσης και το φαινόμενο είναι φυσιολογικό και αναμενόμενο. Στις περιπτώσεις που δεν επιτυγχάνεται αυτή η επέκταση η αιμοσφαιρίνη παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα λόγω έλλειψης αιμοαραίωσης και προδιαθέτει για την μελλοντική εμφάνιση προεκλαμψίας που περιπλέκει την κύηση με διαφυγή των ενδαγγειακών υγρών στον εξωαγγειακό χώρο και έντονη αιμοσυμπύκνωση. Από την συγκριτική ανάλυση δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις τιμές αιμοσφαιρίνης στις 3 ομάδες.

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν ο **αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων** στα δείγματα περιφερικού αίματος των γυναικών. Είναι γνωστό ότι τα λευκά αιμοσφαίρια αυξάνονται μεταξύ άλλων σε περιπτώσεις στρες και λοιμώξεων. Ορισμένες λοιμώξεις (TORCH: Τοξόπλασμα, Ερυθρά, Κυτταρομεγαλοϊός, Έρπης) μπορεί να προκαλέσουν υπολειπόμενη ανάπτυξη και είχαν αποκλειστεί από τον προγεννητικό έλεγχο. Σε περιπτώσεις όμως φλεγμονής των υμένων (χοριοαμνιονίτιδα) μπορεί να αυξηθεί ο αριθμός των

λευκών αιμοσφαιρίων. Δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον αριθμό των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα των εγκύων στις τρεις συγκρινόμενες ομάδες.

Και στη μελέτη του **αριθμού των αιμοπεταλίων** στο περιφερικό αίμα των εγκύων γυναικών δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Το σκεπτικό της σύγκρισης βρίσκεται στο γεγονός ότι οποιαδήποτε πτώση τους μπορεί να υποδηλώνει μικροαγγειοπαθητική καταστροφή τους ή και προβαθμίδα του συνδρόμου **HELLP** (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet counts).

Σχετικά με το HELLP εντάσσεται και η σύγκριση τιμών της **οξαλοξικής τρανσαμινάσης (SGOT)** στο περιφερικό αίμα των εγκύων στις 3 ομάδες. Δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Παράλληλα μελετήθηκαν οι τιμές **ουρίας** στο περιφερικό αίμα των εγκύων γυναικών και δεν βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές και στις τρεις ομάδες.

Η ουρία προκύπτει από την σύζευξη αμινοομάδων που προκύπτουν από τον κύκλο της ουρίας και την οξειδωτική απαμίνωση των αμινοξέων και οι οποίες με τη μορφή αυτή απεκκρίνονται από τον οργανισμό, κυρίως από τους νεφρούς. Οι φυσιολογικές τιμές **ουρίας** στο αίμα είναι 2.1 - 7.1 mmol/L. Αυξημένες τιμές ουρίας μπορεί να αντανακλούν δίαιτα υψηλής λήψης πρωτεϊνών, υποογκαιμία, μειωμένη σπειραματική διήθηση στους νεφρούς και καταβολισμό. Μειωμένες τιμές ουρίας μπορεί να εμφανιστούν μεταξύ άλλων σε υποσιτισμό. Με τον προσδιορισμό της ουρίας στο αίμα των εγκύων γυναικών αποκτούμε ταυτόχρονα ποικίλες πληροφορίες για την θρέψη και τη νεφρική τους λειτουργία.

Στις τιμές του **ουρικού οξέος** βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ IUGR και SGA ως προς την ομάδα ελέγχου, αλλά όχι μεταξύ τους. Όπως προαναφέρθηκε, το ουρικό οξύ του περιφερικού αίματος της μητέρας στην κύηση αντανακλά την νεφρική της



λειτουργία. Είναι μεταβολικό παράγωγο κατά τη διαδικασία απομάκρυνσης των πουρινών από τον οργανισμό. Απεκκρίνεται από τους νεφρούς και η συγκέντρωσή του στο περιφερικό αίμα αυξάνεται ως αποτέλεσμα διαταραγμένης νεφρικής λειτουργίας. Κατά το μέσο και τελευταίο τρίμηνο της κύησης ο έλεγχος των τιμών του ουρικού οξέως είναι επιβεβλημένος για την πρόωμη αναγνώριση στοιχείων τοξιναιμίας της κύησης.

Τέλος, ο χρόνος προθρομβίνης (PT) στο περιφερικό αίμα της μητέρας αντανακλά τη λειτουργία του ήπατος και του εξωγενούς συστήματος πήξης. Πιο αξιόπιστος δείκτης είναι το INR (International Normalized Ratio) όπου η τιμή του PT έχει υποστεί σύγκριση με την τιμή «μάρτυρα» και εκφράζεται ως καθαρός λόγος. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις τιμές INR και στις τρεις ομάδες.

Τέλος, στη μελέτη του δείκτη παλμικότητας (PI) στα τελικά ντόπλερ των ομφαλικών αρτηριών των εμβρύων βρέθηκαν στατιστικώς λίαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των εμβρύων της ομάδας ελέγχου και IUGR, στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ SGA και IUGR εμβρύων και καθόλου στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ εμβρύων της ομάδας ελέγχου και της ομάδος SGA. Τα στοιχεία αυτά ήταν αναμενόμενα.

Μέσω των παραπάνω στατιστικών συγκρίσεων **εξασφαλίστηκαν** προκαταρκτικά ορισμένες **ποιοτικές προϋποθέσεις εξάλειψης συγχυτικών παραγόντων** προτού πραγματοποιηθεί η ερμηνεία των αποτελεσμάτων των μοριακών τεχνικών:

1. Η συγκρότηση των ομάδων ήταν ακριβής, με βάση τα αληθή βάρη γέννησης και των αντίστοιχων εκατοστιαίων θέσεων των εμβρύων, και όχι με βάση υπερηχογραφικές εκτιμήσεις.

2. Απουσίαζαν συγγυτικοί παράγοντες στην φυσιολογία των έγκυων γυναικών, όπως αυτό αντανακλάται σε αιματολογικούς και βιοχημικούς δείκτες στο περιφερικό αίμα των εγκύων.
3. Οι εβδομάδες πραγματοποίησης των καισαρικών τομών δεν διέφεραν σημαντικά και στις τρεις ομάδες ώστε μεσοσταθμικά να υπάρχουν συγκρίσιμοι χρόνοι ενδομήτριας παραμονής των εμβρύων.
4. Οι διαφορές στα ντόπλερ των εμβρύων ήταν οι αναμενόμενες.

