



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ»**



Διευθυντής Προγράμματος: Καθηγητής Δρακάκης Πέτρος

**«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ
ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ»**

Μεταπτυχιακή εργασία

Νικόλαος Αλεξίου



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ»

Διευθυντής Προγράμματος: Καθηγητής Δρακάκης Πέτρος

«ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

ΣΤΟ ΑΜΝΙΑΚΟ ΥΓΡΟ»

Μεταπτυχιακή εργασία

Νικόλαος Αλεξίου

Αφιέρωση

"Στη σύζυγο μου Ειρήνη και

στον γιο μας Κωνσταντίνο"

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

- Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Παθολογία της Κύησης», το οποίο διοργανώνεται από την Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικών». Με την ολοκλήρωση αυτής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην επιτυχή έκβαση αυτής της προσπάθειας.
- Ευχαριστώ θερμά τον κ. Δρακάκη Πέτρο, Καθηγητή Μαιευτικής- Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, Διευθυντή της Γ' Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών και Διευθυντή του ΠΜΣ «Παθολογία της Κύησης», όπως και τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, με επιβλέπων τον ομότιμο Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χρέλια Χαράλαμπο ,τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Βραχνή Νικόλαο και τον Καθηγητή κ. Σαλάκο Νικόλαο ,οι οποίοι μου έδωσαν τη δυνατότητα να συμμετάσχω και να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο Μεταπτυχιακό πρόγραμμα.
- Ευχαριστώ θερμά την κα Καραλέξη Μαρία ,ακαδημαϊκή υπότροφο Γ' Μαιευτικής & Γυναικολογικής Κλινικής, ΕΚΠΑ για την βοήθεια και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της συγγραφής και για την συμβολή του στην τελική επιμέλεια της εργασίας.
- Τέλος, ευχαριστώ όλους τους δικούς μου ανθρώπους, που με συμβούλευσαν και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
Εμβρυοπλακουντιακή μονάδα	12
Πλακούντας	12
<i>Ανατομία</i>	12
<i>Φυσιολογία</i>	13
Αμνιακός σάκος	15
Αμνιακό υγρό	17
Μεταβολομική ανάλυση αμνιακού υγρού	20
Μεταβολομική Ανάλυση Αμνιακού Υγρού στη Φυσιολογική Εγκυμοσύνη	21
Γλυκόζη	22
Λόγος γαλακτικού/πυροσταφυλικού οξέος (L/P)	23
Χολίνη	23
Κρεατινίνη	23
Ουρικό οξύ.....	24
Αλβουμίνη και ολικές πρωτεΐνες	24
Αλκαλική φωσφατάση.....	25
Χολερυθρίνη	25
Ουροκανικό οξύ	25
Φωσφολιπίδια αμνιακού υγρού και λόγος λεκιθίνης/σφιγγομυελίνης (L/S).....	25
Μεταβολομική Ανάλυση Αμνιακού Υγρού στον Αυθόρμητο Πρόωρο Τοκετό	32
Μεταβολίτες Ιστιδίνης.....	33
Αποτοξίνωση Ξενοβιοτικών Φάσης II	33
Μεταβολίτες Στεροειδών.....	34
Χολικά Οξέα	35
Μεταβολίτες Ξανθίνης	35
Μεταβολισμός λιπαρών οξέων	36
Τριγλυκερίδια και Ολική Χοληστερόλη.....	36

Λυσοφωσφολιπάση D	37
Ινοσιτόλη	37
Τρυπτοφάνη	37
Καθεψίνη-G	37
Πεντραξίνη 3 (PTX3), C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και Αμυλοειδές Ρ ορού (SAP).....	38
Πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας και γαλακτικό οξύ αμνιακού υγρού.....	40
Εγκεφαλικός Νευροτροφικός Παράγοντας (BDNF) στο Αμνιακό Υγρό.....	41
Το Μεταβολικό Προφίλ του Αμνιακού Υγρού στην Ανίχνευση Συγγενών Διαταραχών του Μεταβολισμού και Εμβρυϊκών Ανωμαλιών	42
Κατάσταση οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών παραγόντων στο αμνιακό υγρό εμβρύων με συγγενείς νευρολογικές ανωμαλίες	48
Η ειδική νευρωνική ενολάση στο αμνιακό υγρό ως πιθανός δείκτης εμβρυϊκού στρες και εγκεφαλικής βλάβης	50
Κορτικοεκλυστήνη και Ουροκορτίνη Αμνιακού Υγρού Δευτέρου Τριμήνου σε σχέση με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και το στρες κατά την εγκυμοσύνη.....	51
Μεταβολικό προφίλ αμνιακού υγρού, αίματος ομφάλιου λώρου και μητρικού αίματος σε φυσιολογική εγκυμοσύνη και στον διαβήτη της κύησης σε επαναλαμβανόμενες περιόδους νηστείας	55
Μεταβολομική ανάλυση αμνιακού υγρού σε έμβρυα με αυξημένη αυχενική διαφάνεια	57
Συμπεράσματα	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εγκυμοσύνη είναι μια κατάσταση πολλαπλών βιοχημικών μεταβολών στο πλαίσιο διαφόρων διαδικασιών προσαρμογής που εξελίσσονται κατά τη διάρκεια αυτής. Η μεταβολομική ανάλυση αποτελεί μια τεκμηριωμένη τεχνική για τη μελέτη σύνθετων βιολογικών δειγμάτων, όπως πλάσματος, ούρων ή αμνιακού υγρού. Μεγάλο πλεονέκτημα της προσέγγισης αυτής είναι ότι εξετάζονται ταυτόχρονα πολλοί βιοχημικοί δείκτες, υπό την προϋπόθεση ότι βρίσκονται σε επαρκώς υψηλή συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό, σκιαγραφώντας έτσι το μεταβολικό προφίλ του και συμβάλλοντας στη προγεννητική διάγνωση μεταβολικών διαταραχών του εμβρύου, ενδομήτριων λοιμώξεων, γενετικών διαταραχών, ελλειμμάτων του νευρικού σωλήνα, διαταραχών αιμοποίησης καθώς και στην αξιολόγηση της ωριμότητας του εμβρυϊκού πνεύμονα και την ανίχνευση πιθανής εμβρυϊκής δυσφορίας.

Σήμερα υπάρχει διαθέσιμη πλούσια βιβλιογραφία σχετικά με τη μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού τόσο στη φυσιολογική εγκυμοσύνη, όσο και σε ποικιλία παθολογικών καταστάσεων για το έμβρυο και την κύηση. Η ανάλυση σε φυσιολογικές κυήσεις έχει αναδείξει ενδεικτικά στο τρίτο τρίμηνο μικρή μείωση των επιπέδων γλυκόζης, αλβουμίνης και ολικών πρωτεϊνών και αύξηση των επιπέδων χολίνης και αλκαλικής φωσφατάσης λόγω των αυξημένων ρυθμών ανάπτυξης σε αυτό το στάδιο. Επιπλέον, την ίδια περίοδο διαπιστώνεται αύξηση των επιπέδων κρεατινίνης και ουρικού οξέος, ως δείκτες ωρίμανσης των εμβρυϊκών νεφρών. Παράλληλα, οι μετρήσεις της χολερυθρίνης μετά την 36^η εβδομάδα της κύησης είναι χρήσιμες για την ανίχνευση αιμόλυσης, όπως σε περίπτωση Rh ευαισθητοποίησης. Χρήσιμος είναι επίσης και ο λόγος λεκιθίνης/σφιγγομυελίνης (L/S) για την εκτίμηση της ωριμότητας του εμβρυϊκού πνεύμονα.

Παράλληλα, έχουν καταγραφεί ποικίλοι μεταβολικοί δείκτες στο αμνιακό υγρό που παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη διάγνωση παθολογικών καταστάσεων και την εκτίμηση της πιθανότητας ενός πρόωρου τοκετού, όπως τα υψηλά επίπεδα χολικών οξέων που έχουν συνδεθεί με εμβρυϊκό στρες, οι πολύ πρώιμες αυξήσεις στα επίπεδα τριγλυκεριδίων και ολικής χοληστερόλης που έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού, τα χαμηλά επίπεδα ινοσιτόλης που έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας των πρόωρων νεογνών, οι υψηλές συγκεντρώσεις καθεψίνης G και πεντραξίνης 3 που υποδηλώνουν ενδομήτρια φλεγμονώδη επιπλοκή, μικροβιακή ή μη, σε πρόωρη ρήξη υμένων και τα αυξημένα

επίπεδα γαλακτικού οξέος στο αμνιακό υγρό που έχουν συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα αποβολής.

Πολλές μελέτες χρησιμοποιώντας την μεταβολομική ανάλυση επικεντρώνονται στην αξιολόγηση μιας σειράς βιοδεικτών του αμνιακού υγρού, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της εμβρυϊκής ωρίμανσης, επιτρέποντας την καταγραφή των δυναμικών μεταβολών στον φαινότυπο και την ομοιοστασία των οργανικών συστημάτων του εμβρύου. Χαρακτηριστική περίπτωση μελέτης που βασίστηκε στη μεταβολομική ανάλυση ανέδειξε ότι η σοβαρά επηρεασμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη συνεπάγεται αυξημένη παραγωγή εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα, στα πλαίσια της προσαρμοστικού μηχανισμού, αντιδραστικού στο ακατάλληλο περιβάλλον του εσωτερικού της μήτρας, με σκοπό την επιτάχυνση της εμβρυϊκής εγκεφαλικής ανάπτυξης και ωρίμανσης.

Οι επηρεασμένοι μεταβολικοί δείκτες στο αμνιακό υγρό έχουν επίσης συσχετιστεί με την περίπτωση εμβρύων με σύνδρομο Down, όπου η μεταβολική εκτροπή έχει συνδυαστεί με την εκτροπή γονιδιακής έκφρασης στο χρωμόσωμα 21 των εμβρύων, ιδιαίτερα σε σχέση με την νοητική υστέρηση και την ανώμαλη ερυθροποίηση. Επομένως, οι μεταβολές στους μεταβολίτες του αμνιακού υγρού μπορεί να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της εμβρυϊκής νόσου πέραν αυτής της γονιδιωματικής, της επιγενωμικής και της πρωτεωμικής ανάλυσης. Σε πρόσφατη μελέτη επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη οξειδωτικού στρες στο αμνιακό υγρό εμβρύων με συγγενείς ανωμαλίες του νευρικού συστήματος, το οποίο αντανάκλαται από τη μειωμένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών της καταλάσης και γλουταθειονίνης σε έγκυες γυναίκες των οποίων τα έμβρυα είχαν συγγενείς ανωμαλίες του νευρικού συστήματος. Η μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού ανέδειξε ότι η κορτικοεκλυτίνη του αμνιακού υγρού φαίνεται να εμπλέκεται σε διαδικασίες ανάπτυξης του εμβρύου, ωστόσο το χρόνιο στρες της μητέρας μπορεί να επηρεάσει την έκκρισή της από τον εμβρυϊκό πλακούντα. Αντίστοιχα ανέδειξε ότι η παρατεταμένη νηστεία κατά το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης επίσης επηρεάζει τους μεταβολικούς δείκτες του αμνιακού υγρού, καθώς ανευρίσκονται αυξημένα τα επίπεδα γλυκερόλης, μη-εστεροποιημένων λιπαρών οξέων και β-υδροξυβουτυρικού οξέος στο πλάσμα.

Τέλος, ιδιαίτερα χρήσιμο εύρημα στη μελέτη των μεταβολικών δεικτών του αμνιακού υγρού ήταν ότι τα έμβρυα με αυξημένη αυχενική διαφάνεια παρουσίαζαν τροποποιημένες μεταβολικές οδούς με ενεργειακή «στροφή» προς την γλυκολυτική

οδό (μεταβολισμός αλανίνης, ασπαρτικού οξέος και γλουταμικού οξέος, μεταβολισμός αζωτούχων ενώσεων, αργινίνης και προλίνης, γλυκόλυση και γλυκονεογένεση και μεταβολισμός πυρουβικού οξέος) με παράλληλη μείωση σε αρκετά αντιοξειδωτικά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη, μείωση στα επίπεδα γλυκόζης και αύξηση στα επίπεδα γαλακτικού οξέος.

Μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για να καθορίσουν με ακρίβεια τη διαγνωστική και θεραπευτική συμβολή της μεταβολομικής ανάλυσης του αμνιακού υγρού σε προγεννητικό και περιγεννητικό επίπεδο στο πεδίο της Περιγεννητικής Ιατρικής.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εγκυμοσύνη είναι μια κατάσταση πολλαπλών βιοχημικών μεταβολών στο πλαίσιο ποικίλων διαδικασιών προσαρμογής που εξελίσσονται κατά τη διάρκεια αυτής. Το μητρικό αίμα βρίσκεται σε συνεχή ανταλλαγή συστατικών με το έμβρυο μέσω του πλακούντα, παρέχοντας έτσι τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ανάπτυξή του. Έτσι, το έμβρυο, ο πλακούντας και η μητέρα έχουν μια σχέση συνεχούς αλληλεξάρτησης, αποτελούν μια ενιαία λειτουργική μονάδα σε μια κοινή προσπάθεια σύνθεσης μιας ευρείας γκάμας βιοχημικών παραγόντων, γεγονός που οδήγησε στην έννοια της έμβρυο-πλακουντιακής-μητρικής μονάδας ή εν συντομία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας [1].

Καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης, το έμβρυο περιβάλλεται από το αμνιακό υγρό, που το προστατεύει από εξωτερικούς τραυματισμούς και το οποίο περιέχει νερό, οργανικά και ανόργανα συστατικά [2]. Τα συστατικά στοιχεία του αμνιακού υγρού έχουν μητρική, εμβρυϊκή και πλακουντιακή προέλευση, επομένως το μεταβολικό του προφίλ είναι αποτέλεσμα της σύνθεσης/αποδόμησης μεταβολιτών, της ωρίμανσης των οργανικών συστημάτων του εμβρύου, κυρίως των νεφρών και των πνευμόνων, καθώς και των βιοχημικών ανταλλαγών [3]. Επιπλέον, το αμνιακό υγρό περιέχει αρκετούς τροφικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη εμβρυϊκών αντισωμάτων, τα οποία συγκαταλέγονται στο εγγενές ανοσοποιητικό σύστημα που δρα ενάντια στα παθογόνα. Η ανάπτυξη του αμνιακού υγρού ξεκινά κατά την εμβρυογένεση. Κατά τους πρώτους μήνες της εμβρυϊκής ανάπτυξης, μεταξύ της 10ης και 20ής εβδομάδας κύησης, η ποσότητα του αμνιακού υγρού αυξάνεται από 25 ml σε 400 ml και φθάνει τα 800 ml στις 28 εβδομάδες κύησης, ενώ μειώνεται στα 400 ml στις 42 εβδομάδες κύησης. Λόγω της βιοχημικής του φύσης, το αμνιακό αποτελεί πλούσια πηγή βιοδεικτών που σχετίζονται με τις φυσιολογικές διαδικασίες της ανάπτυξης του εμβρύου, γεγονός που το καθιστά πολύτιμο εργαλείο στην σύγχρονη διαγνωστική της εμβρυϊκής παθολογίας [4].

Εμβρυοπλακουντιακή Μονάδα

Πλακούντας

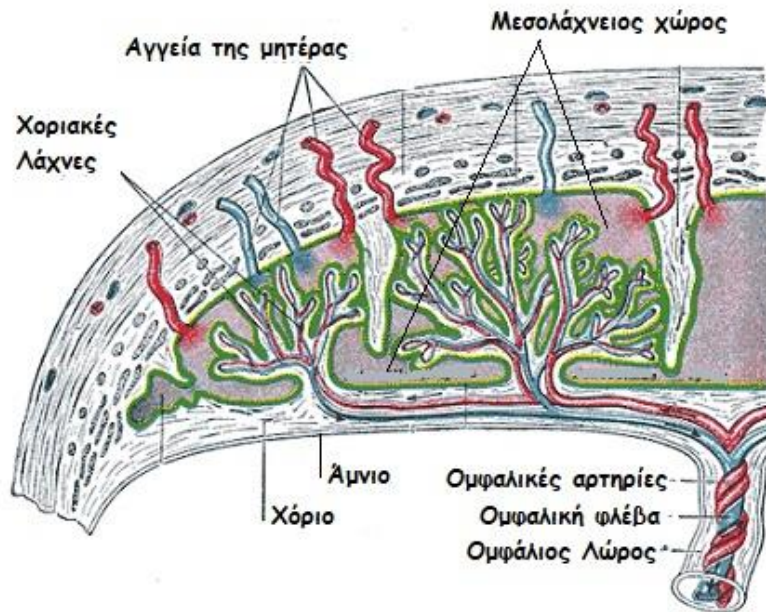
Η βιοχημική και φυσική συνεργασία μητέρας και εμβρύου στον σχηματισμό του πλακούντα είναι ένα από τα πιο οργανωμένα φαινόμενα στην ανάπτυξη του εμβρύου. Αντιπροσωπεύει την αλληλεπίδραση δύο οργανισμών για την ανάπτυξη μιας μεμονωμένης δομής που προστατεύει έναν εξ αυτών και επιτρέπει τα γονίδια του άλλου να επιβιώσουν και στην επόμενη γενιά. Ο πλακούντας εξυπηρετεί αυτούς τους σκοπούς μέχρι να επιτευχθεί επαρκής ωρίμανση του εμβρύου, ώστε να μπορεί να επιβιώσει στο εξωμήτριο περιβάλλον. Η ανάπτυξη του εμβρύου εξαρτάται από τη λειτουργική ικανότητα, τη θέση και την ακεραιότητα της προσκόλλησης του πλακούντα [5].