Η ανάλυση της έκφρασης όλων των υπό εξέταση γονιδίων σε όλα τα δείγματα επιτεύχθηκε με πλήρη τρόπο μόνο στα Passages 0 και 1 (P0, P1). Για τον λόγο αυτό δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση για τα επόμενα Passages, καθώς θα υπήρχαν πολλά κενά πεδία για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Πρώτο γονίδιο προς ανάλυση ήταν της **IGF2BP1** (CRDBP), για το οποίο βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μόνο μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας IUGR μόνο στο P0, αλλά όχι στο P1. Οι ενδιάμεσες συγκρίσεις ως προς την ομάδα SGA δεν έδιναν στατιστικώς σημαντικές διαφορές αντίστοιχα. Αυτό αποτυπώθηκε και στους θερμοκούς χάρτες, όπου τόσο στο P0, όσο και στο P1 δεν παρατηρείται κάποια τιμή έκφρασης που να διαφοροποιείται ιδιαίτερα και να υπερχρωματίζει κάποιο πλακίδιο. Το στοιχείο αυτό είναι σημαντικό, καθώς έχει προαναφερθεί ότι η υπερέκφραση της IGF2BP1 σχετίζεται με την προαγωγή όγκων. Περίπου και στις 3 ομάδες η έκφραση ήταν περίπου στην ίδια τάξη μεγέθους με σταθερά χαμηλότερες τιμές για την ομάδα IUGR σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά την ομάδα ελέγχου φάνηκε ότι η διασπορά των τιμών μειώθηκε στην P1 σειρά σε σχέση με την P0 με τάσεις καθήλωσης των τιμών προς τα κάτω, ενώ η ομάδα των IUGR διατήρησε παρόμοια χαμηλό επίπεδο έκφρασης, τόσο στην P0, όσο και στην

P1, χωρίς τάσεις περαιτέρω καθήλωσης. Συμπερασματικά, δεν φαίνεται να υπάρχουν κάποιες επιγενετικές υπογραφές αναφορικά με την έκφραση της IGF2BP1 στις ομάδες IUGR και SGA.

Η έκφραση της **P21** παρουσιάζει στην P0 μεγάλη διασπορά τιμών πρωτίστως για την ομάδα IUGR και δευτερευόντως για την ομάδα ελέγχου με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Η εικόνα αλλάζει ελαφρώς στην P1 όπου μειώνεται η διασπορά και ανέρχονται μεσοσταθμικά οι τιμές στην ομάδα IUGR (διάμεσος τιμή 537,9 έναντι 428,7), ενώ στην ομάδα ελέγχου αυξάνεται η διασπορά, χωρίς κάποια μετατόπιση του κέντρου βάρους, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται κι εδώ κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ακόμη και η οριακή στατιστικώς σημαντική διαφορά που είχε παρατηρηθεί ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και την ομάδα SGA στην P0 (687.1 έναντι 274.3, P=0.0242)., φαίνεται να εξανεμίζεται στην P1. Φαίνεται ότι τα IUGR έμβρυα στην P1 εκφράζουν την P21 λίγο περισσότερο, χωρίς ωστόσο να μπορεί να τεκμηριωθεί κάτι σε στατιστικό επίπεδο. Συγκριτικά με την IGF2BP1 η P21 εκφράζεται ποσοτικά τουλάχιστον σε δεκαπλάσιο επίπεδο – διαφορά μιας δεκαδικής τάξης μεγέθους. Και στην P21 φαίνεται να απουσιάζουν επιγενετικές υπογραφές στις ομάδες IUGR και SGA.

Η έκφραση του **NANOG** παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα P0 και P1. Και στα δύο passages οι τιμές της ομάδας ελέγχου ως προς την ομάδα IUGR διαφέρουν σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό (p=0.04 και p=0.02 αντίστοιχα). Το διάμεσο επίπεδο έκφρασης της NANOG στην ομάδα IUGR στα P0 και P1 βρίσκεται περίπου στη μονάδα, ήτοι  $10^0$ . Αντιθέτως, το διάμεσο επίπεδο έκφρασης της NANOG στην P0 της ομάδας ελέγχου βρίσκεται στην τάξη μεγέθους  $2 \times 10^1$ , ενώ στην P1 βρίσκεται στο επίπεδο  $10^4$ . Πρόκειται για αύξηση της έκφρασης της NANOG στην ομάδα ελέγχου κατά 3 τάξεις μεγέθους

μεταξύ P0 και P1 και διεύρυνση της διαφοράς έκφρασης ως προς τα IUGR από τη μία στις τέσσερις δεκαδικές τάξεις μεγέθους. Αυτή η υπερέκφραση της NANOG στα δείγματα της ομάδας ελέγχου στην P1 έχει ήδη αποτυπωθεί και στην ανάλυση των αποτελεσμάτων των θερμικών χαρτών (Heat Maps) που αναφέρθηκαν παραπάνω. Από εναλλακτική οπτική γωνία φαίνεται ότι τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της ομάδας IUGR δεν καταφέρνουν να υπερεκφράσουν στην ανακαλλιέργεια P1 το NANOG όπως αυτά από την ομάδα ελέγχου. Πιθανόν κάποια επιγενετική ρύθμιση στα κύτταρα της ομάδας IUGR να μην επιτρέπει να εκδηλωθεί αυτή η αναπληρωματική αύξηση. Παράλληλα η έκφραση της NANOG στα SGA έμβρυα μεταξύ P0 και P1 καταφέρνει να ανέλθει αναπληρωματικά μόνο κατά μια δεκαδική τάξη μεγέθους (0,689 έναντι 5,503).

Η έκφραση της **GLI1** παρουσιάζει ένα παρόμοιο φαινόμενο όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας IUGR. Ενώ στην P0 η διάμεση τιμή της έκφρασή τους είναι σχεδόν παραπλήσια και χαμηλή (19,76 έναντι 14,31), χωρίς να παρουσιάζει στατιστικώς σημαντική διαφορά, στην P1 η έκφραση της GLI1 στην ομάδα ελέγχου ανέρχεται κατά δύο δεκαδικές τάξεις (και δημιουργεί στατιστικώς σημαντική διαφορά), ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο στην ομάδα IUGR που παραμένει περίπου στα ίδια επίπεδα (7170 έναντι 10,91). Το ίδιο ισχύει και για τα κύτταρα SGA που διατηρούν την ίδια τάξη μεγέθους με τα IUGR, τόσο στην P0, όσο και στην P1. Από διαφορετική οπτική σκοπιά, τα IUGR και τα SGA κύτταρα δεν καταφέρνουν να πετύχουν αναπληρωματική αύξηση της έκφρασης της GLI1. Πιθανόν, κάποια επιγενετική ρύθμιση να μην επιτρέπει αυτή την αναπληρωματική αύξηση της έκφρασης της GLI1 στην ανακαλλιέργεια των IUGR και των SGA.

Αναφορικά με την έκφραση του **OCT4** παρατηρούνται αντίστοιχες διαφορές στα P0 και P1. Στην P0 οι διάμεσες τιμές έκφρασης του OCT4 μεταξύ ομάδας ελέγχου και IUGR βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους (1,487 έναντι 0,4584), χωρίς στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Σε σχέση, όμως, με τα προηγούμενα γονίδια που έχουν αναφερθεί βρίσκονται συγκριτικά σε πολύ χαμηλά απόλυτα επίπεδα. Στην P1 το χάσμα έκφρασης του OCT4 μεταξύ των δύο ομάδων διευρύνεται (1744 έναντι 0,3527) σε μια διαφορά τουλάχιστον τριών δεκαδικών τάξεων μεγέθους που παράγει μια στατιστικώς σημαντική διαφορά ( $p=0.03$ ) που δεν προϋπήρχε στην P0. Κι εδώ φαίνεται ότι τα κύτταρα από IUGR έμβρυα φαίνεται να έχουν κάποια πιθανή επιγενετική ρύθμιση που δεν τους επιτρέπει να πραγματοποιήσουν αυτή την αναπληρωματική έκφραση του OCT 4. Παράλληλα η έκφραση της OCT4 στα SGA έμβρυα μεταξύ P0 και P1 καταφέρνει να ανέλθει αναπληρωματικά μόνο περίπου κατά μια δεκαδική τάξη μεγέθους (0,1615 έναντι 1,279), όπως και στο NANOG.