Ανατομία

Ο πλακούντας είναι ένα στρογγυλό ελλειψοειδές δισκόμορφο όργανο, το οποίο ξεκινά να αναπτύσσεται από την βλαστοκύστη μετά την εμφύτευση περί την 6η εβδομάδα της κύησης και ολοκληρώνεται περί την 12η-13η εβδομάδα κύησης. Στον άνθρωπο, ο πλακούντας έχει μέσο όρο μήκος 22 cm και πάχος 2-2,5 cm, με το κέντρο να είναι το πιο παχύ και οι άκρες να είναι λεπτότερες. Ζυγίζει συνήθως περίπου 500 gr. Έχει σκούρο κοκκινωπό μπλε ή πορφυρό χρώμα. Συνδέεται με το έμβρυο μέσω ομφάλιου λώρου μήκους περίπου 55-60 cm, το οποίο περιέχει δύο ομφάλιες αρτηρίες και μία ομφάλια φλέβα [6]. Η μητρική επιφάνεια του πλακούντα ενδείκνυται να έχει σκούρο καφέ χρώμα και να χωρίζεται σε λοβούς ή κοτυληδόνες. Η δομή θα πρέπει να φαίνεται πλήρης, χωρίς λείπουν κοτυληδόνες. Η εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα πρέπει να είναι γυαλιστερή, φαιοχρωματική και αρκετά ημιδιαφανής ώστε να διακρίνεται το χρώμα των υποκείμενων χοριακών λαχνών (βλ. Εικόνα 1).

Η βασική δομική μονάδα του είναι η χοριακή λάχνη. Πρόκειται για προσεκβολές του εμβρυϊκού ιστού με αγγείωση που περιβάλλονται από το χόριο. Το χόριο αποτελείται από δύο στιβάδες, τη συγκυτιοτροφοβλάστη, που βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα στο μεσολάχνιο χώρο και την κυτταροτροφοβλάστη. Έτσι, παράγοντες που μεταφέρονται από τη μητέρα στο κύημα είναι υποχρεωμένοι να διέλθουν από: α) τις δύο στιβάδες της τροφοβλάστης, β) τον εμβρυϊκό συνδετικό ιστό και γ) το τοίχωμα του ενδοθηλιακού κυττάρου του εμβρυϊκού τριχοειδούς [7].

Ο πλακούντας



Προσαρμογή από την εικόνα:
Mikael Häggström / Public domain

Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της ανατομικής δομής του πλακούντα

Φυσιολογία

Ο πλακούντας παίζει ζωτικό ρόλο στη φυσιολογία της μητέρας-εμβρύου και έχει συνδεθεί με πολλαπλούς ρόλους απαραίτητους για την φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου [8]:

Εμφύτευση: Η συγκυτταροτροφοβλάστη, η οποία αναπτύσσεται αργότερα ως μέρος του πλακούντα, διευκολύνει την εμφύτευση με την απευθείας διείσδυση στο τοίχωμα του ενδομητρίου.

Παραγωγή και διάχυση ουσιών: Ο ρόλος του πλακούντα στη παραγωγή ορμονών, ενζύμων και ρυθμιστικών πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Οι ουσίες αυτές επιτρέπουν στον πλακούντα να ελέγχει το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται το κύημα. Ένα εξαιρετικά σύνθετο σύστημα πλακουντιακών ενζύμων αναλαμβάνει τη μετατροπή πρόδρομων στεροειδών ουσιών σε οιστρογόνα. Το σύστημα αυτό μετά την έβδομη εβδομάδα κύησης διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στη παραγωγή

οιστρογόνων και προγεστερόνης, ρόλο που μέχρι τότε έπαιζαν οι ωοθήκες. Επίσης, παράγει ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη που εξασφαλίζει στο κύημα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή του. Επιπλέον, σε μεγάλες ποσότητες παράγει ένζυμα, όπως η αδενυλκυκλάση, η αλκαλική φωσφατάση, η ψευδοχολινεστεράση κ.ά. Η ύπαρξη αυτών των ενζύμων τροποποιεί σημαντικά τη μεταφορά μορίων διαμέσου του πλακούντα. Για παράδειγμα, η ύπαρξη μονοαμινοξειδάσης εμποδίζει τη μεταφορά των κατεχολαμινών της μητέρας στην εμβρυική κυκλοφορία [7].

Οι μηχανισμοί μεταφοράς μορίων διαμέσου του πλακούντα είναι:

1. Απλή διάχυση (φάρμακα, οξυγόνο, ιόντα κ.ά.)
2. Υποβοηθούμενη διάχυση (γλυκόζη, γαλακτικό οξύ κ.ά.)
3. Ενεργητική μεταφορά (μέταλλα, βιταμίνες, αμινοξέα κ.ά.).

Μητρική αναγνώριση της εγκυμοσύνης: Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) συντίθεται και απελευθερώνεται από τον συγκυτιοτροφοβλάστη προκειμένου να διεγείρει την παραγωγή ωχρινικής προγεστερόνης για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Χωρίς παραγωγή hCG, η απουσία προγεστερόνης θα προκαλούσε έμμηνο ρύση και, ως εκ τούτου, την απόπτωση του ενδομήτριου με το εμφυτευμένο έμβρυο [9].

Ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και αερίων: Οι χοριακές λάχνες είναι η λειτουργική μονάδα στην οποία πραγματοποιείται ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και αερίων μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Το αίμα της μητέρας παρέχει οξυγόνο, νερό με ηλεκτρολύτες, ορμόνες και άλλα θρεπτικά συστατικά. Σε αντάλλαγμα, το έμβρυο αποβάλλει διοξείδιο του άνθρακα, νερό, ουρία, ορμόνες και άλλα απορρίμματα. Η κυκλοφορία της μητέρας και του εμβρύου δεν αναμειγνύονται. Αντί αυτού, η ροή του αίματος ρυθμίζει την παθητική ή ενεργητική μεταφορά θρεπτικών ουσιών και αερίων μεταξύ των αγγειακών δικτύων μητέρας και εμβρύου.

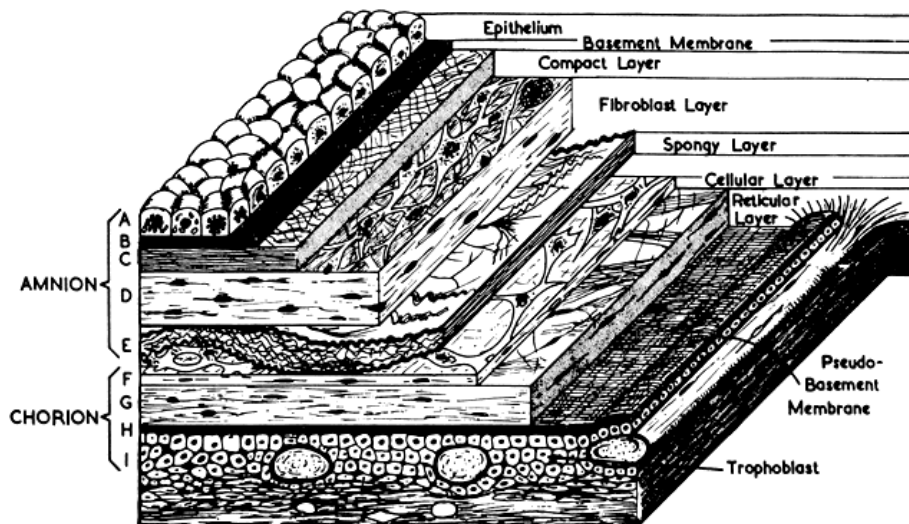
Ο πλακούντας λειτουργεί επίσης ως φραγμός μεταξύ μητέρας και κύματος που επιτρέπει σε δύο διαφορετικούς οργανισμούς με διαφορετικό χρωματοσωματικό υλικό να συνυπάρχουν για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς ο ένας να απορρίπτει η να βλάπτει τον άλλον. Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο φραγμός αυτός είναι περισσότερο ατελής απ' ό,τι νομίζαμε στο παρελθόν. Μεγαλομοριακές ενώσεις και ολόκληρα ερυθρά αιμοσφαίρια συχνά περνούν τον πλακούντα, χωρίς αυτό να οδηγεί υποχρεωτικά σε κάποια παθολογική κατάσταση [7].

Προστασία του εμβρύου από οποιαδήποτε ανοσολογική επίθεση: Ο πλακούντας έχει την ικανότητα να μεταβολίζει πολλές ουσίες και να προστατεύει από μικροβιακές λοιμώξεις. Τα μακροφάγα στο στρώμα των χοριακών λαχνών και της συγκυτιοτροφοβλάστης παίζουν κρίσιμο ρόλο στην προστασία του εμβρύου. Επιπλέον, πολλά λευκοκύτταρα βρίσκονται στον φθαρτό του ενδομήτριου για να υποστηρίξουν την επιτυχή έκβαση της εγκυμοσύνης [10].

Προετοιμασία περιβάλλοντος: Πολλές ορμόνες απελευθερώνονται από τον πλακούντα για τη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας απελευθερώνεται από τον πλακούντα για να προετοιμάσει το σώμα της μητέρας για εγκυμοσύνη, όσον αφορά την καρδιαγγειακή προσαρμογή. Επιπλέον, ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας προάγει την ανάπτυξη και την ωριμότητα του εμβρύου. Η ανθρώπινη χοριακή σωματοτροπίνη (HCS), είναι επίσης γνωστή ως ανθρώπινο πλακουντιακό γαλακτογόνο (HPL), καθώς προάγει την ανάπτυξη του μαστού και τροποποιεί το μεταβολισμό της μητέρας. Μειώνει την ευαισθησία της μητρικής ινσουλίνης, ώστε να υπάρχει περισσότερη γλυκόζη για το έμβρυο [11].

Αμνιακός σάκος

Ο αμνιακός σάκος ή «εμβρυϊκός σάκος» είναι ο υδατοστεγής μεμβρανώδης ημιδιαφανής σάκος στην κοιλότητα του οποίου, πληρούμενη από το λεγόμενο αμνιακό υγρό, αναπτύσσεται το έμβρυο. Ανατομικά ο αμνιακός σάκος συνίσταται σε δύο επάλληλες μεμβράνες, την εσωτερική που καλείται άμνιο και την εξωτερική που καλείται χόριο. Η εσωτερική (άμνιο) περιβάλλει την αμνιακή κοιλότητα που περιέχει το «αμνιακό υγρό» και το εντός αυτού αναπτυσσόμενο έμβρυο. Η εξωτερική μεμβράνη (χόριο) περιβάλλει το άμνιο και τον αλλαντοειδή υμένα αποτελώντας μέρος του πλακούντα με τον οποίο συνδέεται μέσω του ομφάλιου λώρου. Ιστολογικά και οι δύο επάλληλες μεμβράνες αποτελούνται από πεπλατυσμένα κύτταρα που δημιουργούνται από τους αμνιοβλάστες και τους χοριοβλάστες, αντίστοιχα [12] (βλ. Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Διάγραμμα στρωμάτων αμνίου και χορίου

Το **χόριο**, αντίστοιχα με τη θέση του πλακούντα, σχηματίζει το χοριακό πέταλο, απ' όπου προσεκβάλλουν προς το φθαρτό οι χοριακές λάχνες. Το άλαχνο χόριο αποτελείται από τέσσερις στιβάδες:

- (α) Την κυτταρική στιβάδα από ινοβλάστες
- (β) Την δικτυωτή στιβάδα, η οποία αποτελείται από ινοβλάστες και κύτταρα του Hofbauer που βρίσκονται μέσα σε δικτυωτό σχηματισμό,
- (γ) Την ψευδοβασική μεμβράνη και
- (δ) Την τροφοβλαστική στιβάδα, η οποία αποτελείται από τροφοβλαστικά κύτταρα διατεταγμένα σε 2-10 στοίχους [7].

Το **άμνιο** προέρχεται από το πρωτογενές μεσόδερμα και αρχικά καλύπτει τη ραχιαία επιφάνεια του εμβρύου. Στη συνέχεια, παρακολουθεί τη κοιλιακή κάμψη του εμβρύου, του οποίου καλύπτει όλη την εξωτερική επιφάνεια, μέχρι την είσοδο του ομφάλιου λώρου στο σώμα του. Ύστερα από τη κάλυψη του ομφάλιου λώρου, καλύπτει την εμβρυακή επιφάνεια του πλακούντα, απ' όπου στη συνέχεια μεταβαίνει στον εμβρυικό σάκο, του οποίου σχηματίζει το εμβρυακό πέταλο. Σε όλη του την έκταση το άμνιο συνάπτεται χαλαρά με το χόριο [13]. Το άμνιο αποτελείται από πέντε στιβάδες, οι οποίες από μέσα προς τα έξω είναι:

1. Επιθηλιακή στιβάδα - εκκρίνει κολλαγόνο τύπου III και VI
2. Βασική μεμβράνη – διαχωρίζει την επιθηλιακή από τη συμπαγή στιβάδα
3. Συμπαγής στιβάδα – σχηματίζει τον ινώδη σκελετό του αμνίου και αποτελείται από κολλαγόνο

4. Ινοβλαστική στιβάδα- αποτελεί την παχύτερη αμνιακή στιβάδα και αποτελείται από:

- Μεσεγγυματικά κύτταρα .Από τα μεσεγγυματικά κύτταρα της στιβάδας αυτής εκκρίνεται το κολλαγόνο, το οποίο είναι το βασικό στοιχείο της συμπαγούς στιβάδας
- Μακροφάγα
- Μεσοκυττάρια ουσία
- Κολλαγόνο [διάμεσο συνδετικό κολλαγόνο (τύπου I και III) και νηματοειδές κολλαγόνο (τύπου V και VI)]
- Μη κολλαγονούχες γλυκοπρωτεΐνες

5. Σπογγώδης στιβάδα. Απορροφά τους κραδασμούς με το να επιτρέπει στο άμνιο να ολισθαίνει πάνω στο χόριο [7].

Το άμνιο δεν έχει δική του αγγείωση και νεύρωση, αν και ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν αντίθετες απόψεις. Τα αγγεία και τα νεύρα του χορίου είναι κατά κύριο λόγο εκείνα που το διαπερνούν, προκειμένου να αγγειώσουν τις χοριακές λάχνες του πλακούντα.

Το άμνιο με το χόριο ορίζουν την αμνιακή κοιλότητα, μέσα στην οποία βρίσκονται το έμβρυο, ο ομφάλιος λώρος και το αμνιακό υγρό. Ο αμνιακός σάκος με την παρουσία του αμνιακού υγρού, υπό μορφή ηχομονωτικού μέσου, επιτρέπει μηχανικά, την ασφαλή «αιώρηση» και ελευθερία κινήσεων στο έμβρυο καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μέχρι και τα τελευταίων στάδια αυτής, με ταυτόχρονη μείωση του κινδύνου τραύματος, ένεκα κραδασμού, από τα τοιχώματα της μήτρας, μέσα στην οποία αναπτύσσεται [12]. Παράλληλα, ο αμνιακός σάκος δια του αμνιακού υγρού παρέχει επίσης σπουδαίες ανοσολογικές και βιοχημικές λειτουργίες.

Αμνιακό υγρό

Το αμνιακό υγρό περιβάλλει το έμβρυο κατά την ανάπτυξη και χαρακτηρίζεται από ποικίλες λειτουργίες. Σωματικά, προστατεύει το έμβρυο σε περίπτωση τραυματισμού ή κτυπήματος στην κοιλιά της μητέρας. Επιπλέον, προστατεύει τον ομφάλιο λώρο διαμορφώνοντας ένα «μαξιλάρι ασφαλείας» μεταξύ του εμβρύου και του ομφάλιου λώρου, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος συμπίεσης αυτού μεταξύ του εμβρύου και του τοιχώματος της μήτρας [14]. Το αμνιακό υγρό βοηθά επίσης στην προστασία του εμβρύου από μολυσματικούς παράγοντες, λόγω των εγγενών αντι-βακτηριακών ιδιοτήτων του. Επιπλέον, χρησιμεύει ως δεξαμενή υγρών και θρεπτικών ουσιών για

το έμβρυο, καθώς περιέχει πρωτεΐνες, ηλεκτρολύτες, ανοσοσφαιρίνες και βιταμίνες από τη μητέρα. Παρέχει τους απαραίτητους παράγοντες υγρού, χώρου και ανάπτυξης για να επιτρέψει τη φυσιολογική εμβρυϊκών οργάνων όπως το μυοσκελετικό σύστημα, το γαστρεντερικό σύστημα και το πνευμονικό σύστημα.

Η παραγωγή του αμνιακού υγρού μπορεί να ταξινομηθεί σε εκείνη των πρώτων εβδομάδων κύησης, που περιλαμβάνει την πρώιμη εμβρυϊκή περίοδο, δηλαδή την περίοδο από την αρχή της γονιμοποίησης έως τις 8 εβδομάδες κύησης και σε εκείνη της όψιμης φάσης που περιλαμβάνει την εμβρυϊκή περίοδο από τις 8 εβδομάδες κύησης έως τη γέννηση. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής περιόδου, το αμνιακό υγρό προέρχεται τόσο από εμβρυϊκούς όσο και από μητρικούς παράγοντες όπως νερό από τον μητρικό ορό, σπλαχνικά υγρά και υγρά από την αμνιακή κοιλότητα. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της όψιμης φάσης της κύησης, το αμνιακό υγρό παράγεται σε μεγάλο βαθμό από εκκρίσεις των νεφρών και των πνευμόνων του εμβρύου [15].

Το αμνιακό υγρό (ΑΥ) πρωτοεμφανίζεται μετά τη σύγκληση της αμνιακής κοιλότητας, που συμβαίνει μεταξύ της 3ης και 4ης εβδομάδας κύησης. Στην αρχή είναι άχρωμο και διαυγές, αλλά με την πρόοδο της ηλικίας της κύησης γίνεται θολερό, λόγω της παρουσίας χνουδιού. Ποσοτικά, εκτιμάται περίπου στα 5-10 ml, ενώ από την 11η έως τη 15η εβδομάδα αυξάνεται κατά 25 ml κάθε εβδομάδα. Από την 16η έως την 28η εβδομάδα, ο ρυθμός αύξησής του είναι ταχύτερος και φτάνει τα 50 ml την εβδομάδα. Η μεγαλύτερη ποσότητά του (1000ml) παρατηρείται στην 38η εβδομάδα, απ' όπου αρχίζει να ελαττώνεται, ώστε την 40ή να εκτιμάται περίπου στα 800 ml. Σήμερα η πιο αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού του όγκου του αμνιακού υγρού είναι η υπερηχογραφική.

Όπως προαναφέρθηκε, η παραγωγή του αμνιακού υγρού στην όψιμη φάση της κύησης γίνεται κατά κύριο λόγο, από τους νεφρούς του εμβρύου που απεκκρίνουν 500 ml ούρα ανά 24ωρο μέσα στην αμνιακή κοιλότητα. Άλλες πηγές παραγωγής του ΑΥ είναι το αναπνευστικό σύστημα, το δέρμα (μέχρι την 20ή – 28η εβδομάδα, οπότε γίνεται κερατινοποίηση των επιφανειακών του στιβάδων), τα αγγεία του ομφάλιου λώρου, το γαστρεντερικό σύστημα και τα κύτταρα του αμνίου. Η κυκλοφορία του ΑΥ είναι πολύ έντονη και φαίνεται ότι αντικαθίσταται ολόκληρη η ποσότητά του κάθε 2,9 ώρες, μετά την 20ή εβδομάδα της κύησης, οπότε διακινούνται περίπου 468 ml κάθε ώρα, από το ΑΥ στη μητρική κυκλοφορία. Φαίνεται πως στη διακίνηση αυτή του ΑΥ συμμετέχει ενεργά το αμνιακό επιθήλιο και κατά κύριο λόγο εκείνο που

αντιστοιχεί στη θέση του πλακούντα. Πράγματι η βαθύτερη κυτταρική στιβάδα του αμνίου περιλαμβάνει κύτταρα με μικροθηλώδη επιφάνεια, που έχουν εκκριτικά δομικά χαρακτηριστικά, όπως ενδοκυττάρια και μεσοκυττάρια αύλακες ικανές για τη διακίνηση του αμνιακού υγρού. Άλλοι τρόποι μηχανικής διακίνησης του αμνιακού υγρού είναι διαμέσου του δέρματος του εμβρύου, καθώς και μέσω του ουροποιητικού, αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος [16].

Το αμνιακό υγρό αποτελείται κατά 98% από νερό και ηλεκτρολύτες ενώ τα μόρια σηματοδότησης, τα πεπτίδια, οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια και οι ορμόνες αποτελούν το υπόλοιπο 2% [14]. Το pH και το ειδικό βάρος του ΑΥ κυμαίνονται από 7,0-7,5 και 1000-1081, αντίστοιχα. Το ιζώδες του ισούται με τη μονάδα και η οσμωτική του πίεση στο δεύτερο μισό της κύησης είναι μικρότερη από 245 mOsm/l. Η σύνθεση του ΑΥ παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί [7].

Πίνακας 1 – Σύνθεση αμνιακού υγρού			
Νερό 98-99%			
Στερεά συστατικά 1-2%			
Οργανικές ουσίες		Ενζυμα	Ανόργανες ουσίες
Λευκώματα 260 mg/dL	Ορμόνες	Λυσοζύμη	Νάτριο 130-138 MEq/L
Αμινοξέα 9,25 mg/dL	Χοριακή γοναδοτροπίνη 1000-6000 IU/L	cAMP	Μαγγάνιο 0,64 mg/dL
Ουρία 31 mg/dL	Οιστριόλη 18 135 mg/dL	Τρανσαμινάση	Μαγνήσιο 1-2 mg/dL
Κρεατινίνη 2 mg/dL	17- κετοστεροειδή 3,4 mg/dL	Λιπάση	Θείο 3,7mg/dL
Ολικά λίπη 60 mg/dL	Οιστρονή 4-8 mg/dL	Αμινοτριπεπιδάση	Ασβέστιο 3,2-9 mg/dL
Ουρικό Οξύ 4,5 mg/dL	Πρεγνανδιόλη 40 μg/dL	Φωσφατάση	Φώσφορος 1,1,54 mg/dL
Γλυκόζη 10-61 mg/dL	Οιστραδιόλη 3-4 3-4 mg/dL	Αλκαλική φωσφατάση	Σίδηρος 3,3-10mg/dL
Χοληστερίνη 2-9,6 mg/dL		Χολινεστεράση	Χλωριούχο 100,7 mEq/L
Βιταμίνες (A,B,C)	Πλακουντιακό γαλακτογόνο	Ισταμινάση	Ψευδάργυρος 1,1-5,4 mg/dL
Προσταγλανδίνες (E,E2, FLA, F2A)	Ινσουλίνη	Αμυλάση	Κάλιο 4 mEq/L
Χολερυθρίνη έως 1 mg/dL	17-υδροξυκορτιζόνη 2,6 mg/dL	Ωκυτοκινάση	
Φωσφολιποειδή 3-4,5 mg/dL	Πρεγναντριόλη 2,3-4,6 mg/dL		
	17-OH-κορτικοειδή 6,6-4,6 mg/dL		
	Γαλακτικό οξύ 60-80 mg/dL		
	Κορτιζόνη 1,3 mg/dL		

Μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού

Η μεταβολομική ανάλυση αποτελεί μια τεκμηριωμένη τεχνική για τη μελέτη σύνθετων βιολογικών δειγμάτων, όπως το πλάσμα, τα ούρα ή το αμνιακό υγρό [17] [18]. Αντικείμενο μελέτης είναι όλοι οι μεταβολίτες που αποτελούν μοναδική σφραγίδα για τις χημικές αντιδράσεις σε ένα οργανικό σύστημα, οι οποίοι μπορούν να μετρηθούν στα βιολογικά δείγματα [19]. Η φυσιολογία ή η παθολογία των ιστών του ενδομήτριου αντανακλάται τις περισσότερες φορές καλύτερα στο βιοχημικό προφίλ των μεταβολικών δεικτών, παρά στο μεταγράφημα (αγγελιοφόρο RNA) ή στο πρωτεΐνωμα, καθώς το μεταβολικό προφίλ αποτελεί τη γέφυρα ανάμεσα στο γονιδίωμα και τον φαινότυπο [20], [21].

Οι μελέτες, χρησιμοποιώντας την μεταβολομική ανάλυση, επικεντρώνονται τα τελευταία χρόνια στην αξιολόγηση μιας σειράς βιοδεικτών του αμνιακού υγρού, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της εμβρυϊκής ωρίμανσης, επιτρέποντας την καταγραφή των δυναμικών μεταβολών στον φαινότυπο και την ομοιοστασία των οργανικών συστημάτων του εμβρύου [22]. Μεγάλο πλεονέκτημα της προσέγγισης αυτής είναι ότι εξετάζονται ταυτόχρονα πολλοί βιοχημικοί δείκτες, υπό την προϋπόθεση ότι βρίσκονται σε επαρκώς υψηλή συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό, σκιαγραφώντας έτσι το μεταβολικό προφίλ του, το οποίο παρέχει περισσότερες πληροφορίες σε σύγκριση με τη μέτρηση ενός μεμονωμένου μεταβολίτη/βιοδείκτη. Παρότι πολλά υποσχόμενη, η μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού σε προγεννητικό και περιγεννητικό επίπεδο και η αξιοποίηση των πληροφοριών που παρέχει βρίσκονται ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο. [18]

Συνοπτικά, οι ενδείξεις της μεταβολομικής ανάλυσης θα μπορούσαν να συνοψιστούν στα ακόλουθα [23]:

- Συμβάλλει στη προγεννητική διάγνωση μεταβολικών διαταραχών του εμβρύου, όπως η κυστική ίνωση ή διαταραχών στο μεταβολισμό των λιπιδίων, των υδατανθράκων ή των αμινοξέων.
- Συμβάλλει στην αξιολόγηση της ωριμότητας του πνεύμονα του εμβρύου όταν επαπειλείται πρόωρος τοκετός.
- Ανιχνεύει πιθανές ενδομητριακές λοιμώξεις..
- Συμβάλλει στον εντοπισμό τυχόν ελαττωμάτων του κοιλιακού τοιχώματος του εμβρύου.

- Βοηθά στον εντοπισμό του βέλτιστου χρόνου για μαιευτική παρέμβαση σε περιπτώσεις απειλούμενης επιβίωσης του εμβρύου λόγω στρες που σχετίζεται με τον μητρικό διαβήτη, την τοξιναιμία της κύησης, αιμολυτικές ασθένειες του νεογέννητου ή μετά τον τοκετό.
- Προσδιορισμός του φύλου του εμβρύου όταν η μητέρα είναι γνωστός φορέας ενός παθολογικού γονιδίου που σχετίζεται με το φύλο και θα μπορούσε να μεταδοθεί σε άρρενες απογόνους, όπως η αιμορροφιλία ή η μυϊκή δυστροφία Duchenne.
- Ανίχνευση πιθανής εμβρυϊκής δυσφορίας σε τελειόμηνη κύηση.
- Αξιολόγηση του εμβρύου σε οικογένειες με ιστορικό γενετικών διαταραχών, όπως το σύνδρομο Down, η νόσος Tay-Sachs, διάφορες χρωμοσωμικές ή ενζυμικές ανωμαλίες ή κληρονομικές αιμοσφαιρινοπάθειες.
- Αξιολόγηση του εμβρύου σε μητέρες προχωρημένης ηλικίας (μερικές από τις προαναφερθείσες εξετάσεις ζητούνται συνήθως σε μητέρες ηλικίας 35 ετών και άνω).
- Αξιολόγηση του εμβρύου σε μητέρες με ιστορικό αποβολής ή θνησιγένειας.
- Αξιολόγηση γνωστής ή ύποπτης αιμολυτικής νόσου που εμπλέκει το έμβρυο σε μια εγκυμοσύνη ευαισθητοποιημένη σε Rh, όπως αυτό υποδηλώνεται από την αύξηση των επιπέδων χολερυθρίνης, ειδικά μετά την 30ή εβδομάδα κύησης.
- Αξιολόγηση ύποπτων ελλειμμάτων του νευρικού σωλήνα, όπως η δισχιδής ράχη ή μυελομηνιγγοκήλη, όπως υποδηλώνεται από την αυξημένη α1-φετοπρωτεΐνη.
- Προσδιορισμός των εμβρύων με κίνδυνο ανάπτυξης αναπνευστικής δυσχέρειας νεογνού (RDS).
- Πρώιμη διάγνωση της πλακουντιακής ανεπάρκειας.
- Πρώιμη διάγνωση της πρώιμης ρήξης των υμένων του εμβρύου.

Μεταβολομική Ανάλυση Αμνιακού Υγρού στη Φυσιολογική Εγκυμοσύνη

Μια από τις πρώτες μελέτες που αξιοποίησε τη μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού, αλλά και του μητρικού πλάσματος, κατά την εξέλιξη της φυσιολογικής εγκυμοσύνης διεξήχθη το 2013 από τους Orczyk - Pawilowicz et al. [3], καταγράφοντας της μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό τόσο της μητέρας, όσο και του εμβρύου. Η μεταβολική ανάλυση κατέγραψε τη μεγάλη αφθονία των ακόλουθων μεταβολιτών: τα αμινοξέα (λευκίνη, ισολευκίνη, βαλίνη, αλανίνη, θρεονίνη, λυσίνη, γλουταμινικό οξύ, προλίνη, γλουταμίνη και μεθειονίνη) και τα οργανικά οξέα (2-υδροξυβουτυρικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, σουκινικό οξύ, ακετοοξικό οξύ και κιτρικό οξύ). Το

υδατανθρακικό προφίλ του αμνιακού υγρού αποτελείται κατά κύριο λόγο από γλυκόζη με μια μικρότερη συμπληρωματική περιεκτικότητα σε μαννόζη.

Η Βάση Δεδομένων του Ανθρώπινου Μεταβολώματος [24] περιλαμβάνει τους κύριους βιοδείκτες του φυσιολογικού αμνιακού υγρού, που είναι οι εξής: πιπεκολικό οξύ, γαλακτιτόλη, νερό, εστριόλη, εστριολ-3-γλυκουρονίδιο, ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ, 1-μεθυλουρικό οξύ, θυμιδίνη, οροτικό οξύ, κρεατινίνη, ουρακίλη, ψευδο-ουριδίνη, υποξανθίνη, χολίνη, δεοξυ-κορτικοστερόνη και ένα τροποποιημένο παράγωγο της γουανίνης (queuine). Άλλοι μεταβολικοί δείκτες σε μεγάλη αφθονία στο αμνιακό υγρό περιλαμβάνουν τα αρωματικά αμινοξέα τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη και τα οργανικά οξέα φουμαρικό οξύ, μεθανικό οξύ και ουροκανικό οξύ [3].

Η μελέτη των Orczyk - Pawilowicz et al. με παράλληλη συγκριτική ανάλυση των επιπέδων διαφόρων μεταβολικών δεικτών στο αμνιακό υγρό και στο μητρικό πλάσμα ανέδειξε την παρουσία μιας μετάβασης σε μεταβολικό επίπεδο, του «μεταβολικού διακόπτη», μεταξύ δευτέρου και τρίτου τριμήνου της κύησης, με απότομη αύξηση του ρυθμού εμβρυϊκής ανάπτυξης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη εμβρυϊκή κατανάλωση γλυκόζης και οξυγόνου, καθώς και αυξημένο ρυθμό εγκεφαλικής ανάπτυξης και νεφρικής ωρίμανσης.

Γλυκόζη

Τα επίπεδα γλυκόζης στο αμνιακό υγρό είναι ο πρώτος και κυριότερος δείκτης της ύπαρξης του «μεταβολικού διακόπτη» μεταξύ δευτέρου και τρίτου τριμήνου της κύησης, όπου μια σταθερά αναβολική φάση μεταπίπτει σε μια έντονα καταβολική φάση για τον οργανισμό της μητέρας, η οποία συνδυάζεται με έντονα αναβολική φάση για τον οργανισμό του εμβρύου στο τρίτο τρίμηνο [3]. Είναι γνωστό ότι τα επεισόδια υπογλυκαιμίας της μητέρας εμφανίζονται εντονότερα κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης, παρά το γεγονός ότι αυξάνονται τα επίπεδα γλυκονεογένεσης [25]. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από το έμβρυο μέσω του πλακούντα. Για τον λόγο αυτό, η μικρή μείωση των επιπέδων γλυκόζης κατά το τρίτο τρίμηνο μπορεί να αποδοθεί στην εξάντληση των αποθεμάτων γλυκογόνου στον οργανισμό της μητέρας, χωρίς να αποκλείεται και ο ρόλος της διατροφής σε αυτή τη μείωση.