Στην ανάλυση αποτελεσμάτων της έκφρασης του **SOX2** στα P0 και P1 δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις ανά ζεύγη συγκρίσεις των διαμέσων τιμών των τριών ομάδων. Ωστόσο παρατηρείται κι εδώ το ίδιο φαινόμενο στη σύγκριση των διαμέσων τιμών στα διαφορετικά Passage. Ενώ στην P0 οι διάμεσες τιμές έκφρασης του SOX2 των IUGR και SGA είναι στην ίδια τάξη μεγέθους (2,383 έναντι 2,090), η διάμεση τιμή έκφρασης του SOX2 στην ομάδα ελέγχου είναι 20,01 παρουσιάζοντας διαφορά μιας δεκαδικής τάξης. Στην P1 οι διάμεσες τιμές έκφρασης του SOX2 στα IUGR και SGA έμβρυα είναι σχεδόν παραπλήσιες (4,403 έναντι 5,335), ενώ στην ομάδα ελέγχου η διάμεση τιμή 5545 υποδηλώνει διαφορά τριών δεκαδικών τάξεων μεγέθους και μια συγκριτική αύξηση σε σχέση με την P0 της τάξης των δύο δεκαδικών τάξεων μεγέθους. Φαίνεται ότι

σε παρόμοιο βαθμό τα κύτταρα των IUGR και SGA ομάδων έχουν κάποια πιθανή επιγενετική ρύθμιση που παρεμποδίζει την αναπληρωματική αύξηση της έκφρασης.

Τέλος, στην ανάλυση αποτελεσμάτων της έκφρασης του CMYC στα P0 και P1 δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις ανά ζεύγη συγκρίσεις των διαμέσων τιμών των τριών ομάδων. Ωστόσο παρατηρείται κι εδώ το ίδιο φαινόμενο στη σύγκριση των διαμέσων τιμών. Ενώ στην P0 οι διάμεσες τιμές έκφρασης του CMYC των IUGR και SGA είναι στην ίδια τάξη μεγέθους (76,65 έναντι 88,22), η διάμεση τιμή έκφρασης του CMYC στην ομάδα ελέγχου είναι 261,9 παρουσιάζοντας διαφορά μισής δεκαδικής τάξης. Στην P1 οι διάμεσες τιμές έκφρασης του CMYC στα IUGR και SGA έμβρυα είναι σχεδόν παραπλήσιες (124 έναντι 154,1) και έχουν υποστεί διπλασιασμό επιπέδων σε σχέση με την P0, ενώ στην ομάδα ελέγχου η διάμεση τιμή 2009 υποδηλώνει μια συγκριτική αύξηση σε σχέση με την P0 της μίας δεκαδικής τάξης μεγέθους. Φαίνεται ότι σε παρόμοιο βαθμό τα κύτταρα των IUGR και SGA ομάδων έχουν κάποια πιθανή επιγενετική ρύθμιση που παρεμποδίζει την αναπληρωματική αύξηση, σε λιγότερο ωστόσο βαθμό σε σχέση με τα παραπάνω γονίδια.

Αναδιατυπώνοντας τα παραπάνω ευρήματα, μπορεί κανείς να μιλήσει για δύο επίπεδα συγκριτικής ανάγνωσης των αποτελεσμάτων:

Στο πρώτο, **οριζόντιο επίπεδο**, εάν συγκρίνουμε τις διαφορές έκφρασης των γονιδίων IGF2BP1, P21, NANOG, GLI1, OCT, SOX2 και CMYC στην P0 θα διαπιστώσουμε ότι μόνο στα γονίδια IGF2BP1 και NANOG υπάρχουν διαφορές έκφρασης ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα των IUGR. Στα γονίδια GLI1 και OCT4 υπάρχει διαφορά μεταξύ IUGR και AGA στην P1 που δεν προϋπήρχε στην P0. Το NANOG είναι το μόνο γονίδιο όπου η διαφορά μεταξύ IUGR και AGA ενισχύεται από την P0 στην P1.

Στο δεύτερο, **κατακόρυφο επίπεδο**, ανάγνωσης των αποτελεσμάτων διαπιστώνει κανείς ότι η ανακαλλιέργεια και η παροχή θρεπτικών υλικών (P1) αλλάζει την κλίμακα έκφρασης των γονιδίων NANOG, GLI1, OCT4, SOX2 και CMYC στις τρεις ομάδες, ενώ δεν ασκεί καμιά επίδραση στην κλίμακα της έκφρασης των γονιδίων IGF2BP1 και P21.

Και για τα **πέντε** προαναφερθέντα **γονίδια** στην P1 ως προς την P0 προκύπτει μια **ισχυρή αναπληρωματική έκφρασή** τους για την ομάδα ελέγχου που δεν την ακολουθούν τα κύτταρα της ομάδας IUGR. Τα κύτταρα της ομάδας SGA ακολουθούν μια ενδιάμεση πορεία. Ενδεχομένως, να πρόκειται για το αποτέλεσμα κάποιας **πιθανής επιγενετικής παρεμπόδισης** που προκλήθηκε από την ενδομήτρια ένδεια υποστρωμάτων και που δεν ανατάσσεται in vitro παρά την απρόσκοπτη παροχή θρεπτικών παραγόντων.

Ειδικότερα, στην P1 η έκφραση του **NANOG** και του **OCT4** στα κύτταρα της **ομάδας ελέγχου αυξάνεται κατά τρεις τάξεις μεγέθους του 10** ( $10^3$ ) (11136 έναντι 22.23 για το NANOG και 1744 έναντι 1.487 για OCT4), στα SGA κατά μια τάξη μεγέθους του δέκα (5.503 έναντι 0.689 για το NANOG και 1.279 έναντι 0.1615 για το OCT4), και στα IUGR καθόλου (1.090 έναντι 1.051 για το NANOG και 0.3527 έναντι 0.4584 για το OCT4). Επίσης, η έκφραση της **GLI1** στην P1 στα κύτταρα της **ομάδας ελέγχου αυξάνεται κατά δύο τάξεις μεγέθους του 10** (7170 έναντι 19.76), ενώ στα SGA και στα IUGR καθόλου (17.19 έναντι 10.30 και 10.91 έναντι 14.31 αντίστοιχα). Εξάλλου, η έκφραση της **SOX2** αυξάνεται στην P1 στα κύτταρα της **ομάδας ελέγχου αυξάνεται κατά δύο τάξεις μεγέθους του 10** (5546 έναντι 20.01), ενώ στα SGA και στα IUGR απλώς διπλασιάζεται (5.335 έναντι 2.090 και 5.335 έναντι 2.090). Τέλος, η έκφραση της **CMYC** στην P1 στα κύτταρα της **ομάδας ελέγχου αυξάνεται κατά μία τάξη μεγέθους του 10** (2009 έναντι

261.9), ενώ στα SGA και στα IUGR απλώς διπλασιάζεται (154.1 έναντι 88.22 και 124 έναντι 76.65).