Λόγος γαλακτικού/πυροσταφυλικού οξέος (L/P)

Ένας ακόμα δείκτης της έντονα αναβολικής φάσης για το έμβρυο στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης είναι ο λόγος γαλακτικού οξέος/πυροσταφυλικού οξέος (L/P). Πιο συγκεκριμένα, ο λόγος L/P αντανακλά το κυτταροπλασματικό οξειδο-αναγωγικό δυναμικό των εμβρυϊκών κυττάρων (της αντίστοιχα ο λόγος υδροξυ-βουτυρικού οξέος/οξυοξικού οξέος (3-HB/AcAc) αντανακλά το οξειδο-αναγωγικό δυναμικό των εμβρυϊκών μιτοχονδρίων). Έχει παρατηρηθεί μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ του λόγου γαλακτικού οξέος/πυροσταφυλικού οξέος και της κατανάλωσης οξυγόνου [26]. Ο λόγος L/P παρατηρείται μειωμένος στο αμνιακό υγρό μεταξύ δευτέρου και τρίτου τριμήνου της κύησης και οφείλεται σε αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου από το έμβρυο, ένα γεγονός το οποίο αποτελεί δείκτη αυξημένου αερόβιου μεταβολισμού του εμβρύου [3].

Χολίνη

Τα αυξημένα επίπεδα χολίνης του αμνιακού υγρού στα όψιμα στάδια της εγκυμοσύνης ενδεχομένως να σχετίζονται με της υψηλές απαιτήσεις σε φωσφολιπίδια για την ανάπτυξη του εμβρυϊκού εγκεφάλου [27]. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από αυξημένα επίπεδα της ενδιάμεσου μεταβολίτη της σύνθεσης της γλυκίνης από χολίνη, της N,N-διμεθυλγλυκίνης.

Κρεατινίνη

Η κρεατινίνη, η οποία αποτελεί δείκτη της λειτουργίας και της ωριμότητας των εμβρυϊκών νεφρών [28], αυξάνεται σημαντικά κατά το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης στο αμνιακό υγρό και εν συνεχεία παραμένει σταθερή, δεδομένου ότι οι νεφροί έχουν ολοκληρώσει την ωρίμανσή τους. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί αύξηση από 0,8 mg% στα 1,2 mg% μεταξύ της 20ής και 34ης εβδομάδας και ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης στη συνέχεια [29]. Συγκεντρώσεις κατά προσέγγιση στα 2 mg% αποτέλεσαν μια αξιόπιστη οριακή τιμή, όπως έχει διαπιστωθεί στο 97% των περιπτώσεων μετά τις 37 εβδομάδες κύησης. Οι Begneaudetal [30] διαπίστωσαν ότι τιμές μικρότερες από 1,5 mg υποδηλώνουν ένα ανώριμο έμβρυο, ενώ κάποιοι συγγραφείς υποστήριξαν ότι τιμές από 3 mg% και άνω υποδηλώνουν ένα υπερ-ώριμο έμβρυο, με ένδειξη για πρόκληση τοκετού σε τιμές από 3,5 έως 4 mg%, κάτι που

αμφισβητήθηκε στη συνέχεια, καθώς δεν φαίνεται να υπάρχει προοδευτική αύξηση μετά τις 37 εβδομάδες και δεν μπορεί να διαγνωστεί υπερ-ωριμότητα [29].

Η ηλικία, ο αριθμός των κύσεων, η διατροφή, η δίδυμη κύηση, η IUGR, ο σακχαρώδης διαβήτης, η ανοσοποίηση Rh, APH και η πυελονεφρίτιδα δεν έχουν επίδραση στη συγκέντρωση κρεατινίνης. Η τιμή της στην προεκλαμψία έχει δώσει αλληλο-συγκρουόμενα αποτελέσματα. Οι Sinha, O' Leary και Bezjan [31] έχουν διαπιστώσει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σοβαρές περιπτώσεις προ-εκλαμψίας, συγκρινόμενα με ήπιες περιπτώσεις με προοδευτική αύξηση προς το τέλος της κύησης. Αντιθέτως, οι Pitkin και Zwirek [29] και οι Begneaudetal [30] δεν διαπίστωσαν καμία διαφορά. Τέλος, η μελέτη των Chaudharyetal. έχει υπολογίσει επίπεδα κρεατινίνης στην 32η, 36η και 40ή εβδομάδα σε τιμές 0,9, 1,8 και 2,6 mg% αντίστοιχα. Καθώς της η σύσταση του αμνιακού υγρού επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το εμβρυϊκό ουροποιητικό σύστημα, ο βαθμός ωρίμανσής του επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα σχεδόν όλων των μεταβολιτών του αμνιακού υγρού [28] [32].

Ουρικό οξύ

Τα επίπεδα ουρικού οξέος στο αμνιακό υγρό αυξάνονται έντονα κατά το τρίτο τρίμηνο της κύησης, υποδηλώνοντας ωριμότητα του ουροποιητικού συστήματος του εμβρύου, καθιστώντας τον δείκτη χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την εκτίμηση της ηλικίας της κύησης [33]. Άλλοι τέτοιοι δείκτες είναι τα επίπεδα κρεατινίνης αμνιακού υγρού [28], το λιπιδικό περιεχόμενο των κυττάρων του αμνιακού υγρού και ο ολικός αριθμός των κυττάρων στο αμνιακό υγρό [33], καθώς όλοι αυξάνονται προοδευτικά με την αύξηση της ηλικίας του κήματος.

Αλβουμίνη και ολικές πρωτεΐνες

Υπάρχουν στοιχεία ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες ή πολυπεπίδια στο αμνιακό υγρό έχουν χαμηλό μοριακό βάρος σε μια προσπάθεια διατήρησης της οσμωτικής πίεσης μεταξύ αμνιακού υγρού και κυκλοφορίας του αίματος [34], [35]. Μεταξύ των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων περιλαμβάνονται στο αμνιακό υγρό καρκινικοί δείκτες, αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες. Μια μελέτη έχει δείξει ότι οι αυξητικοί παράγοντες του αμνιακού υγρού μπορούν να απορροφηθούν από το γαστρεντερικό σύστημα του εμβρύου και να μεταφερθούν σε ολόκληρο το εμβρυϊκό σώμα [36]. Ως εκ τούτου, οι πρωτεΐνες στο αμνιακό υγρό φαίνεται να διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, την κυτταρική μεταφορά, την ανάπτυξη οργάνων, την

κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό [37]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα αλβουμίνης και ολικής πρωτεΐνης στο αμνιακό υγρό παρουσιάζουν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση με την ηλικία του κνήματος, με προοδευτική μείωση των συγκεντρώσεών της κατά την εξέλιξη της εγκυμοσύνης. Αυτό έχει αποδοθεί στην χρήση των διαθέσιμων πρωτεϊνών μέσω απορρόφησης και μεταβολισμού τους από το αναπτυσσόμενο έμβρυο [33].

Αλκαλική φωσφατάση

Η αλκαλική φωσφατάση αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας κύησης, λόγω πλακουντιακής, σκελετικής και σπλαχνικής ανάπτυξης. Η απόπτωση επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία περιέχουν τρανσαμινάση, αυξάνουν περαιτέρω τα επίπεδα της στο αμνιακό υγρό.

Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη, η οποία είναι το προϊόν διάσπασης της αιμοσφαιρίνης, της πρωτεΐνης των ερυθροκυττάρων που μεταφέρουν το οξυγόνο στην κυκλοφορία του αίματος για τη διανομή του στους ιστούς, πρωτο-εμφανίζεται στο αμνιακό υγρό αργά κατά το πρώτο τρίμηνο, αγγίζοντας μια μέγιστη τιμή κατά το 2ο τρίμηνο και εν συνεχεία αρχίζει να μειώνεται στις 30 εβδομάδες. Σε μη Rh ευαισθητοποιημένες εγκυμοσύνες δεν μπορεί να ανιχνευθεί μετά την 36η εβδομάδα. Οι Mandelbaumetal [38] διαπίστωσαν ότι 85% των νεογνών χωρίς χολερυθρίνη στο αμνιακό υγρό ζύγισαν πάνω από 6 λίβρες, ενώ κανένα δε ζύγιζε κάτω από 5 λίβρες. Οι μετρήσεις της χολερυθρίνης στο αμνιακό υγρό χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πιθανής αιμόλυσης σε καταστάσεις υψηλού κινδύνου (όπως η Rh ευαισθητοποίηση), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούνται σειριακές μετρήσεις για την παρακολούθηση των αυξημένων τιμών ή σε περίπτωση που κρίνονται απαραίτητες θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως η χορήγηση RhIG, εμβρυϊκές μεταγγίσεις αίματος ή για τη λήψη απόφασης για έκτακτη καισαρική.

Ουροκανικό οξύ

Το ουροκανικό οξύ είναι ο μεταβολίτης του δέρματος, ο οποίος παράγεται από την ιστιδίνη και έχει σημαντική φωτοπροστατευτική δράση. Κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου τμήματος της εγκυμοσύνης, το εμβρυϊκό δέρμα είναι κατά κύριο λόγο διαφανές, οπότε τα υψηλά επίπεδα του ουροκανικού οξέος στο δεύτερο τρίμηνο της

κύησης πιθανότατα αντανακλούν την ταχεία ανάπτυξη του δέρματος και την αυξημένη ανάγκη σε φωτοπροστατευτικούς παράγοντες [3].

Φωσφολιπίδια αμνιακού υγρού και λόγος λεκιθίνης/σφιγγομυελίνης (L/S)

Τα κύρια φωσφολιπίδια, λεκιθίνη και σφιγγομυελίνη αποτελούν σημαντικά συστατικά του επιφανειοδραστικού συστήματος των πνευμόνων και διαγνωστικά, μπορούν να προβλέψουν το σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας. Η λεκιθίνη είναι το κύριο φωσφολιπίδιο του επιφανειοδραστικού παράγοντα και αποτελεί σταθεροποιητικό παράγοντα των κυψελίδων. Παράγεται σε χαμηλούς, αλλά σταθερούς ρυθμούς μέχρι την 35η εβδομάδα κύησης, μετά την οποία η παραγωγή της αυξάνεται απότομα. Η σφιγγομυελίνη, άλλο συστατικό του επιφανειοδραστικού παράγοντα, παράγεται επίσης σε συνεχή ρυθμό μετά την 26η εβδομάδα κύησης. Οι Glucketal [39] συσχέτισαν τη λεκιθίνη με τη σφιγγομυελίνη, ως αναλογία, χρησιμοποιώντας τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας και έδειξαν ότι η ωρίμανση των πνευμόνων σχετίζεται με έναν λόγο L/S 2:1, ο οποίος επιτυγχάνεται περίπου στις 35 εβδομάδες κύησης. Πριν την 35η εβδομάδα ο λόγος L/S είναι συνήθως μικρότερος από 1,6:1. Αυξάνεται έως 2 ή ακόμα περισσότερο όταν ο ρυθμός παραγωγής της λεκιθίνης αυξάνεται μετά την 35η εβδομάδα της κύησης. Άλλα φωσφολιπίδια, όπως η φωσφατιδυλο-γλυκερόλη (PG) και η φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PI), επίσης αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου στο αμνιακό υγρό. Η παρουσία PG υποδηλώνει ότι το έμβρυο βρίσκεται μεταξύ της 2ης και της 6ης εβδομάδας ωριμότητας των πνευμόνων (δηλαδή σε τελειόμηνη κύηση). Ταυτόχρονη μέτρηση της PG με τον λόγο L/S βελτιώνει τη διαγνωστική ακρίβεια. Η παραγωγή επιφανειοδραστικού παράγοντα φωσφολιπιδίων καθυστερεί σε μητέρες με σακχαρώδη διαβήτη. Για αυτόν τον λόγο, πρέπει να δίνεται προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από μία διαβητική ασθενή, καθώς αναμένεται μεγαλύτερος λόγος L/S για την πρόβλεψη της ωριμότητας των πνευμόνων [23].

Οι Dunn και Bhatnagar [40] έδειξαν ότι σε έμβρυα με ένα πρότυπο ωριμότητας 2:1, στο 99% των περιπτώσεων δεν αναπτυσσόταν RDS. Πρότυπο ανωριμότητας 1:1 συσχετίστηκε με φυσιολογική αναπνευστική λειτουργία στο 50% των περιπτώσεων, RDS στο 33% των περιπτώσεων και αναπνευστικός θάνατος στο 15% των περιπτώσεων. Η αναλογία L/S σε τιμή 7 ή μεγαλύτερη έχει συσχετιστεί με υπερωριμότητα. Η καισαρική τομή δεν επηρέασε την εξέλιξη του RDS σε αναλογία L/S ωριμότητας. Η ωρίμανση των πνευμόνων λαμβάνει χώρα ανεξάρτητα από την ηλικία

κνήσεως ή το βάρος γέννησης, ειδικά σε παθολογικές εγκυμοσύνες. Οι Gluck και Kulovich[39] ανέφεραν την περίπτωση ενός νεογνού βάρους 3,3 kg στις 38 εβδομάδες κύησης, το οποίο είχε αναλογία L/S 0,75 και εκδήλωσε σοβαρό RDS, ενώ ένα νεογνό 920 gr στις 28 εβδομάδες κύησης με αναλογία L/S ωριμότητας το οποίο δεν εκδήλωσε RDS. Διαπίστωσαν ότι κάθε νεογνό με αναλογία L/S μικρότερη από δύο παρουσίαζε κλινικό RDS και όσο χαμηλότερη ήταν η αναλογία L/S, τόσο πιο σοβαρό ήταν το RDS.

Οι Gluck και Kulovich [39] μελέτησαν την αναλογία L/S σε κήσεις υψηλού κινδύνου. Διαπίστωσαν ότι κάποιες ασθένειες σχετίζονταν με καθυστερημένη ωρίμανση σε προχωρημένη ηλικία κύησης. Σε αυτές περιλαμβάνονταν ο σακχαρώδης διαβήτης, ο εμβρυϊκός ύδρωπας, η χρόνια νεφρική νόσος χωρίς υπέρταση και το μικρότερο από τα δίδυμα (όχι παρασιτικός δίδυμος). Μάλιστα, στον σακχαρώδη διαβήτη, στη χρόνια νεφρική νόσο με υπέρταση, την υπέρταση που σχετίζεται με σοβαρή τοξιναιμία ή καρδιαγγειακή νόσο, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η νόσος του πλακούντα, η χρόνια αποκόλληση του πλακούντα και ο εθισμός σε ναρκωτικά, όπως η ηρωίνη και η μορφίνη, παρατηρείται επιτάχυνση της ωρίμανσης των πνευμόνων πριν από τις 32 εβδομάδες και σε κάποιες περιπτώσεις ήδη από την 26η έως την 28η εβδομάδα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, μια ώριμη αναλογία L/S δεν υποδηλώνει απλά ωριμότητα πνευμόνων, αλλά μπορεί επίσης να υποδηλώνει επιτάχυνση της ηπατικής και νευρολογικής λειτουργίας. Τέλος, σε καταστάσεις οξέος στρες (π.χ. εμβολή πλακούντα ή ρήξη των μεμβρανών) παρατηρείται απότομη, οξεία αύξηση του λόγου L/S. Η ρήξη των μεμβρανών προκαλεί απότομη άνοδο σε αναλογία L/S ωριμότητας εντός 72 ωρών, αλλά δεν σχετίζεται με την επιτάχυνση της ωριμότητας άλλων οργάνων.

Η αξιολόγηση του λόγου L/S μπορεί να γίνει εύκολα με ένα άμεσο και οικονομικό rapid test επιφανειοδραστικού παράγοντα αμνιακού υγρού, ώστε να διαπιστωθεί η ωριμότητα ή μη του αναπνευστικού του νεογνού. Εξαρτάται από την ικανότητα της λεκιθίνης να παράγει έναν σταθερό αφρό, παρουσία αιθανόλης. Ένας δακτύλιος αφρού στην περιφέρεια του φυγοκεντρημένου δείγματος δίνει θετικό αποτέλεσμα και υποδηλώνει ωριμότητα αναπνευστικού. Ένας μη ολοκληρωμένος δακτύλιος και στα δύο διαλύματα δίνει αρνητικό αποτέλεσμα, το οποίο υποδηλώνει ανωριμότητα αναπνευστικού. Νεογνά που γεννήθηκαν εντός 24 ωρών από ένα θετικό test δεν ανέπτυξαν RDS, ενώ όλα τα νεογνά με αρνητικό test ανέπτυξαν RDS και οκτώ από τα 13 νεογνά με ενδιάμεσο αποτέλεσμα ανέπτυξαν τελικά RDS [41].

Πέραν του λόγου L/S, πολλαπλά άλλα τεστ σε δείγματα αμνιακού υγρού έχουν δοκιμαστεί για την εκτίμηση της ωριμότητας του εμβρύου, με ποικιλία αποτελεσμάτων. Σε αυτά, έχει διαπιστωθεί προοδευτική πτώση των συγκεντρώσεων α-φετοπρωτεΐνης προς το τέλος της κύησης. Επίπεδα ουρικού οξέος 8,5 mg% αντιστοιχούν σε έμβρυο με ηλικία κύησης άνω των 38 εβδομάδων. Οι Nelson και Freedman [42] διαπίστωσαν ότι τιμές τριγλυκεριδίων 2 mg% ή μεγαλύτερες αντιστοιχούν σε μόλις 4% ψευδώς θετικά αποτελέσματα ωριμότητας, αλλά σε 42% ψευδώς αρνητικών. Οι FernandesdeCastroetal. [43]έδειξαν μια απότομη άνοδο της αμυλάσης του αμνιακού υγρού μετά τις 36 εβδομάδες κύησης. Η οιστριόλη στο αμνιακό υγρό έδειξε απότομη άνοδο από τα 8 mg% στις 32 εβδομάδες στα 65 mg% στις 38 εβδομάδες και στα 100 mg% στην τελειόμηνη κύηση, αλλά αυτό δεν έχει χρησιμότητα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, προεκλαμψία και ανοσοποίηση Rh. Οι τιμές της οιστριόλης ούρων, η ανθρώπινη χοριακή σωματοτροπίνη και η σταθερή στη θερμότητα αλκαλική φωσφατάση παρουσιάζουν αυξητικές τάσεις προς το τέλος της κύησης, αλλά αποτελούν περισσότερο δείκτες της καλής γενικής κατάστασης του εμβρύου, παρά ωριμότητας.