Το **NANOG**, όπως προαναφέρθηκε, συνδέεται στον εκκινητή του **POU5F1/OCT4**. Όταν υπερεκφράζεται οδηγεί τα κύτταρα να εισέλθουν στην φάση S και να πολλαπλασιαστούν. Παρατηρεί κανείς ότι υπάρχει σχεδόν παρόμοια μεταβολή τάξης μεγέθους των επιπέδων έκφρασης και για τα δύο σε κάθε κατηγορία και σε κάθε Passage.

Τα **NANOG**, **OCT4** και **SOX2** ως γνωστόν βάζουν τα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται και διατηρούν τον πλειοδύναμο χαρακτήρα των βλαστικών κυττάρων. Η **OCT4** επάγει τον ταχύ κυτταρικό κύκλο επάγοντας την παραμονή στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου μέσω μεταγραφικής αναστολής της P21, κάτι που επιβεβαιώνεται από τα συνεχώς χαμηλά επίπεδα της P21.



## 4.5. Συμπεράσματα

Η υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη συνιστά σε παγκόσμιο επίπεδο σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας και οφείλεται σε πλημμελή πλακουντιακή τροφοδοσία του εμβρύου. Εκτός από την αυξημένη νοσηρότητα, το χαμηλό βάρος γέννησης και την προωρότητα που δεσμεύουν σημαντικούς πόρους υγείας, συνεπάγεται για τα πάσχοντα άτομα και μόνιμες επιγενετικές προσαρμογές λιτού μεταβολικού φαινότυπου που επιβεβαιώνουν την υπόθεση του Barker.

Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την χρήση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων για πειραματικές θεραπευτικές ιατρικές εφαρμογές, τόσο με τη μορφή της ιστικής-αναγεννητικής ιατρικής, όσο και εντοπισμένης αντικαρκινικής ιατρικής. Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα από ομφαλίδες (UC-MSCs) συλλέγονται μαζικά και φυλάσσονται ανά τον κόσμο στις τράπεζες βλαστοκυττάρων λόγω της ευκολίας πρόσκτησής τους από απορριπτόμενους ιστούς της διαδικασίας του τοκετού και εν αναμονή μελλοντικών εφαρμογών.

Από την προαναφερόμενη συζήτηση ανάλυσης των αποτελεσμάτων της παρούσης εργασίας επιβεβαιώνεται ότι τα βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από ομφαλίδες από την ομάδα ελέγχου διατηρούν την πολυδυναμικότητά τους και την υπερεκφράζουν σε εργαστηριακές συνθήκες ανακαλλιέργειας και τροφοδοσίας με θρεπτικά υποστρώματα, ενώ τα αντίστοιχα βλαστικά κύτταρα από έμβρυα IUGR και SGA έχουν μειωμένη, πιθανόν με επιγενετικό τρόπο, δυνατότητα αναπληρωματικής έκφρασης ορισμένων γονιδίων πλειοδυναμικότητας ή παρουσιάζουν σχετικές τάσεις.

Το γεγονός αυτό ίσως να καθιστά προβληματική την λήψη μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSC) από ομφαλίδες εμβρύων με IUGR και SGA ως πηγή υλικού προς αποθήκευση και μελλοντική χρήση για ιστικούς αναγεννητικούς θεραπευτικούς σκοπούς όπου η δημιουργία μεγάλων κυτταρικών πληθυσμών να είναι αναγκαία.

Ενδεχομένως, όμως, το μειονέκτημα αυτό να μετατρέπεται σε πλεονέκτημα σε ογκολογικές θεραπευτικές εφαρμογές, όπου τα βλαστοκύτταρα εργάζονται σαν θεραπευτικά οχήματα και το ζητούμενο δεν είναι να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν ιστούς, αλλά να προσεγγίσουν τους ογκογόνους ιστούς που χαρακτηρίζονται από περιοχές υποξίας και να παρέχουν μεταφορικό έργο (homing) χωρίς να επάγουν την αγγειογένεση και την επέκταση του όγκου. Και ίσως η ενδομήτρια προσαρμογή των UC-MSCs από IUGR σε συνθήκες διαλείπουσας υποξίας και μειωμένης παροχής υποστρωμάτων να αποτελεί πλεονέκτημα διείσδυσης και επιβίωσης στις περιοχές των όγκων που παρουσιάζουν υποξία. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες στο μέλλον, με μεγαλύτερους αριθμούς δειγμάτων και ανακαλλιεργητικών σειρών από IUGR και SGA έμβρυα πάνω σε αυτή την πιθανή υπόθεση.

## 5. Περίληψη στα Αγγλικά (Abstract)

### Abstract

**Background and Objectives:** Intrauterine growth restriction (IUGR) is worldwide a public health problem. IUGR-born individuals acquire epigenetic “thrifty-phenotype” gene adaptations, according to the “Barker hypothesis” and are more susceptible to develop metabolic related diseases. Small for Gestational Age (SGA) fetuses consist of a transitional group between IUGR and normally grown fetuses (Appropriate for Gestational Age, AGA). Currently, there is limited information in the literature whether IUGR or SGA status affects the pluripotency of the Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell (UC-MSC) with respect to gene expression at various stages of cell culture.

**Materials and Methods:** In this study, we investigated stemness marker expression in UC-MSCs derived from twenty-one AGA, IUGR, and SGA fetuses. The relative expression of key genes involved in stemness, pluripotency, and cell proliferation, namely IGF2BP1, CMYC, GLI1, P21, NANOG, OCT4, and SOX2, was assessed in UC-MSCs at passages P0 and P1 using flow cytometry and quantitative PCR.

**Results:** We found lower median expression levels of IGF2BP1 in IUGR group (P=0.044) and P21 in SGA group (P=0.024) at P0 compared to control group. GLI1 and OCT4 exhibited reduced expression at P1 in the IUGR group (P=0.0434 and P=0.0343 respectively) compared to AGA. NANOG median expression differed statistically between

CONTROL and IUGR group in P0 (P=0.034) and P1 (P=0.0205). No significant changes were noted for SOX2 and CMYC median expression among the various groups in P0 and P1.