Τέλος, έχουν περιγραφεί και συνδυαστικές μέθοδοι για μια πιο ακριβή αξιολόγηση της εμβρυϊκής ωριμότητας. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται το τροποποιημένο σκορ των O' Leary και Bejzian [31], το οποίο συμπεριλαμβάνει στις μετρήσεις του την αμφιβρεγματική διάμετρο στον υπέρηχο, τα επίπεδα κρεατινίνης του αμνιακού υγρού, τον αριθμό λιποκυττάρων και την αναλογία L/S, παράλληλα με την κλινική εκτίμηση του βάρους του εμβρύου. Ένα σκορ «6» ή μεγαλύτερο υποδηλώνει ωριμότητα, ενώ ένα σκορ μικρότερο ή ίσο του «5» υποδηλώνει ανωριμότητα. Οι Moltzetal. [44] χρησιμοποίησαν έναν συνδυασμό των επιπέδων κρεατινίνης του αμνιακού υγρού, του αριθμού των λιποκυττάρων και την οπτική πυκνότητα στα 450 nm και βρήκαν ότι αν μόνο ένα τεστ ήταν θετικό για ωριμότητα παρείχε αξιοπιστία 24%, 2 θετικά τεστ παρείχαν αξιοπιστία 92% και, αν όλα τα τεστ ήταν θετικά, παρείχαν 100% επιβεβαίωση για την εμβρυϊκή ωριμότητα.

Στον πίνακα [23]που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές αναφοράς για μια σειρά δεικτών της μεταβολομικής ανάλυσης του φυσιολογικού αμνιακού υγρού, η αξιολόγηση των οποίων θα μπορούσε να συμβάλλει στην αναγνώριση διαφόρων διαταραχών της ανάπτυξης και παθολογικών καταστάσεων, μεταξύ των οποίων ανατομικές ανωμαλίες, όπως η δισχιδής ράχη, χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως το σύνδρομο Down, γενετικές διαταραχές η δρεπανοκυτταρική αναιμία, η αιμοφιλία και

η αλλοάνωση αιμολυτική αναιμία του νεογνού και κληρονομικές μεταβολικές διαταραχές, όπως η κυστική ίνωση, καθώς και στην εκτίμηση της ωριμότητας των πνευμόνων του εμβρύου για την έγκαιρη διάγνωση πιθανού συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας νεογνού (RDS).

Εξέταση	Τιμή αναφοράς
Χρώμα	Άχρωμο έως ελαφρώς κίτρινο
Όψη	Διαυγές
α ₁ -Φετοπρωτεΐνη (AFP)	Λιγότερο από 2 MoM
Ακετυλοχολινεστεράση	Απούσα
Κρεατινίνη	1,8–4 mg/dL σε τελειόμηνη κύηση (159,1–353,6 micromol/L) (Μονάδες SI= Συμβατικές μονάδες × 88,4)
Χολερυθρίνη	Λιγότερο από 0,075 mg/dL χωρίς στην εγκυμοσύνη (Λιγότερα από 1,28 micromol/L) (Μονάδες SI= Συμβατικές μονάδες × 17.1)
	Λιγότερο από 0,025 mg/dL σε τελειόμηνη κύηση (Λιγότερα από 0,428 micromol/L) (Μονάδες SI= Συμβατικές μονάδες × 17.1)
Χολερυθρίνη ΔOD ₄₅₀	Λιγότερο από 0,05 ΔOD χωρίς στο μέσο της κύησης (περίπου στις 14–27 εβδομάδες, χρησιμοποιώντας την καμπύλη Queenan όταν η ηλικία κύησης είναι κάτω από τις 27 εβδομάδες)
	Λιγότερο από 0,06 ΔOD αργά στην εγκυμοσύνη (κατά προσέγγιση στις 28–36 εβδομάδες, με τη χρήση του LileyChart όταν η ηλικία κύησης είναι ίση ή μεγαλύτερη από 27 εβδομάδες)
	Λιγότερο από 0,03 ΔOD σε τελειόμηνη κύηση (κατά προσέγγιση στις 37–40 εβδομάδες, με τη χρήση του Liley Chart όταν η ηλικία κύησης είναι ίση ή μεγαλύτερη από 27 εβδομάδες)

Εξέταση	Τιμή αναφοράς
Λόγος L/S	
Ωριμότητα (μη- διαβητικοί)	Λόγος μεγαλύτερος από 2:1 παρουσία φωσφατιδυλογλυκερόλης
Οριακός	1,5 έως 1,9:1
Ανωριμότητα	Μικρότερος από 1,5:1
Φωσφατιδυλογλυκερόλη	Παρούσα σε τελειόμηνη κύηση
Χρωμοσωμική ανάλυση	Φυσιολογικός καρυότυπος
Λευκά αιμοσφαίρια	Απόντα
Εστεράση λευκοκυττάρων	Αρνητική

MoM = Πολλαπλάσια της μέσης τιμής για την ηλικία κύησης.

Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης του αμνιακού έχουν ιδιαίτερη κλινική σημασία, καθώς μπορούν να συμβάλλουν στη διάγνωση μιας σειράς παθολογικών καταστάσεων [23]:

- Κίτρινο, πράσινο, κόκκινο ή καφέ αμνιακό υγρό υποδηλώνει την παρουσία χολερυθρίνης, αίματος (εμβρυϊκό ή μητρικό) ή μηκωνίου, που υποδηλώνουν εμβρυϊκή δυσφορία ή θάνατο, αιμολυτική νόσο ή καθυστέρηση της ανάπτυξης.
- Τα αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης υποδηλώνουν εμβρυϊκή αιμολυτική νόσο ή εντερική απόφραξη. Η μέτρηση της χολερυθρίνης συνήθως δεν πραγματοποιείται πριν από κύηση 20 έως 24 εβδομάδων, διότι δεν μπορεί να γίνει καμία ενέργεια πριν από αυτήν. Η σοβαρότητα της αιμολυτικής νόσου βαθμολογείται με ζώνες οπτικής πυκνότητας (OD). Μια αυξητική τάση των τιμών με διαδοχικές μετρήσεις μπορεί να υποδηλώνει την ανάγκη για ενδομήτρια μετάγγιση ή πρόωρο τοκετό, ανάλογα με την ηλικία του εμβρύου. Μετά την κύηση 32 έως 33 εβδομάδων, ο πρόωρος τοκετός προτιμάται έναντι της ενδομήτριας μετάγγισης επειδή ο πρόωρος τοκετός είναι πιο αποτελεσματικός στην παροχή της απαιτούμενης φροντίδας στο νεογνό.

- Μια συγκέντρωση κρεατινίνης μεγαλύτερη από 2 mg/dL (μεγαλύτερη από 176,8 micromol/L) (Μονάδες SI = Συμβατικές μονάδες × 88,4) υποδηλώνει ωριμότητα του εμβρύου (στις 36-37 εβδομάδες) εάν τα μητρικά επίπεδα κρεατινίνης είναι επίσης εντός του αναμενόμενου εύρους. Αυτή η τιμή πρέπει να ερμηνεύεται σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους που αξιολογούνται στο αμνιακό υγρό και ειδικά με την αναλογία L/S, επειδή η φυσιολογική ανάπτυξη των πνευμόνων εξαρτάται από την φυσιολογική ανάπτυξη των νεφρών.
- Μια αναλογία L/S μικρότερη από 2:1 και η απουσία φωσφατιδυλογλυκερόλης σε τελειόμηνη κύηση υποδηλώνουν την ανωριμότητα του πνεύμονα του εμβρύου και πιθανό σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας νεογνού. Άλλες καταστάσεις που μειώνουν την παραγωγή επιφανειοδραστικού παράγοντα περιλαμβάνουν την προχωρημένη ηλικία της μητέρας, την πολλαπλή κύηση και τον πολυϋδράμνιο. Οι καταστάσεις που μπορεί να αυξήσουν την παραγωγή επιφανειοδραστικού παράγοντα περιλαμβάνουν την υπέρταση, την καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης, τον υποσιτισμό, τον μητρικό διαβήτη, τον προδρομικό πλακούντα, το έμφρακτο του πλακούντα και την πρόωρη ρήξη των μεμβρανών. Ο αναμενόμενος λόγος L/S για το έμβρυο μιας διαβητικής μητέρας είναι υψηλότερος (3,5:1).
- Τα αυξημένα επίπεδα α-φετοπρωτεΐνης (AFP) και η παρουσία ακετυλοχολινεστεράσης μπορεί να υποδηλώνουν έλλειμμα νευρικού σωλήνα που σχετίζεται με διαρροή από τον ανοικτό νωτιαίο μυελό στο αμνιακό υγρό. Η αύξηση της AFP και/ή της ακετυλοχολινεστεράσης είναι επίσης ενδεικτική των ελλειμμάτων των καρδιακών κοιλιακών τοιχωμάτων. Η παρουσία AFP και ακετυλοχολινεστεράσης στο αμνιακό υγρό είναι παθολογική. Ωστόσο, το τεστ δεν αποτελεί ευαίσθητο δείκτη για ελλείμματα του νευρικού σωλήνα. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκληθούν από μόλυνση του δείγματος με εμβρυϊκό αίμα, το οποίο συνήθως περιέχει μετρήσιμα επίπεδα AFP και ακετυλοχολινεστεράσης. Τα παθολογικά αποτελέσματα μπορούν να επιβεβαιωθούν ελέγχοντας το αμνιακό υγρό για την παρουσία εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Hgb F). Εάν ανιχνευτεί Hgb F, τότε το δείγμα είναι πιθανώς μολυσμένο με εμβρυϊκό αίμα και τα αποτελέσματα είναι αναξιόπιστα.
- Ο μη φυσιολογικός καρυότυπος υποδηλώνει γενετική ανωμαλία (π.χ. νόσος Tay-Sachs, διανοητική αναπηρία, χρωμοσώματα ή ενζυματικές ανωμαλίες και κληρονομικές αιμοσφαιρινοπάθειες).

- Ο αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων και η θετική εστεράση λευκοκυττάρων είναι δείκτες λοίμωξης.

Παράγοντες που μπορούν να αλλάξουν τα αποτελέσματα της μεταβολομικής ανάλυσης του αμνιακού υγρού [23]:

- Η χολερυθρίνη μπορεί να αυξηθεί ψευδώς εάν στο δείγμα υπάρχει μητρική αιμοσφαιρίνη ή μηκόνιο. Η εμβρυϊκή οξέωση μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ψευδώς αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης.
- Η χολερυθρίνη μπορεί να μειωθεί ψευδώς εάν το δείγμα εκτίθεται σε φως ή εάν η ποσότητα του αμνιακού υγρού είναι υπερβολικά αυξημένη.
- Η μητρική κρεατινίνη ορού πρέπει να μετράται ταυτόχρονα για σύγκριση με την κρεατινίνη του αμνιακού υγρού. Ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η τιμή κρεατινίνης του μητρικού ορού είναι φυσιολογική, τα αποτελέσματα της κρεατινίνης του αμνιακού υγρού μπορεί να είναι παραπλανητικά. Η υψηλή τιμή της κρεατινίνης αμνιακού υγρού για το έμβρυο μιας μητέρας που είναι διαβητική μπορεί να αντικατοπτρίζει την αυξημένη μυϊκή μάζα ενός μεγαλύτερου εμβρύου. Εάν το έμβρυο είναι μεγάλο, η κρεατινίνη μπορεί να είναι υψηλή και το έμβρυο μπορεί ακόμη να έχει ανώριμους νεφρούς.
- Η επιμόλυνση του δείγματος με αίμα ή μηκόνιο ή επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να οδηγήσουν σε ανακριβείς τιμές του λόγου L/S. Επιπλέον, το εμβρυϊκό αίμα αυξάνει ψευδώς τον λόγο L/S.
- Η αι-φετοπρωτεΐνη και η ακετυλοχολινεστεράση μπορεί να αυξηθούν ψευδώς εάν το δείγμα είναι μολυσμένο με εμβρυϊκό αίμα.

Μεταβολομική Ανάλυση Αμνιακού Υγρού στον Αυθόρμητο Πρόωρο Τοκετό

Προκειμένου να διερευνηθούν οι μεταβολικές αλλαγές που σχετίζονται με τον αυθόρμητο πρόωρο τοκετό, συγκριτικά με της τελειόμηνης κύσεις, διεξήχθη το 2014 μελέτη από της RamkumarMenonetal. [19], η οποία αφορούσε τη μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού Αφροαμερικανών εγκύων κατά τον τοκετό πρόωρης ή τελειόμηνης κύησης. Η μελέτη διεξήχθη με δεδομένη την έλλειψη βιοχημικών δεικτών σε βιολογικά υλικά προερχόμενα από τη μητέρα ή το έμβρυο που θα μπορούσαν να προβλέψουν έναν πρόωρο τοκετό [45]. Οι έρευνες που είχαν προηγηθεί και οι οποίες βασίζονταν στη μέτρηση της μεμονωμένου μεταβολικού δείκτη με σκοπό την πρόγνωση του πρόωρου τοκετού δεν επέφεραν τα επιθυμητά

αποτελέσματα [45], [46]. Αυτό αποδόθηκε εν μέρει στην συμμετοχή πολλαπλών βιοδεικτών και την ύπαρξη μη αναγνωρισμένων παραγόντων κινδύνου που μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα, επιβεβαιώνοντας την πολυπλοκότητα του συνδρόμου [47]. Τα βήματα για την έναρξη του τοκετού, είτε σε επίπεδο προωρότητας, είτε σε τελειόμηνη κύηση περιλαμβάνουν πολλά οργανικά συστήματα, τόσο του εμβρύου, όσο και της μητέρας. Έως τότε, ο μόνος επιβεβαιωμένος παράγοντας ενεργοποίησης πρόωρου τοκετού ήταν η φλεγμονή και για τον λόγο αυτό η έως τότε έρευνα είχε επικεντρωθεί σε παράγοντες φλεγμονής [48].

Στην μελέτη των Ramkumar Menon et al. μετρήθηκαν συνολικά 348 μεταβολίτες σε δείγματα αμνιακού υγρού, εκ των οποίων 121 μεταβολίτες είχαν συσχέτιση με την ηλικία της κύησης και 116 διέφεραν σημαντικά μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων κύσεων. Η πλειονότητα των σημαντικά μεταβαλλόμενων μεταβολιτών θα μπορούσε να ταξινομηθεί σε μία από τις 3 κατηγορίες: (1) ηπατικοί δείκτες, (2) μεταβολισμός λιπαρών οξέων και συνενζύμου A (CoA) και (3) μεταβολισμός ιστιδίνης [19]. Στη μελέτη παρατηρήθηκε τροποποίηση της ηπατικής λειτουργίας σε οδούς που συνδέονται με το κυτόχρωμα P450, στις οποίες περιλαμβάνονται τα χολικά οξέα, τα στεροειδή, οι ξανθίνες, η αίμη και το στάδιο II της αποτοξίνωσης των ξενοβιοτικών. Ωστόσο, η σημαντικότερη μεταβολή διαπιστώθηκε ότι αφορά την παντοθενόλη, έναν αναστολέα της σύνθεσης CoA, η οποία ανιχνεύεται σε 8-πλάσια συχνότητα στο αμνιακό υγρό πρόωρων νεογνών.

Μεταβολίτες Ιστιδίνης

Οι μεταβολίτες της ιστιδίνης, με κυριότερους το cis-ουροκανικό οξύ, trans-ουροκανικό οξύ και 1-μεθυλιμιδαζόλιο, είναι βασικοί βιοχημικοί δείκτες με διαφοροποιημένη μεταβολική ρύθμιση στη σύγκριση δειγμάτων αμνιακού υγρού από τελειόμηνες κύσεις και πρόωρους τοκετούς.

Αποτοξίνωση Ξενοβιοτικών Φάσης II

Ο μεταβολισμός και η αδρανοποίηση των ξενοβιοτικών γενικώς εξελίσσεται σε 3 φάσεις: (1) τροποποίηση, συνήθως με την συμμετοχή οξειδασών του κυτοχρώματος P450, (2) σύζευξη με θειικά άλατα γλουταθειονίνης, γλυκουρονικού οξέος ή γλυκίνης και (3) απέκκριση [19]. Στη μελέτη των Ramkumar M. et al, πολλοί μεταβολίτες που σχετίζονται με τον ηπατικό μεταβολισμό διέφεραν σημαντικά μεταξύ δειγμάτων αμνιακού υγρού από πρόωρους τοκετούς και τελειόμηνες κύσεις,

συμπεριλαμβανομένων αρκετών μεταβολιτών της ακεταμινοφαίνης. Η ακεταμινοφαίνη αποτελεί παυσίπονο συχνά χρησιμοποιούμενο από εγκύους, τόσο κατά την κύηση όσο και κατά τον τοκετό. Η ακεταμινοφαίνη, ως γνωστόν, μεταβολίζεται μέσω γλυκουρονιδίωσης, θείωσης και υδροξυλίωσης, με σκοπό την παραγωγή μη τοξικών προϊόντων που αποβάλλονται από τους νεφρούς. Το ανθρώπινο εμβρυϊκό ήπαρ διαθέτει ικανοποιητική δυναμική μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ήδη από την 8η έως τη 10η εβδομάδα κύησης [49]. Η ακεταμινοφαίνη στο εμβρυϊκό ήπαρ μεταβολίζεται κυρίως μέσω θείωσης, αν και πιθανότατα λόγω του μικρού μεγέθους του εμβρυϊκού ήπατος, η γενική συμμετοχή του στη φαρμακοκινητική των φαρμάκων είναι μάλλον μικρή [50]. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι διαφορές στους μεταβολίτες της ακεταμινοφαίνης αποτελούσαν δείκτη της τροποποιημένης ηπατικής λειτουργίας των πρόωρων νεογνών, χωρίς να αναδειχθούν στοιχεία που τους καθιστούν ενεργοποιητές πρόωρου τοκετού.

Μεταβολίτες Στεροειδών

Τα στεροειδή συντίθενται από την χοληστερόλη για τον έλεγχο πολλαπλών φυσιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης, της οσμωτικής ισορροπίας, του μεταβολισμού και της ανταπόκρισης στο στρες. Η ωρίμανση του εμβρυϊκού άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων έχει μελετηθεί εκτενώς ως μηχανισμός έναρξης της διαδικασίας τοκετού. Η αυξημένη παραγωγή του C19 στεροειδικού προδρόμου DHEAS και κορτιζόλης κατά τον τοκετό από τα εμβρυϊκά επινεφρίδια φαίνεται να παίζει κύριο ρόλο στην έναρξη της διαδικασίας του τοκετού, ενώ η παραγωγή προγεστερόνης από χοληστερόλη στον πλακούντα διατηρεί την κατάσταση ηρεμίας κατά την κύηση [51]. Δύο πρόδρομοι της χοληστερόλης (σκουαλένιο και λαθοστερόλη) καθώς και τα στεροειδή του στρες (κορτιζόλη και κορτιζόνη) ήταν λιγότερο άφθονα στο αμνιακό υγρό πρόωρων τοκετών, ενώ η προγεστερόνη παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το αμνιακό υγρό τελειόμηνων κύσεων [19]. Επιπλέον, διαφορές παρατηρήθηκαν στους συζευγμένους μεταβολίτες στεροειδών, συμπεριλαμβανομένων διαφορών στις θεικές ομάδες σύζευξης με τους μεταβολίτες της πλακουντιακής προγεστερόνης (ανδροστερόνη, ανδροστεροειδή, εστριόλη και κορτιζόνη), τους δισουλφιδικούς μεταβολίτες (21-υδροξυπρεγνενολόνη, πρεγνενδιόλη και πρεγνανεδιόλη-3-γλυκορουνίδιο).

Συνολικά, αυτές οι διαφορές θα μπορούσαν να προέρχονται από την τροποποιημένη σύνθεση/μεταβολισμό ή μεταφορά των στεροειδών. Πολλοί από τους μεταβολίτες έχουν ισχυρή σύνδεση με την ηλικία της κύησης και δεν υποδηλώνουν υποχρεωτικά έναν διαφορετικό μηχανισμό/οδό. Αυτό φαίνεται να έρχεται σε συμφωνία με τη θεωρία του πλακουντιακού ρολογιού [52] για τον χρονικό καθορισμό της ώρας του τοκετού. Υποδηλώνει επίσης ότι άλλοι εξωτερικοί παράγοντες ενδέχεται να είναι υπεύθυνοι για την επιτάχυνση του ρολογιού, οδηγώντας στον πρόωρο τοκετό, ο τελικός μηχανισμός του οποίου ενδέχεται να μην διαφέρει από εκείνον του πρόωρου τοκετού.

Χολικά Οξέα

Τα χολικά οξέα συντίθεται από χοληστερόλη στο ήπαρ, μεταβολίζονται εν συνεχεία από το μικροβίωμα του εντέρου και απελευθερώνονται για να συμβάλλουν στην απορρόφηση διαιτητικών λιπών. Στη μελέτη, πολλά χολικά οξέα ήταν αυξημένα στα δείγματα αμνιακού υγρού από πρόωρους τοκετούς και σε αυτά περιλαμβάνονταν τα: γλυκοχολικό οξύ, ταυροχολικό οξύ, ταυροχενοδοξυχολικό οξύ, ταυροδεοξυχολικό οξύ και γλυκοδεοξυχολικό οξύ. Τα χολικά οξέα απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω του μητρικού ήπατος και τα υψηλά επίπεδα στην κυκλοφορία προκαλούν εμβρυϊκό στρες [19]. Ο μεταβολισμός των χολικών οξέων, η έκκριση από το ήπαρ και η επαναπρόσληψη από αυτό μπορούν να επηρεαστούν από ορμονικές μεταβολές που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη (χολόσταση) [53]. Λόγω χολόστασης και επηρεασμένης ηπατικής λειτουργίας ανευρέθηκαν αυξημένοι οι μεταβολίτες της αίμης (χολερυθρίνη [Z,Z], χολερυθρίνη [E,E] και χολοπρασίνη) στο αμνιακό υγρό πρόωρων τοκετών.

Μεταβολίτες Ξανθίνης

Αρκετοί μεταβολίτες που σχετίζονται με την καφεΐνη (θεοβρωμίνη, θεοφυλλίνη, 1-μεθυλουρικό οξύ, 1,7-διμεθυλουρικό οξύ, 1,3,7-τριμεθυλουρικό οξύ και 7-μεθυλξανθίνη) ανιχνεύθηκαν σε μειωμένα επίπεδα στο αμνιακό υγρό πρόωρων τοκετών. Επίσης, πολλοί μεταβολίτες που προαναφέρθηκαν μεταβολίζονται από το κυτόχρωμα P450 στο ήπαρ.

Μεταβολισμός λιπαρών οξέων

Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέδειξαν της επηρεασμένο μεταβολισμό λιπαρών οξέων στο αμνιακό υγρό μεταξύ πρόωρων τοκετών και τελειόμηνων κήσεων. Πιο συγκεκριμένα, αρκετά λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και βασικά λιπαρά οξέα ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στους πρόωρους τοκετούς. Δεδομένου ότι τα βασικά λιπαρά οξέα, τα ωμέγα-3 λιπαρά και το παράγωγό τους, το δοκοσαεξανοϊκό οξύ, λαμβάνονται με τη διατροφή και τα χαμηλά επίπεδά τους υποδηλώνουν έλλειμμα στον οργανισμό, το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με την πιθανότητα εμφάνισης πρόωρου τοκετού [54], [55].

Επιπλέον, είναι σημαντικό να αναφερθεί ο ρόλος των λιπαρών οξέων ως προδρόμων προσταγλανδινών, προστακυκλινών, θρομβοξανίων και λευκοτριενίων που είναι σημαντικός για τις αναπτυξιακές διαδικασίες της φυσιολογικής εγκυμοσύνης και την έναρξη του τοκετού. Αλλαγές στην παραγωγή ενός ή περισσότερων από αυτά τα είδη κατά τη διάρκεια της καθυστερημένης κύησης μπορεί να οδηγήσουν σε πρόωρη δραστηριότητα της μήτρας [56].

Τριγλυκερίδια και Ολική Χοληστερόλη

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι γυναίκες εμφανίζουν αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων (TG) και της ολικής χοληστερόλης (TC) καθώς εξελίσσεται η κύηση. Τόσο τα TG όσο και η TC προσλαμβάνονται από τον πλακούντα, μεταβολίζονται και μεταφέρονται στο έμβρυο σε διάφορες μορφές απαραίτητες για την ανάπτυξη του εμβρύου. Υψηλά επίπεδα μητρικής TC και/ή TG είχαν προηγουμένως συσχετιστεί με επιπλοκές και δυσμενείς συνέπειες τόσο για τη μητέρα όσο και για το νεογέννητο και, μεταξύ άλλων, με πρόωρες γεννήσεις [57]. Έχει επίσης βρεθεί ότι τα κυκλοφορούντα λιπίδια ασκούν άμεση βλαβερή επίδραση στο ενδοθήλιο των αγγείων του πλακούντα, ενώ τα αυξημένα λιπίδια του πλάσματος, μπορεί να προκαλέσουν ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Η υπεροξειδωση αυτών των αυξημένων λιπιδίων στο πλάσμα προκαλεί αυξημένο οξειδωτικό στρες παράγοντας προοδευτικά ελεύθερες ρίζες και υπεροξειδία λιπιδίων, τοξικές ενώσεις με πιθανότητα βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι πολύ πρώιμες αυξήσεις στα επίπεδα TC και TG κατά την κύηση έχουν συσχετιστεί με 2,8 φορές αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού πριν από 34 εβδομάδες και 2 φορές αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού μεταξύ 34 και 37 εβδομάδων [56].

Αυσοφωσφολιπάση D

Έχει επίσης βρεθεί ότι η μέση δραστηριότητα λυσοφωσφολιπάσης D (lysoPLD) στο μητρικό ορό κυήσεων με πρόωρη ρήξη υμένων ήταν σημαντικά υψηλότερη από ό, τι στον μητρικό ορό κατά τον τοκετό σε τελειόμηνη κύηση. Επιπλέον, η δραστηριότητα της lysoPLD έναντι ενδογενών υποστρωμάτων στον μητρικό ορό ασθενών με πρόωρο τοκετό και προεκλαμψία διαπιστώθηκε υψηλότερη από εκείνη των γυναικών με φυσιολογική εγκυμοσύνη [56].

Ινοσιτόλη

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ινοσιτόλη έχει επίσης διαπιστωθεί ως σημαντικός δείκτης στο αμνιακό υγρό γυναικών με πρόωρο τοκετό χωρίς ενδοαμνιακή λοίμωξη/φλεγμονή [58]. Η ινοσιτόλη μπορεί να σχετίζεται με διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις καθώς παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμιση της οσμωτικότητας των κυττάρων, των διαδικασιών μεσολάβησης της κυτταρικής σηματοδότησης, του σχηματισμού του νευρικού συστήματος, της παραγωγής πνευμονικών επιφανειοδραστικών φωσφολιπιδίων και άλλα [56]. Γενικά, τα χαμηλά επίπεδα ινοσιτόλης στον ορό του εμβρύου έχουν συνδεθεί με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας και στη συνέχεια με πρόωρο τοκετό, ενώ έχει μελετηθεί η χορήγηση ινοσιτόλης σε πρόωρα βρέφη [59].

Τρυπτοφάνη

Ένας άλλος μεταβολίτης που βρέθηκε μειωμένος στα δείγματα μητρικού ορού γυναικών με πρόωρο τοκετό ήταν η τρυπτοφάνη. Η τρυπτοφάνη χρησιμεύει ως ένας σημαντικός προδρομικός παράγοντας για τη σύνθεση βιοδραστικών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένου του νευροδιαβιβαστή σεροτονίνης και υπάρχουν αναφορές που συνδέουν ανεπαρκή επίπεδα τρυπτοφάνης και σεροτονίνης με κατάθλιψη κατά την εγκυμοσύνη και πρόωρη ρήξη υμένων [60].

Καθεψίνη G

Οι γυναίκες με πρόωρη ρήξη μεμβρανών, δηλαδή με εκροή αμνιακού υγρού λόγω ρήξης των υμένων χωρίς την έναρξη της φυσιολογικής δραστηριότητας της μήτρας πριν από την ολοκλήρωση της 37ης εβδομάδας της εγκυμοσύνης [61] και μικροβιακό αποικισμό της αμνιακής κοιλότητας παρουσίαζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις καθεψίνης-G αμνιακού υγρού σε σύγκριση με γυναίκες με πρόωρη ρήξη μεμβρανών χωρίς μικροβιακό αποικισμό της αμνιακής κοιλότητας σε μελέτη που διεξήχθη το

2016 από τους Musilova I. et al [62]. Η καθεψίνη-G ανήκει στην οικογένεια πρωτεασών σερίνης των ουδετεροφίλων, στις οποίες περιλαμβάνεται επίσης η ελαστάση των ουδετεροφίλων και η πρωτεΐνωση 3, οι οποίες αποθηκεύονται στα κοκκία των ουδετεροφίλων [63], [64]. Κύριος ρόλος των πρωτεασών σερίνης είναι η δράση τους ως αντιμικροβιακοί παράγοντες: απελευθερώνονται από τα κύτταρα και ασκούν τη δράση τους στον εξωκυττάριο χώρο. Οι γυναίκες με ενδοαμνιακή λοίμωξη παρουσίαζαν υψηλότερες συγκεντρώσεις καθεψίνης-G αμνιακού υγρού από τις γυναίκες χωρίς αυτήν την επιπλοκή. Γυναίκες με μικροβιακή λοίμωξη (μικροβιακό αποικισμό αμνιακής κοιλότητας και ενδοαμνιακή λοίμωξη) παρουσίασαν υψηλότερες συγκεντρώσεις καθεψίνης-G αμνιακού υγρού από τις γυναίκες μόνο με αποικισμό (χωρίς ενδοαμνιακή λοίμωξη) και γυναίκες χωρίς μικροβιακό αποικισμό και ενδοαμνιακή λοίμωξη. Συμπερασματικά, η παρουσία είτε μικροβιακής είτε στείρας ενδοαμνιακής λοίμωξης συσχετίστηκε με αυξημένες συγκεντρώσεις καθεψίνης-G αμνιακού υγρού σε εγκυμοσύνες που περιπλέκονται από πρόωρη ρήξη μεμβρανών. Ως εκ τούτου, η καθεψίνη-G του αμνιακού υγρού φαίνεται να είναι ένας πιθανός δείκτης ενδοαμνιακής λοίμωξης [62].

Πεντραξίνη 3 (PTX3), C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και Αμυλοειδές P ορού (SAP)

Οι πεντραξίνες θεωρούνται μια εξελικτικά διατηρημένη υπερ-οικογένεια πρωτεϊνών με ρυθμιστικό ρόλο στη φλεγμονή [65]. Όλα τα μέλη της υπερ-οικογένειας πεντραξίνης πρωτεϊνών μοιράζονται περίπου μια περιοχή 200 αμινοξέων, χαρακτηριστική της υπερ-οικογένειας, η οποία μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω με βάση τη δομική τους οργάνωση σε μικρές και μεγάλες οικογένειες. Τα κύρια μέλη της οικογένειας πεντραξίνης βραχείας αλύσου είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και το αμυλοειδές P (SAP) του ορού, ενώ εκείνο της οικογένειας μακράς αλύσου είναι η πεντραξίνη 3 (PTX3) [65].

Η CRP θεωρείται κατά κύριο λόγο πρωτεΐνη οξείας φάσης. Ως εκ τούτου, η CRP χρησιμοποιείται συστηματικά στην περιγεννητική ιατρική ως δείκτης φλεγμονής στα μητρικά και ενδο-αμνιακά διαμερίσματα, καθώς ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στον μητρικό ορό έχει ένα πολύ ευρύ φυσιολογικό εύρος κατά τη διάρκεια της κύησης. Το αμυλοειδές P του ορού (SAP) είναι ένα μόριο αναγνώρισης μοτίβου που πιστεύεται ότι εκκρίνεται κυρίως από το ήπαρ, το οποίο αλληλεπιδρά με μικροοργανισμούς και υπολείμματα ιστών για να προωθήσει την απομάκρυνσή τους από τα φαγοκύτταρα [66]. Στους ανθρώπους, το SAP δεν δρα ως πρωτεΐνη οξείας

φάσης και οι συγκεντρώσεις του στον ανθρώπινο ορό κυμαίνονται μεταξύ 30 και 50 mg/L. Ο ρόλος του SAP στην παθολογία της εγκυμοσύνης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Παρ' όλα αυτά, μελέτες έχουν αναδείξει μια σύνδεση ανάμεσα στα επίπεδα του SAP και της παρουσίας εμβρύου με τρισωμία 21 (σύνδρομο Down).