**Conclusion:** The comparative analysis of stemness marker expression among UC-MSCs from these three different sources is a novel descriptive aspect of our study, adding a new perspective to the existing literature.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Kermack WO, McKendrick AG, McKinlay PL. Death-rates in Great Britain and Sweden: Expression of Specific Mortality Rates as Products of Two Factors, and some Consequences thereof. *J Hyg (Lond)*. 1934 Dec;34(4):433-57
2. Kermack WO, McKendrick AG, McKinlay PL. Death-rates in Great Britain and Sweden. Some general regularities and their significance. *Int J Epidemiol*. 2001 Aug;30(4):678-83. doi: 10.1093/ije/30.4.678.
3. Forsdahl, A. (1977) Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* 31, 91–95.
4. Barker, D. J., and Osmond, C. (1986) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1, 1077–1081.
5. Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D., and Wadsworth, M. E. (1989) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298, 564–567.
6. Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C., and Simmonds, S. J. (1990) Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 301, 259–262.
7. Gennser, G., Rymark, P., and Isberg, P. E. (1988) Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296, 1498–1500.
8. Eriksson, J. G., Forsén, T., Tuomilehto, J., Winter, P. D., Osmond, C., and Barker, D. J. P. (1999) Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: Longitudinal study. *BMJ* 318, 427–431.

9. Eriksson, J., Forsen, T., Tuomilehto, J., Osmond, C., and Barker, D. (2000) Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension* 36, 790–794.
10. Eriksson, J. G., Forsén, T., Tuomilehto, J., Osmond, C., and Barker, D. J. P. (2001) Early growth and coronary heart disease in later life: Longitudinal study. *BMJ* 322, 949–953.
11. Hales, C. N., and Barker, D. J. P. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595–601. DOI:
12. Hales, C. N., and Barker, D. J. P. (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60, 5–20.
13. Rich-Edwards, J. W., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Gillman, M. W., Hennekens, C. H., Speizer, F. E., and Manson, J. E. (1999) Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann Intern Med* 130, 278–284.
14. Ong, K. K., Petry, C. J., Emmett, P. M., Sandhu, M. S., Kiess, W., Hales, C. N., Ness, A. R., and Dunger, D. B. (2004) Insulin sensitivity and secretion in normal children related to size at birth, postnatal growth, and plasma insulin-like growth factor-I levels. *Diabetologia* 47, 1064–1070
15. Barker, D. J., Hales, C. N., Fall, C. H., Osmond, C., Phipps, K., and Clark, P. M. (1993) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36, 62–67.
16. Motala, A. A. (2002) Diabetes trends in Africa. *Diabetes Metab Res Rev* 18, S14–S20.

17. Ravelli, A. C., van der Meulen, J. H., Michels, R. P., Osmond, C., Barker, D. J., Hales, C. N., and Bleker, O. P. (1998) Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet* 351, 173–177.
18. Li, Y., Jaddoe, V. W., Qi, L., He, Y., Wang, D., Lai, J., Zhang, J., Fu, P., Yang, X., and Hu, F. B. (2011) Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of metabolic syndrome in adulthood. *Diabetes Care* 34, 1014–1018
19. Archer, E. 2015a. The childhood obesity epidemic as a result of nongenetic evolution: The maternal resources hypothesis. *Mayo Clin Proc* 90 (1):77–92. doi:10.1016/j.mayocp.2014.08.006.
20. Westerterp, K. R. 2009. Dietary fat oxidation as a function of body fat. *Curr Opin Lipidol* 20(1):45–49.
21. Godfrey, K. M., P. M. Costello and K. A. Lillycrop (2016). Development, epigenetics and metabolic programming. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 85: 71–80
22. Bertram, C., Trowern, A.R., Copin, N. et al. 2001. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: Potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology* 142:2841–2853.
23. Ostreicher, I., Almeida, J.R., Campean, V. et al. 2010. Changes in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in a low-protein rat model of intrauterine growth restriction. *Nephrol Dial Transplant* 25:3195–3203
24. Cherif, H., Reusens, B., Ahn, M-T. et al. 1998. Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low protein diet. *J Endocrinol* 159:341–348

25. Hill, D.J. 2011. Nutritional programming of pancreatic  $\beta$ -cell plasticity. *World J Diabetes* 2:119–132.
26. Heijmans, B.T., Tobi, E.W. et al. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17046–17049.
27. Lassarre, C., S. Hardouin, F. Daffos, F. Forestier, F. Frankenne, and M. Binoux. 1991. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 29 (3):219–225.
28. Mirlesse, V., F. Frankenne, E. Alsat, M. Poncelet, G. Hennen, and D. Evain-Brion. 1993. Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 34 (4):439–442
29. Dessì A, Atzori L, Noto A, Visser GHA, Gazzolo D, Zanardo V, et al. Metabolomics in newborns with intrauterine growth retardation (IUGR): Urine reveals markers of metabolic syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011 Oct;24 Suppl 2: 35– 9.
30. Favretto D, Cosmi E, Ragazzi E, Visentin S, Tucci M, Fais P, et al. Cord blood metabolomic profiling in intrauterine growth restriction. *Anal Bioanal Chem* 2012 Jan;
31. Pirola, C. J., Scian, R., Gianotti, T. F. et al. Epigenetic modifications in the biology of nonalcoholic fatty liver disease: The role of DNA hydroxymethylation and TET proteins, *Medicine*. 94, no. 36 (2015b): e1480.



32. Demerath, E. W., Cameron, N., Gillman, M. W., Towne, B., and Siervogel, R. M. Telomeres and telomerase in the fetal origins of cardiovascular disease: A review, *Hum Biol.* 76, no. 1 (2004): 127–46.
33. von, Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres, *Trends Biochem Sci.* 27, no. 7 (2002): 339–44.
34. Entringer, S., Buss, C., and Wadhwa, P. D. Prenatal stress, telomere biology, and fetal programming of health and disease risk, *Sci Signal.* 5, no. 248 (2012): t12.
35. Biron-Shental, T., Sukenik, Halevy R., Goldberg-Bittman, L. et al. Telomeres are shorter in placental trophoblasts of pregnancies complicated with intrauterine growth restriction (IUGR), *Early Hum Dev.* 86, no. 7 (2010): 451–6.
36. Davy, P., Nagata, M., Bullard, P., Fogelson, N. S., and Allsopp, R. Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta, *Placenta.* 30, no. 6 (2009): 539–42
37. Fyhrquist, F., Saijonmaa, O., and Strandberg, T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease, *Nat Rev Cardiol.* 10, no. 5 (2013): 274–83.
38. Tarry-Adkins, J. L., Martin-Gronert, M. S., Chen, J. H. et al. Maternal diet influences DNA damage, aortic telomere length, oxidative stress, and antioxidant defense capacity in rats, *FASEB J.* 22, no. 6 (2008): 2037–44.
39. Tarry-Adkins, J. L., Chen, J. H., Smith, N. S. et al. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to telomere shortening and increased markers of cell senescence in rat islets, *FASEB J.* 23, no. 5 (2009): 1521–8.

40. Figueras F, Gratacós E. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage- based management protocol. *Fetal Diagn Ther* 2014; 36: 86 – 98.
41. Mayer C, Joseph KS. Fetal growth: A review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013 Feb; 41 (2): 136– 45
42. Gardosi J, Madurasinghe V, Williams M, Malik A, Francis A. Maternal and fetal risk factors for stillbirth: Population based study. *BMJ* 2013; 346: f108.
43. Kovo M, Schreiber L, Ben- Haroush A, Wand S, Golan A, Bar J. Placental vascular lesion differences in pregnancy- induced hypertension and normotensive fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2010 Jul; 202 (6): 561.e1– 5.
44. Odibo AO, Patel KR, Spitalnik A, Odibo L, Huettner P. Placental pathology, first-trimester biomarkers and adverse pregnancy outcomes. *J Perinatol* 2014; 34: 186– 91.
45. Mifsud W, Sebire NJ. Placental pathology in early onset and late- onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther* 2014 Jan; 36 (2): 117– 28
46. Roberge S, Nicolaides KH, Demers S, Villa P, Bujold E. Prevention of perinatal death and adverse perinatal outcome using low- dose aspirin: A meta- analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41: 491– 9
47. Karagiannis G, Akolekar R, Sarquis R, Wright D, Nicolaides KH. Prediction of small- for- gestation neonates from biophysical and biochemical markers at 11– 13 weeks. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29: 148– 54.

48. Plasencia W, Akolekar R, Dagklis T, Veduta A, Nicolaides KH. Placental volume at 11–13 weeks' gestation in the prediction of birth weight percentile. *Fetal Diagn Ther* 2011; 30: 23–8
49. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, Porter TF, Luthy D, Comstock CH, et al. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: A population-based screening study (The FASTER Trial). *Am J Obstet Gynecol* 2004: 1446–1451.
50. Poon L, Zaragoza E, Akolekar R, Anagnostopoulos E, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor (PIGF) in small for gestational age pregnancy at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation. *Prenat Diagn* 2008; 28: 1110–15.
51. Sifakis S, Akolekar R, Kappou D, Mantas N, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth hormone at 11–13 weeks' gestation in pregnancies delivering small for gestational age neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012: 1796–9.
52. Stamatopoulou A, Cowans NJ, Matwejew E, Von Kaisenberg C, Spencer K. Placental protein-13 and pregnancy-associated plasma protein-A as first trimester screening markers for hypertensive disorders and small for gestational age outcomes. *Hypertens Pregnancy* 2011: 384–95
53. Poon LCY, Chelemen T, Granvillano O, Pandeva I, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum a-disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) and adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 2008 Nov; 112 (5): 1082–90.
54. Maitre L, Fthenou E, Athersuch T, Coen M, Toledano MB, Holmes E, et al. Urinary metabolic profiles in early pregnancy are associated with preterm birth and fetal

growth restriction in the Rhea mother- child cohort study. *BMC Med* 2014 Jan;12: 110.

55. Cnossen JS, Morris RK, Ter Riet G, Mol BWJ, Van der Post JAM, Coomarasamy A, et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre- eclampsia and intrauterine growth restriction: A systematic review and bivariable meta- analysis. *CMAJ* 2008 Mar 11; 178 (6): 701– 11
56. Napolitano R, Melchiorre K, Arcangeli T, Dias T, Bhide A, Thilaganathan B. Thilaganathan. Screening for pre- eclampsia by using changes in uterine artery Doppler indices with advancing gestation. *Prenat Diagn* 2012; 32: 180– 4.
57. Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, Zwinderman AH, Robson SC, Bindels PJ, Kleijnen J, Khan KS. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre- eclampsia and intrauterine growth restriction: A systematic review and bivariable meta- analysis. *CMAJ* 2008; 178: 701– 11.
58. Conde-Agudelo A, Papageorgiou AT, Kennedy SH, Villar J. Novel biomarkers for predicting intrauterine growth restriction: A systematic review and metaanalysis. *BJOG* 2013; 120: 681– 94
59. Morris RK, Cnossen JS, Langejans M, Robson SC, Kleijnen J, Ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Khan KS. Serum screening with Down's syndrome markers to predict pre- eclampsia and small for gestational age: Systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 2008; 8: 33.

60. Audibert F, Benchimol Y, Benattar C, Champagne C, Frydman R. Prediction of preeclampsia or intrauterine growth restriction by second trimester serum screening and uterine Doppler velocimetry. *Fetal Diagn Ther* 2005; 20: 48 – 53
61. Bricker L, Neilson JP, Dowswell T. Routine ultrasound in late pregnancy (after 24 weeks' gestation). *Cochrane Database Syst Rev* 2008
62. Sovio U, White IR, Dacey A, Pasupathy D, Smith GC. Screening for fetal growth restriction with universal third trimester ultrasonography in nulliparous women in the Pregnancy Outcome Prediction (POP) study: A prospective cohort study. *Lancet* 2015; 386: 2089– 97.
63. Baschat A, Gembruch U, Harman CR. The sequence of changes in Doppler and biophysical parameters as severe fetal growth restriction worsens. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18: 571– 7
64. Baschat AA, Gembruch U. The cerebroplacental Doppler ratio revisited. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21: 124– 7
65. Kiserud T, Rasmussen S, Skulstad SM. Blood flow and degree of shunting through the ductus venosus in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 147– 53
66. Ferrazzi E, Bozzo M, Rigano S, et al. Temporal sequence of abnormal Doppler changes in the peripheral and central circulatory systems of the severely growth-restricted fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002; 19: 140– 6
67. Kiserud T, Kessler J, Ebbing C, et al. Ductus venosus shunting in growth- restricted fetuses and the effect of umbilical circulatory compromise. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006; 28: 143– 9

68. Haugen G, Hanson M, Kiserud T, et al. Fetal liversparing cardiovascular adaptations linked to mother's slimness and diet. *Circ Res* 2005; 96: 12 – 14
69. Konje JC, Bell SC, Taylor DJ. Abnormal Doppler velocimetry and blood flow volume in the middle cerebral artery in very severe intrauterine growth restriction: Is the occurrence of reversal of compensatory flow too late? *BJOG* 2001; 108: 973– 9
70. Cao J, Mu Q. The Roles of Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 2 in Cancer and Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2018 Mar 15;2018:4217259
71. Yufeng Xi and Yujia Wang, IGF2BP1, a New Target to Overcome Drug Resistance in Melanoma? *Front Pharmacol.* 2022; 13: 947363
72. Markus Glaß et al, IGF2BP1, a Conserved Regulator of RNA Turnover in Cancer. *Front Mol Biosci.* 2021 Mar 22;8:632219
73. Dimitriadis E, Trangas T, Milatos S, Foukas PG, Gioulbasanis I, Courtis N, et al. Expression of oncofetal RNA-binding protein CRD-BP/IMP1 predicts clinical outcome in colon cancer. *Int J Cancer.* 2007;121(3):486–94.
74. Rosenfeld, Y. B.-Z., Krumbein, M., Yeffet, A., Schiffmann, N., Mishalian, I., Pikarsky, E., et al. (2019). VICKZ1 enhances tumor progression and metastasis in lung adenocarcinomas in mice. *Oncogene* 38, 4169–4181.
75. Bell, J. L., Turlapati, R., Liu, T., Schulte, J. H., and Hüttelmaier, S. (2015). IGF2BP1 harbors prognostic significance by gene gain and diverse expression in neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 33, 1285–1293
76. Gutschner, T., Hämmerle, M., Pazaitis, N., Bley, N., Fiskin, E., Uckelmann, H., et al (2014). Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an