Η PTX3 είναι μια εκκριτική, πολυ-λειτουργική γλυκοπρωτεΐνη ομο-πολυμερούς αλυσίδας και η δομή της διαφέρει από αυτήν των PTXs βραχείας αλύσου, επειδή έχει υπομονάδες πρωτομερών διατεταγμένα σε πενταμερή [65], [67]. Η δομή της PTX3 αποτελείται από δύο τετραμερή που συνδέονται μεταξύ τους από γέφυρες μεταξύ αλύσων, οι οποίες σχηματίζουν ένα οκταμερές [68]. Αυτή η χαρακτηριστική δομή επιτρέπει στους υποδοχείς PTX3 να την αναγνωρίσουν και είναι υπεύθυνη για τις μοναδικές βιολογικές λειτουργίες της.

Σε αντίθεση με τη βραχεία πεντραξίνη, η PTX3 θεωρείται ότι παράγεται κυρίως από διάφορα ανοσοποιητικά, ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα μετά από έκθεση σε φλεγμονώδεις μεσολαβητές, αγωνιστές TLR και μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα αποθηκεύουν την PTX3 στους κόκκους τους και μπορούν να την απελευθερώσουν γρήγορα μετά από μολυσματική ή μη φλεγμονώδη διέγερση, σε συνεργασία με το σύστημα συμπληρώματος. Η PTX3 είναι ένας ρυθμιστής της έντασης της φλεγμονώδους απόκρισης, αναφορικά με επακόλουθη βλάβη που προκαλείται από φλεγμονή, λόγω της ικανότητάς της να αποκλείει την πρόωμη συσσώρευση ουδετερόφιλων σε απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα. Η PTX3 έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον πρόωρο τοκετό, στην πρόωρη ρήξη υμένων, στην προεκλαμψία, στον περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου και τη στειρότητα [69], [70].

Το 2017, οι MusilovaI. etal [61] πραγματοποίησαν μελέτη με σκοπό την αξιολόγηση του ρόλου των πεντραξίνων του αμνιακού υγρού ως πιθανούς πρώιμους δείκτες στην αναγνώριση ενδο-αμνιακών φλεγμονωδών επιπλοκών στην πρόωρη ρήξη υμένων. Διαπιστώθηκε ότι (i) οι συγκεντρώσεις της CRP στο αμνιακό υγρό ήταν υψηλότερες παρουσία μικροβιακού αποικισμού της αμνιακής κοιλότητας (MIAC) και ενδο-αμνιακής λοίμωξης (IAI) απ' ότι σε απουσία αυτών των συνθηκών. (ii) Οι συγκεντρώσεις SAP αμνιακού υγρού ήταν υψηλότερες παρουσία IAI αλλά όχι MIAC, απ' ότι σε απουσία αυτών των συνθηκών. (iii) Οι συγκεντρώσεις PTX3 του αμνιακού υγρού ήταν υψηλότερες παρουσία MIAC και IAI απ' ότι σε απουσία αυτών των καταστάσεων. (iv) Οι συγκεντρώσεις PTX3 του αμνιακού υγρού συσχετίστηκαν με το μικροβιακό φορτίο στελεχών ουρεοπλάσματος, ενώ την ένταση της ενδο-

αμνιακής φλεγμονής εκτιμήθηκε βάσει επιπέδων IL-6 στο αμνιακό υγρό. Μια συγκέντρωση PTX3 αμνιακού υγρού 11 ng/mL βρέθηκε να είναι το βέλτιστο σημείο όριο για την ταυτοποίηση των κυήσεων με πρόωρη ρήξη υμένων που περιπλέκονται από την παρουσία IAI.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις CRP του αμνιακού υγρού ήταν υψηλότερες σε γυναίκες με IAI από ό,τι σε γυναίκες χωρίς αυτή τη συνθήκη. Σε αυτήν τη μελέτη, διαπιστώθηκε επίσης ότι οι συγκεντρώσεις CRP ήταν τέσσερις φορές υψηλότερες παρουσία MIAI και οκτώ φορές υψηλότερες παρουσία IAI. Αυτή η παρατήρηση, ωστόσο, υποδηλώνει ότι η CRP του αμνιακού υγρού δεν αυξάνεται τόσο έντονα μετά την έκθεση σε μολυσματικό ερέθισμα, όσο αυξάνεται στη συστηματική κυκλοφορία.

Τέλος, οι συγκεντρώσεις SAP αμνιακού υγρού μετρήθηκαν περίπου 1000 φορές χαμηλότερες από αυτές στον ανθρώπινο ορό. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις SAP του αμνιακού υγρού ήταν υψηλότερες σε γυναίκες με IAI παρά σε γυναίκες χωρίς αυτή την επιπλοκή. Καθώς οι συγκεντρώσεις SAP αυξήθηκαν μόνο κατά 1,4 φορές στις γυναίκες με IAI, εξήχθη το συμπέρασμα ότι το SAP δεν φαίνεται να δρα ως οξεία πρωτεΐνη φάσης στο αμνιακό υγρό [61].

Πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας και γαλακτικό οξύ αμνιακού υγρού

Η ρύθμιση της αγγειογένεσης στον πλακούντα είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη και τη λειτουργία του. Ο πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας (PLGF) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι αμφότεροι ισχυροί αγγειογόνοι παράγοντες που εκφράζονται σε έναν αριθμό διαφορετικών κυττάρων, μεταξύ των οποίων και οι τροφοβλάστες. Επιπλέον, ο αυξημένος αναερόβιος μεταβολισμός στην εμβryo-πλακουντιακή μονάδα μπορεί να προκαλέσει αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος του αμνιακού υγρού (AFL). Το γαλακτικό οξύ που παράγεται στη μήτρα μπορεί στη συνέχεια να μεταφερθεί μέσω του αμνιακού υγρού στα κύτταρα του μυομητρίου[71].

Το 2018, διεξήχθη μια μελέτη από τους SterpuI. etal[72], στόχος της οποίας ήταν να διερευνήσει τη σχέση μεταξύ των επιπέδων AFL, PLGF και VEGF στο αμνιακό υγρό κυήσεων δευτέρου τριμήνου και την έκβαση αυτών για το έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του τοκετού. Διαπιστώθηκε ότι τα μέσα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο αμνιακό υγρό στις εγκυμοσύνες που κατέληξαν σε αποβολή

ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με εκείνα σε κυοφορούσες που κατέληξαν σε γέννηση ζωντανού βρέφους. Τα επίπεδα των VEGF και PLGF δεν φάνηκε να επηρεάζονται. Σε εγκυμοσύνες με καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης (IUGR), τα μέσα επίπεδα AFL ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με εκείνα με φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου. Δεν βρέθηκαν διαφορές στις τιμές του VEGF, αλλά, ωστόσο, στα τα επίπεδα PLGF διαπιστώθηκαν σημαντικά χαμηλότερα PLGF σε κήσεις IUGR.

Εγκεφαλικός Νευροτροφικός Παράγοντας (BDNF) στο Αμνιακό Υγρό

Η ανάπτυξη του εμβρυϊκού νευρικού συστήματος αντανακλά τη γενική ανάπτυξη του εμβρύου, η οποία αποτελεί έναν συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης και αλληλεπιδράσεων στο περιβάλλον μέσα στη μήτρα. Ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (BDNF) είναι μια νευροτροφίνη που εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό από τα κύτταρα του ταχέως αναπτυσσόμενου εμβρυϊκού εγκεφάλου, ενώ παίζει ζωτικής σημασίας ρόλο στην υποστήριξη της νευρικής ανάπτυξης και μεταβολισμού, συμβάλλοντας στην επιβίωση και προώθηση της ανάπτυξης μιας ποικιλίας νευρώνων, συμπεριλαμβανομένων των γαγγλίων των ραχιαίων ριζών, καθώς και των νευρώνων του ιππόκαμπου και του φλοιού [73].

Το 2018 διεξήχθη μια μελέτη από τους AntonakopoulosN. etal [74], η οποία είχε ως σκοπό την αξιολόγηση των επιπέδων του BDNF, ως δείκτη της ωρίμανσης του εμβρυϊκού κεντρικού νευρικού συστήματος, κατά το 2ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης και τη διερεύνηση της συσχέτισής του με την συνολική εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ οι νευροτροφίνες στο αμνιακό υγρό μπορεί να είναι μητρικής, πλακουντιακής ή εμβρυϊκής προέλευσης, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο BDNF που ανιχνεύεται στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης στο αμνιακό υγρό είναι κατά κύριο λόγο εμβρυϊκής προέλευσης [75]. Κατά συνέπεια, η αξιολόγηση αμνιακού υγρού δεύτερου τριμήνου αντικατοπτρίζει αξιόπιστα την κατάσταση του εμβρύου και το κεντρικό νευρικό του σύστημα υπό την επίδραση χημιο-βιολογικών μηχανισμών σε περιπτώσεις μειωμένης ενδομητριακής ανάπτυξης ή μακροσωμίας. Απώτερος στόχος της μελέτης ήταν να αναδείξει έναν πιθανό προγνωστικό ρόλο του BDNF, με βάση τα επίπεδά του στο αμνιακό υγρό κατά το 2ο τρίμηνο, για την τελική έκβαση της εγκυμοσύνης, αναφορικά με τη συνολική ανάπτυξη του εμβρύου [74].

Τα δείγματα αμνιακού υγρού που ελήφθησαν ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το βάρος του εμβρύου: 1) AGA (αναμενόμενο βάρος για την ηλικία

κύησης), 2) SGA (υπολειπόμενο βάρος για την ηλικία κύησης και 3) LGA (αυξημένο βάρος για την ηλικία κύησης). Ως περιορισμός της εμβρυϊκής ανάπτυξης (FetalGrowthRestriction – FGR) ορίζεται ο παθολογικός περιορισμός του γενετικού δυναμικού ανάπτυξης του εμβρύου. Ο FGR αναφέρεται σε ένα έμβρυο του οποίου το εκτιμώμενο βάρος βρίσκεται κάτω από το 10ο εκατοστημόριο για την ηλικία κύησης [76] και το οποίο παρουσιάζει σημεία χρόνιας υποθρεψίας και υποξίας. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ανατομικές ή λειτουργικές διαταραχές στην εμβryo-πλακουντιακή μονάδα, ενώ το έμβρυο προσαρμόζει την κυκλοφορία του μέσω της επαναδιανομής του οξυγόνου, της αιματικής ροής και της παροχής θρεπτικών συστατικών στα ζωτικά όργανα, δηλαδή στο μυοκάρδιο, στον εγκέφαλο και τα επινεφρίδια. Όταν αυτή η κατάσταση επιμένει, αναπτύσσεται FGR. Η πιθανότητα περιορισμού της ανάπτυξης αυξάνεται δραματικά στα έμβρυα με χαμηλό βάρος βάσει ηλικίας κύησης (SGA) [74]. Ενώ όλα τα έμβρυα SGA συνοδεύονται από αυξημένες πιθανότητες περιγεννητικής θνητότητας και νοσηρότητας, η πλειονότητα των δυσμενών εκβάσεων αφορά έμβρυα SGA που ανήκουν και στην ομάδα FGR [77].

Η γενικώς περιορισμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη επηρεάζει αναπόφευκτα και την ανάπτυξη του εμβρυϊκού νευρικού συστήματος, την πλέον πολύπλοκη δομή του ανθρώπινου σώματος. Μεταξύ των αναπτυξιακών κινδύνων, καθοριστικό ρόλο φαίνεται να παίζει η ανεπάρκεια του πλακούντα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μακροχρόνια ελλείμματα στη νευρωνική συνδεσιμότητα και λειτουργία. Τόσο η βαρύτητα, όσο και ο χρόνος αυτών των προγεννητικών διαταραχών θα καθορίσει της περιοχές του εγκεφάλου που θα επηρεαστούν και το πόσο σοβαρή θα είναι η βλάβη [78]. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν αυξημένα επίπεδα BDNF στο αμνιακό υγρό εμβρύων με υπολειπόμενη ανάπτυξη, συγκριτικά με εκείνα των εμβρύων φυσιολογικής ανάπτυξης. Μάλιστα, όσο υψηλότερος ήταν ο βαθμός περιορισμού της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τόσο υψηλότερα ήταν τα επίπεδα του αμνιακού BDNF. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στα έμβρυα με μακροσωμία, στα οποία ανευρέθηκαν εκ νέου παρομοίως αυξημένα επίπεδα αμνιακού BDNF, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά έμβρυα. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι η σοβαρά επηρεασμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη συνεπάγεται αυξημένη παραγωγή εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα, στα πλαίσια της προσαρμοστικού μηχανισμού, αντιδραστικού στο ακατάλληλο περιβάλλον του εσωτερικού της μήτρας, με σκοπό την επιτάχυνση της εμβρυϊκής εγκεφαλικής ανάπτυξης και ωρίμανσης [74].

Το Μεταβολικό Προφίλ του Αμνιακού Υγρού στην Ανίχνευση Συγγενών Διαταραχών του Μεταβολισμού και Εμβρυϊκών Ανωμαλιών

Η ανάλυση συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους στο αμνιακό υγρό είναι υψηλής κλινικής σημασίας στον έλεγχο/διάγνωση συγγενών διαταραχών του μεταβολισμού [79]. Για παράδειγμα, ο καθορισμός του κυκλοφορούντος και/η εκκρινόμενων πουρινών, πυριμιδινών, αμινοξέων και οργανικών οξέων αποτελεί ένα βασικό αναλυτικό εργαλείο για τη διάγνωση αρκετών συγγενών διαταραχών του μεταβολισμού, κάποιες από τις οποίες έχουν καλή έκβαση εάν διαγνωστούν σε πολύ πρώιμο στάδιο. Για τον λόγο αυτό, διεξάγονται διάφορα εθνικά προγράμματα προληπτικού ελέγχου νεογνών σε πολλές χώρες παγκοσμίως. Στο ίδιο πλαίσιο, παρουσιάστηκε το 2012 μελέτη από τους Amorini A.M. et al. [80], στην οποία μετρήθηκαν διάφοροι μεταβολίτες (πουρίνες, πυριμιδίνες, κρεατινίνη, Ν-ακετυλοασπαρτικό οξύ, μεθυλμαλονικό οξύ, μαλονικό οξύ και ενώσεις που περιέχουν αμινομάδες) στο αμνιακό υγρό με την εφαρμογή των ίδιων κριτηρίων που χρησιμοποιούνται στους προληπτικούς ελέγχους των νεογνών για μεταβολικά νοσήματα. Στόχος ήταν ο καθορισμός αξιόπιστων τιμών αναφοράς για έναν μεγάλο αριθμό συστατικών διαφόρων χημικών τάξεων. Ο μεγάλος αριθμός των δειγμάτων που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη και ο ταυτόχρονος καθορισμός πολλών μεταβολιτών σε ένα ευρύ φάσμα πιθανών συγγενών μεταβολικών διαταραχών για το έμβρυο επέτρεψαν την εκτίμηση των 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης για αυτά τα στοιχεία [80].

Η μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την έρευνα ανέδειξε ότι οι εμβρυϊκές ανωμαλίες μπορεί να συνοδεύονται από τροποποιήσεις στο μεταβολικό προφίλ του αμνιακού υγρού [81]. Κατά τη διάρκεια της έρευνας μελετήθηκαν δείγματα αμνιακού υγρού 24 εμβρύων με σύνδρομο Down. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε όλα τα δείγματα διαπιστώθηκαν συγκεντρώσεις γλουταμικού οξέος (Glu) και γλουταμίνης (Gln) κάτω από την κατώτερη και πάνω από την ανώτερη τιμή των ορίων εμπιστοσύνης αντίστοιχα, συγκριτικά με το αμνιακό υγρό φυσιολογικών εμβρύων. Κατ' αντιστοιχία, διαπιστώθηκε εννεαπλάσια μείωση του λόγου Glu/Gln συγκριτικά με την τιμή του λόγου στα φυσιολογικά έμβρυα. Δεδομένου ότι το εκκρινόμενο γλουταμικό οξύ προέρχεται από την νεφρική απαμίνωση της γλουταμίνης, μπορεί να υποθεθεί ότι τα έμβρυα με σύνδρομο Down πάσχουν από καθυστερημένη νεφρική ανάπτυξη που εν τέλει προκαλεί μείωση στην αναλογία Glu/Gln στο αμνιακό υγρό. Θα μπορούσε επίσης να υποθεθεί ότι εάν η

μείωση στην διαθεσιμότητα του γλουταμικού οξέος για το έμβryo επιμένει καθ' όλη την περίοδο της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι υπεύθυνη για κάποια από τα χαρακτηριστικά νευρωνικών διαταραχών αυτής της παθολογικής κατάστασης. Επιπλέον, η ανάλυση του πλήρους προφίλ αμινοξέων αποκάλυψε σημαντική μείωση στις τιμές αρκετών απαραίτητων αμινοξέων (Val, Ile, Leu, Lys) καθώς και στις συγκεντρώσεις της Gly, Tau και Orn. Τα μειωμένα επίπεδα των Gly και Glu, τα οποία έχουν συνδεθεί με ποικίλες διαδικασίες νευρωνικής μετάδοσης, μπορεί να έχει σωρευτικές αρνητικές επιδράσεις στις εμβρυϊκές νευρωνικές λειτουργίες.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης επιβεβαίωσαν την ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των διαταραχών στο μεταβολικό προφίλ του αμνιακού υγρού και των διαταραχών της εμβρυϊκής ανάπτυξης [80], [82]. Επιπλέον, τα δεδομένα της μελέτης υποδηλώνουν ότι το μεταβολικό προφίλ του αμνιακού υγρού και η προσέγγιση που έχει υιοθετηθεί στον μεταβολικό προληπτικό έλεγχο των νεογνών (ευρύ φάσμα μεταβολιτών υπό ανάλυση, μεγάλο μέγεθος δειγμάτων που εξετάζονται σε έναν πληθυσμό με άγνωστο κίνδυνο για συγγενή μεταβολικά νοσήματα) μπορεί να υιοθετηθεί ως επιπρόσθετος βιοχημικός έλεγχος στις αμνιοπαρακεντήσεις, χρήσιμο εργαλείο για την επισήμανση ανωμαλιών που πιθανώς σχετίζονται με τις συγγενείς μεταβολικές διαταραχές. Για τον σκοπό αυτό, οι φυσιολογικές τιμές αναφοράς για το αμνιακό υγρό φυσιολογικών κυήσεων είναι χρήσιμες για την ανάδειξη ανώμαλων βιοχημικών προφίλ του αμνιακού υγρού, που πιθανότατα οφείλονται σε μια συγγενή μεταβολική διαταραχή.