- important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 59, 1900–1911.
77. Köbel, M., Weidensdorfer, D., Reinke, C., Lederer, M., Schmitt, W. D., Zeng, K., et al. (2007). Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene* 26, 7584–7589.
  78. Vikesaa, J., Hansen, T. V., Jønson, L., Borup, R., Wewer, U. M., Christiansen, J., and Nielsen, F. C. (2006) RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J.* 25, 1456–1468
  79. Mayr, C. (2019). What are 3' UTRs doing? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, a034728
  80. Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., et al. (2018). Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat. Cell Biol.* 20, 285–295
  81. Müller, S., Glaß, M., Singh, A. K., Haase, J., Bley, N., Fuchs, T., et al. (2019). IGF2BP1 promotes SRF-dependent transcription in cancer in a m6A- and miRNA-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 47, 375–390.
  82. Bakheet, T., Williams, B. R. G., and Khabar, K. S. A. (2006). Ared 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res.* 34, D111–D114.
  83. Vikash Singh et al, The mRNA-binding protein IGF2BP1 maintains intestinal barrier function by up-regulating occludin expression, 2020 Jun 19;295(25):8602-8612
  84. Hung-Ming Chen et al, Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA-Binding Protein 1 (IGF2BP1) Is a Prognostic Biomarker and Associated with Chemotherapy Responsiveness in Colorectal Cancer, 2021 Jun 28;22(13):6940

85. LeRoith, D.; Roberts, C.T., Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003, 195, 127–137
86. Bell JL, Wächter K, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, Hüttelmaier S. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci.* 2013 Aug;70(15):2657-75
87. Hayashi Y, Caboni L, Das D, Yumoto F, Clayton T, Deller MC, Nguyen P, Farr CL, Chiu HJ, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Tomoda K, Conklin BR, Wilson IA, Yamanaka S, Fletterick RJ. Structure-based discovery of NANOG variant with enhanced properties to promote self-renewal and reprogramming of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Apr 14; 112(15):4666-71
88. Hoseini MS, Sheibani S, Sheikhvatan M. The evaluating of pregnancy-associated plasma protein-A with the likelihood of small for gestational age. *Obstet Gynecol Sci.* 2020 May;63(3):225-230. doi: 10.5468/ogs.2020.63.3.225. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32489966; PMCID: PMC7231942.
89. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):817-25.
90. Barr AR, Cooper S, Heldt FS, Butera F, Stoy H, Mansfeld J, Novák B, Bakal C. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat Commun.* 2017 Mar 20; 8:14728.
91. Chen H, Li C, Huang J, Cung T, Seiss K, Beamon J, Carrington MF, Porter LC, Burke PS, Yang Y, Ryan BJ, Liu R, Weiss RH, Pereyra F, Cress WD, Brass AL,



- Rosenberg ES, Walker BD, Yu XG, Lichterfeld M. CD4+ T cells from elite controllers resist HIV-1 infection by selective upregulation of p21. *J Clin Invest.* 2011 Apr;121(4):1549-60.
92. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature.* 1997 Oct 23;389(6653):876-81.
93. Fogarty NME, McCarthy A, Snijders KE, Powell BE, Kubikova N, Blakeley P, Lea R, Elder K, Wamaitha SE, Kim D, Maciulyte V, Kleinjung J, Kim JS, Wells D, Vallier L, Bertero A, Turner JMA, Niakan KK. Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis. *Nature.* 2017 Oct 5;550(7674):67-73.
94. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24731-7.
95. Velychko S, Adachi K, Kim KP, Hou Y, MacCarthy CM, Wu G, Schöler HR. Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell.* 2019 Dec 5;25(6):737-753.e4.
96. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009 Sep-Oct;1(2):228-236.
97. Diks SH, Bink RJ, van de Water S, Joore J, van Rooijen C, Verbeek FJ, den Hertog J, Peppelenbosch MP, Zivkovic D. The novel gene asb11: a regulator of the size of the neural progenitor compartment. *J Cell Biol.* 2006 Aug 14;174(4):581-92.

98. Lu Y, Futtner C, Rock JR, Xu X, Whitworth W, Hogan BL, Onaitis MW. Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One*. 2010 Jun 10;5(6):e11022.
99. Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB, Tom W, Paner GP, Szmulewitz RZ, Vander Griend DJ. Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):e53701.
100. Piva M, Domenici G, Iriando O, Rábano M, Simões BM, Comaills V, Barredo I, López-Ruiz JA, Zabalza I, Kypta R, Vivanco Md. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2014 Jan;6(1):66-79.
101. López-Juárez A, Remaud S, Hassani Z, Jolivet P, Pierre Simons J, Sontag T, Yoshikawa K, Price J, Morvan-Dubois G, Demeneix BA. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2012 May 4;10(5):531-43.
102. Dominguez-Sola D, Ying CY, Grandori C, Ruggiero L, Chen B, Li M, Galloway DA, Gu W, Gautier J, Dalla-Favera R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):445-51.
103. Denis N, Kitzis A, Kruh J, Dautry F, Corcos D. Stimulation of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by c-myc. *Oncogene*. 1991 Aug;6(8):1453-7. PMID: 1886715.
104. Chen Y, McGee J, Chen X, Doman TN, Gong X, Zhang Y, Hamm N, Ma X, Higgs RE, Bhagwat SV, Buchanan S, Peng SB, Staschke KA, Yadav V, Yue Y, Kouros-Mehr H. Identification of druggable cancer driver genes amplified across TCGA datasets. *PLoS One*. 2014 May 29; 9(5):e98293.

105. Abraham SA, Hopcroft LE, Carrick E, Drotar ME, Dunn K, Williamson AJ, Korfi K, Baquero P, Park LE, Scott MT, Pellicano F, Pierce A, Copland M, Nourse C, Grimmond SM, Vetrie D, Whetton AD, Holyoake TL. Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature*. 2016 Jun 16;534(7607):341-6.
106. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Mar;17(3):183-93. doi: 10.1038/nrm.2016.8. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26883003.
107. Carabet LA, Rennie PS, Cherkasov A. Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. *Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches*. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 29;20(1):120.
108. Kessler JD, Kahle KT, Sun T, Meerbrey KL, Schlabach MR, Schmitt EM, Skinner SO, Xu Q, Li MZ, Hartman ZC, Rao M, Yu P, Dominguez-Vidana R, Liang AC, Solimini NL, Bernardi RJ, Yu B, Hsu T, Golding I, Luo J, Osborne CK, Creighton CJ, Hilsenbeck SG, Schiff R, Shaw CA, Elledge SJ, Westbrook TF. A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science*. 2012 Jan 20;335(6066):348-53.
109. Muñoz-Najar U, Sedivy JM. Epigenetic control of aging. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jan 15;14(2):241-59.
110. Yang JH, Hayano M, Griffin PT, Amorim JA, Bonkowski MS, Apostolides JK, Salfati EL, Blanchette M, Munding EM, Bhakta M, Chew YC, Guo W, Yang X, Maybury-Lewis S, Tian X, Ross JM, Coppotelli G, Meer MV, Rogers-Hammond R, Vera DL, Lu YR, Pippin JW, Creswell ML, Dou Z, Xu C, Mitchell SJ, Das A,

- O'Connell BL, Thakur S, Kane AE, Su Q, Mohri Y, Nishimura EK, Schaevitz L, Garg N, Balta AM, Rego MA, Gregory-Ksander M, Jakobs TC, Zhong L, Wakimoto H, El Andari J, Grimm D, Mostoslavsky R, Wagers AJ, Tsubota K, Bonasera SJ, Palmeira CM, Seidman JG, Seidman CE, Wolf NS, Kreiling JA, Sedivy JM, Murphy GF, Green RE, Garcia BA, Berger SL, Oberdoerffer P, Shankland SJ, Gladyshev VN, Ksander BR, Pfenning AR, Rajman LA, Sinclair DA. Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. *Cell*. 2023 Jan 19;186(2):305-326.e27.
111. Mahaira LG, Katsara O, Pappou E, Iliopoulou EG, Fortis S, Antsaklis A, Fotinopoulos P, Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. IGF2BP1 expression in human mesenchymal stem cells significantly affects their proliferation and is under the epigenetic control of TET1/2 demethylases. *Stem Cells Dev*. 2014 Oct 15;23(20):2501-12.
112. M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller et al., "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement," *Cytherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006
113. Lin W, Huang L, Li Y, Fang B, Li G, Chen L, Xu L. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *Biomed Res Int*. 2019 May 8; 2019:2820853
114. Kim SM, Oh JH, Park SA, Ryu CH, Lim JY, Kim DS, Chang JW, Oh W, Jeun SS. Irradiation enhances the tumor tropism and therapeutic potential of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in glioma therapy. *Stem Cells*. 2010 Dec;28(12):2217-28

115. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, Svinarich D, Dodds R, Govind CK, Chaudhry GR. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Sep;13(9):1738-1755.
116. APGAR V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg.* 1953 Jul-Aug;32(4):260-7. PMID: 13083014.
117. Xie Q, Liu R, Jiang J, Peng J, Yang C, Zhang W, Wang S, Song J. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Res Ther.* 2020 Dec 1;11(1):519.
118. Friedenstein AJ, JF Gorskaja and NN Kulagina. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *ExpHematol* 4:267–274
119. Zhang L-T, Peng X-B, Fang X-Q, Li J-F, Chen H, Mao X-R. Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit proliferation of hepatic stellate cells in vitro. *Int J Mol Med.* 2018;41(5):2545–52.
120. Zheng B, Zhang P, Yuan L, Chhetri RK, Guo Y, Deng D. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on inflammatory factors and miR- 181a in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2020;29(2):126–35
121. Matas J, Orrego M, Amenabar D, Infante C, Tapia-Limonchi R, Cadiz MI, Alcayaga-Miranda F, González PL, Muse E, Khoury M, Figueroa FE, Espinoza F. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) for knee osteoarthritis: repeated MSC dosing is superior to a single MSC dose and to hyaluronic acid in a controlled randomized phase I/II trial. *Stem Cells Transl Med.* 2019;8(3):215–24.

122. Thomi G, Joerger-Messerli M, Haesler V, Muri L, Surbek D, Schoeberlein A. Intranasally administered exosomes from umbilical cord stem cells have preventive neuroprotective effects and contribute to functional recovery after perinatal brain injury. *Cells*. 2019;8(8):855.
123. Oppliger B, Joerger-Messerli M, Mueller M, Reinhart U, Schneider P, Surbek DV, Schoeberlein A. Intranasal delivery of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells preserves myelination in perinatal brain damage. *Stem Cells Dev*. 2016;25(16):1234–42.
124. Ruan Z-B, Zhu L, Yin Y-G, Chen G-C. Inhibitor of p53-p21 pathway induces the differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into cardiomyogenic cells. *Cytotechnology*. 2016;68(4):1257–65.
125. Yang L, Zhu S, Li Y, Zhuang J, Chen J, HuanleiHuang YC, Wen Y, Wen Y, Guo H, Fan X, WuzhouYuan ZJ, Wang Y, Wu X, Zhu P. Overexpression of Pygo2 increases differentiation of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Curr Mol Med*. 2020; 20(4):318–24.
126. Tian D-Z, Deng D, Qiang J-L, Zhu Q, Li Q-C, Yi Z-G. Repair of spinal cord injury in rats by umbilical cord mesenchymal stem cells through P38MAPK signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(3 Suppl):47–53.
127. Zhu H, Xiong Y, Xia Y, Zhang R, Tian D, Wang T, Dai J, Wang L, Yao H, Jiang H, Yang K, Liu E, Shi Y, Zhou F, Gao L, Lin Z. Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in acute lung injury mice. *Sci Rep*. 2017;7: 39889–900.

128. Atluri S, Manchikanti L, Hirsch JA. Expanded umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) as a therapeutic strategy in managing critically ill COVID-19 patients: the case for compassionate use. *Pain Physician*. 2020; 23(2):E71–83.
129. Chen P, Zhang K-H, Na T, Lin W, Yin W-D, Yuan B-Z, Wang J-Z. The hUCMSCs cell line CCRC-1 represents a novel, safe and high-yielding HDCs for the production of human viral vaccines. *Sci Rep*. 2017;7(1):12484.
130. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):304-10.
131. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009; 4(4):e4992.
132. Dong L, Pu Y, Zhang L, Qi Q, Xu L, Li W, Wei C, Wang X, Zhou S, Zhu J, Wang X, Liu F, Chen X, Su C. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote lung adenocarcinoma growth by transferring miR-410. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 13;9(2):218
133. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2012 Oct 15; 21(R1):R125-34.
134. Bonomi A, Steimberg N, Benetti A, Berenzi A, Alessandri G, Pascucci L, Boniotti J, Coccè V, Sordi V, Pessina A, Mazzoleni G. Paclitaxel-releasing mesenchymal

stromal cells inhibit the growth of multiple myeloma cells in a dynamic 3D culture system. *Hematol Oncol.* 2017 Dec;35(4):693-702

135. Yan B, Chen Q, Shimada K, Tang M, Li H, Gurumurthy A, Khoury JD, Xu B, Huang S, Qiu Y. Histone deacetylase inhibitor targets CD123/CD47-positive cells and reverse chemoresistance phenotype in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2019 Apr;33(4):931-944.
136. Leng L, Wang Y, He N, Wang D, Zhao Q, Feng G, Su W, Xu Y, Han Z, Kong D, Cheng Z, Xiang R, Li Z. Molecular imaging for assessment of mesenchymal stem cells mediated breast cancer therapy. *Biomaterials.* 2014 Jun;35(19):5162-70.
137. Wu N, Zhang YL, Wang HT, Li DW, Dai HJ, Zhang QQ, Zhang J, Ma Y, Xia Q, Bian JM, Hang HL. Overexpression of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in human mesenchymal stem cells suppresses hepatocellular carcinoma development through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway downregulation. *Cancer Biol Ther.* 2016 May 3;17(5):558-65.