Στην ίδια κατεύθυνση κινήθηκε και η μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2017, από τους Huang J. et al [83], όπου σε μια προσπάθεια ενίσχυσης των ήδη διαθέσιμων ερευνητικών δεδομένων, μελετήθηκαν 4 μεταβολικές οδοί σε δείγματα αμνιακού υγρού φυσιολογικών εμβρύων και εμβρύων με σύνδρομο Down, αναφορικά με τον μεταβολισμό της πορφυρίνης, των χολικών οξέων, ορμονών και αμινοξέων, τα οποία αξιολογήθηκαν σε δύο ομάδες (φυσιολογικών μαρτύρων και πασχόντων εμβρύων). Τα δεδομένα έδειξαν και εδώ ότι τα μεταβολικά προφίλ διέφεραν στις πειραματικές δοκιμές, με αξιοσημείωτες διαφορές να παρατηρούνται στους μεταβολίτες της κοπροπορφυρίνης III, του γλυκοχολικού οξέος, του ταυρο-χηνοδοεοξυχολικού οξέος, του ταυροχολικού οξέος, της υδροκορτιζόνης, της θειικής πρεγνενολόνης, της L-ιστιδίνης, της L-αργινίνης, του L-γλουταμικού οξέος και της L-γλουταμίνης. Μεταξύ αυτών των δεικτών, οι τιμές υδροκορτιζόνης και L-γλουταμίνης διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένες, ωστόσο οι τιμές των άλλων μεταβολιτών διαπιστώθηκαν

μειωμένες σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Όταν οι τιμές εκτιμήθηκαν σε μεμονωμένα δείγματα τόσο για το σετ διάγνωσης, όσο και για το σετ επικύρωσης, 10 μεταβολίτες παρουσίασαν σημαντική διαφορά έναντι των μαρτύρων. Οι τιμές κοπροπορφυρίνης-III, L-γλουταμινικού, θειικής πρεγνενολόνης, ταυροχενδεοξυχολικού, L-αργινίνης και ταυροχολικού ήταν σημαντικά μειωμένες σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($P < 0,01$), όπως και η L-ιστιδίνη και το γλυκοχολικό οξύ ($P < 0,05$). Τα επίπεδα υδροκορτιζόνης και L-γλουταμίνης διαπιστώθηκαν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η ανάλυση αυτών των τροποποιημένων μεταβολικών δεικτών συνδεόταν με την παθολογική έκφραση του χρωμοσώματος 21 στο πάσχον έμβρυο.

Η μείωση της κοπροπορφυρίνης III στο αμνιακό υγρό εμβρύων με σύνδρομο Down μπορεί να υποδηλώνει πιθανή παθολογική ερυθροποίηση, όπως αναλύεται παρακάτω, ενώ χρησιμοποιώντας την ανάλυση της οδού KEGG, αναγνωρίστηκε ότι υπήρξαν τουλάχιστον 30 οδοί KEGG στις οποίες διαπιστώθηκαν μεταβολές σε σύγκριση με τους μάρτυρες, συμπεριλαμβανομένης της βιοσύνθεσης αμινοξέων, μεταφορέων ABC, αλανίνης, ασπαρτικού και μεταβολισμού γλουταμικού, έκκρισης χολής, αργινίνης και προλίνης μεταβολισμός, μεταβολισμός ιστιδίνης, ταυρίνη και μεταβολισμός υποταουρίνης. Η πλειονότητα αυτών των μορίων εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό με το μεταβολισμό των αμινοξέων, τη λειτουργία του ήπατος, την αυξητική ορμόνη και τη νευρική ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τη χαρτογράφηση των οδών KEGG, διαπιστώθηκε ότι συγκεκριμένα μόρια είχαν κοινά γονίδια εντοπιζόμενα στο χρωμόσωμα 21. Υπήρχαν 9 οδοί KEGG τροποποιημένες στο αμνιακό υγρό εμβρύων με σύνδρομο Down που σχετίζονται με γονίδια στο χρωμόσωμα 21. Αυτοί ήταν ο μεταβολισμός της γαλακτόζης, ο μεταβολισμός της πουρίνης, ο μεταβολισμός της ιστιδίνης, οι μεταφορείς ABC, η αλληλεπίδραση νευροδραστικού συνδέτη-υποδοχέα, η νόσος του Πάρκινσον, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, η νόσος του Huntington και μεταβολικές οδοί στον καρκίνο.

Η διαταραχή της ισορροπίας γλουταμίνης-γλουταμικού οξέος έχει ήδη συσχετιστεί με παθολογική εγκεφαλική ανάπτυξη στο έμβρυο με σύνδρομο Down [80], [84], υποδηλώνοντας μεταβολή σε ένα σημαντικό στοιχείο σε οδό σηματοδότησης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Στο σύνδρομο Down, οι παρεκκλίσεις στην γλουταμινεργική μετάδοση αποτελούν κύρια αιτία των συμπεριφορικών παρεκκλίσεων και το γλουταμικό οξύ αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα επιβίωσης των νευρώνων του ιπποκάμπου. Κλινικά, η πρόσληψη γλουταμικού οξέος είναι σημαντικά μειωμένη στα αιμοπετάλια και στους ινοβλάστες των ασθενών με

σύνδρομο Down και ένα σημαντικό έλλειμμα σε γλουταμικό οξύ έχει παρατηρηθεί στον ιππόκαμπο ασθενών με σύνδρομο Down. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι το L-γλουταμικό είναι ο κύριος μεταβολίτης που παρουσιάζει μείωση στο εμβρυϊκό αμνιακό υγρό. Λόγω του γεγονότος ότι η γλουταμίνη συντίθεται από γλουταμικό οξύ και ότι ο κύκλος γλουταμικού οξέος-γλουταμίνης συμβάλει ουσιαστικά στην νευρωνική ενεργοποίηση, η αύξηση των επιπέδων γλουταμίνης και η μείωση των επιπέδων γλουταμικού οξέος αντανακλά τη διαταραχή σε αυτόν τον κύκλο [83]. Η γενετική ανάλυση έδειξε επίσης ότι αρκετά γονίδια του χρωμοσώματος 21 συμμετέχουν στη γλουταμινεργική μετάδοση. Για τον λόγο αυτό, διαμορφώθηκε η υπόθεση ότι οι παρατηρούμενες τροποποιήσεις γλουταμίνης-γλουταμικού οξέος συσχετίζονται στενά με τους μοριακούς μηχανισμούς αιτιολόγησης των συμπτωμάτων του συνδρόμου Down.

Σε μια προηγούμενη μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα αμινοξέα του αμνιακού υγρού μπορούν να προσλαμβάνονται ενεργητικά από το έμβρυο και ότι μεταβολικοί παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης, μπορούν να προωθήσουν τη χρήση των αμινοξέων του αμνιακού υγρού [85]. Μεταξύ των αμινοξέων, η αργινίνη είναι ο δότης NO in vivo και η συγκέντρωσή της σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα NO. Μελέτες μοριακής μηχανικής δείχνουν ότι η αργινίνη συμμετέχει σε ποικίλες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης του πλακούντα, στο αντιοξειδωτικό στρες, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και στην απόπτωση του πλακούντα [86], [87], [88].

Στην μελέτη των Huang J. et al, η μείωση της συγκέντρωσης της L-αργινίνης υποδήλωνε ότι η επηρεασμένη ανάπτυξη των εμβρύων με σύνδρομο Down μπορεί επίσης να σχετιζόταν με την μειορρύθμιση της οδού σηματοδότησης NO, χωρίς ωστόσο να εξασφαλίσει επαρκή δεδομένα για να το αποδείξει. Επιπλέον, ως απαραίτητο αμινοξύ για τα έμβρυα, η μείωση στα επίπεδα ιστιδίνης έχει αναφερθεί σε αρκετούς τύπους παθολογικής εμβρυϊκής ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων των πρόωρων νεογνών και των εμβρύων με σκελετικές δυσπλασίες [89]. Ωστόσο, στην περίπτωση της χοριοαμνιονίτιδας η ιστιδίνη παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη, γεγονός που υποδηλώνει συσχέτιση με φλεγμονή και λοίμωξη της μήτρας [90]. Η πλειονότητα των περιπτώσεων εμβρύων με σύνδρομο Down δεν συνοδεύονται από λοίμωξη της μήτρας και για τον λόγο αυτό, παρομοίως με την κατάσταση για τα πρόωρα νεογνά και τα έμβρυα με σκελετικές δυσπλασίες, η μείωση των επιπέδων

ιστιδίνης στο αμνιακό υγρό μπορεί να οφείλεται σε τροποποιημένο μεταβολισμό αυτής.

Ένας από τους κυριότερους στόχους της μεταβολομικής ανάλυσης είναι να συμβάλλει στην ανεύρεση της αιτιολογίας ασθενειών σε λειτουργικό επίπεδο. Στη μελέτη των Huang J. et al [83], αν και ταυτοποιήθηκαν μόνο συγκεκριμένοι αξιοσημείωτα επηρεασμένοι μεταβολίτες, ορισμένοι από αυτούς μπορούσαν να συσχετιστούν άμεσα με τον φαινότυπο του συνδρόμου Down σε μοριακό επίπεδο. Αναγνωρίστηκε ότι οι μεταβολίτες που συμμετείχαν στην ερυθροποίηση (κοπροπορφυρίνη III) ήταν σημαντικά επηρεασμένοι στα έμβρυα με σύνδρομο Down. Η κοπροπορφυρίνη III αποτελεί ένα παραπροϊόν της σύνθεσης της αίμης και εκκρίνεται φυσιολογικά στα κόπρανα, ως προϊόντα αποδόμησης της ερυθροποίησης. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην κοπροπορφυρίνη III στο αμνιακό υγρό εμβρύων με σύνδρομο Down, το οποίο ενδεχομένως να αντανακλά παθολογική εμβρυϊκή ερυθροποίηση. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο βλαστικών κυττάρων, τα κύτταρα εμβρύων με σύνδρομο Down αποδείχθηκε ότι παρουσίαζαν αυξημένη ερυθροποίηση και μειωμένη μυελοποίηση [91]. Οι δοκιμασίες μεταμόσχευσης in vitro και σε ποντικούς έδειξαν ότι τα προδρομικά κύτταρα στην τρισωμία 21 χαρακτηρίζονταν από αυξημένη παραγωγή ερυθρών και μεγακαρυοκυτταρικών κυττάρων με έντονο πολλαπλασιασμό [92]. Επομένως, η μείωση της κοπροπορφυρίνης III στα έμβρυα με σύνδρομο Down μπορεί δυνητικά να συσχετιστεί σε μοριακό επίπεδο με την ανώμαλη ερυθροποίησή τους. Αντίστοιχα, ασθενείς με σύνδρομο Down συχνά παρουσιάζουν αιματολογικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων επηρεασμένων κυτταρικών σειρών (λευκά αιμοσφαίρια, ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, κ.λπ), μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα και οξεία λευχαιμία.

Συμπερασματικά, η ανάλυση αυτών των μεταβολικών διαφοροποιήσεων τις συσχετίζει με την εκτροπή γονιδιακής έκφρασης στο χρωμόσωμα 21 των εμβρύων, ιδιαίτερα σε σχέση με την νοητική υστέρηση και την ανώμαλη ερυθροποίηση. Επομένως, οι μεταβολές στους μεταβολίτες του αμνιακού υγρού μπορεί να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της εμβρυϊκής νόσου πέραν αυτής της γονιδιωματικής, της επιγενωμικής και της πρωτεωμικής ανάλυσης [83]. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη τεστ για τη διάγνωση εμβρυϊκών παθήσεων και γενετικών διαταραχών, παρέχοντας ένα επιπλέον εργαλείο για την εξερεύνηση της αιτιολογίας της εμβρυϊκής παθολογίας.

Κατάσταση οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών παραγόντων στο αμνιακό υγρό εμβρύων με συγγενείς νευρολογικές ανωμαλίες

Το ανθρώπινο σώμα παράγει μια ευρεία ποικιλία ενζυμικών και μη ενζυμικών μηχανισμών για την προστασία των κυττάρων ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Η καταλάση και η γλουταθειονίνη συμπεριλαμβάνονται σε αυτούς τους μηχανισμούς. Η καταλάση αποτελεί ένα ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό ένζυμο και εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στα υπεροξειδισώματα. Η καταλάση καταλύει μια αντίδραση μεταξύ δύο μορίων H_2O_2 , με αποτέλεσμα σχηματισμό νερού και O_2 . Επιπλέον, η καταλάση προάγει την αλληλεπίδραση του H_2O_2 με δότες υδρογόνου, έτσι ώστε το H_2O_2 να μπορεί να μετατραπεί σε ένα μόριο νερού, ενώ παράλληλα ο δότης οξειδώνεται (υπεροξειδική δραστηριότητα της καταλάσης) [93]. Η γλουταθειονίνη, η οποία υπάρχει σε όλα τα κύτταρα των οργανισμών, παίζει σημαντικό ρόλο στο να καταστήσει τις επιβλαβείς ενώσεις ανενεργές. Η γλουταθειονίνη συμμετέχει στην επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούνται από ρίζες και αντιοξειδωτικά ένζυμα και δρα ως υποδοχέας ελεύθερων ριζών. Είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντική για τη δράση των ενζύμων υπεροξειδάσης και αναγωγάσης. Τα επίπεδα της GSH μειώνονται στο οξειδωτικό στρες [94].

Μια ανισορροπία στους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς στις μεμβράνες του πλακούντα και του εμβρύου μπορεί να προκαλέσει ασθένειες στα νεογνά, προβλήματα αναπαραγωγής και επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη [95]. Η οξειδωτική βλάβη του DNA συμβαίνει λόγω αυξημένου σχηματισμού αντιδραστικών ριζών οξυγόνου, μειωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων και ελαττωμάτων στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα διασπάσεις μονής ή της διπλής αλυσίδας του DNA, τροποποιήσεις βάσεων (συμμετοχή βάσης, αναδιάταξη σε ορισμένες περιπτώσεις) και βλάβες νουκλεοτιδίων. Μπορεί επίσης να υπάρχουν διασυνδέσεις μεταξύ DNA και πρωτεΐνης ανάλογα με την οξειδωτική βλάβη [96].

Η ανάπτυξη του εμβρύου λαμβάνει χώρα υπό την επίδραση γενετικών, μεταβολικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η υποβάθμιση των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών οδηγεί σε ελαττώματα στη σύνθεση του DNA. Αυτό θα μπορούσε να παίζει ρόλο στην εμφάνιση συγγενών δυσπλασιών και στον κυτταρικό θάνατο [97]. Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες είναι μία από τις κύριες αιτίες μοριακής βλάβης στις δομές κυττάρων και ιστών [98]. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη στα αρχικά της στάδια είναι ευάλωτη στο οξειδωτικό στρες λόγω της ανωριμότητας των

μηχανισμών εντοπισμού ελευθέρων ριζών [99]. Το γονίδιο Pax3 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του νευροεπιθηλίου των εμβρύων. Σε περίπτωση απουσίας του Pax3, εμφανίζονται ελλείμματα του νευρικού σωλήνα. Το οξειδωτικό στρες που συμβαίνει πριν από την έκφραση του Pax3 έχει ενοχοποιηθεί για αύξηση του κινδύνου εμφάνισης ελλειμμάτων του νευρικού σωλήνα και μειωμένη γονιδιακή έκφραση [100].

Ο διαβήτης και τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης είναι έντονες οξειδωτικές καταστάσεις και σχετίζονται με γενετικές ανωμαλίες και ιδιαίτερα τα ελλείμματα του νευρικού σωλήνα. Επιπλέον, οι νευροτροφικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρωνική ζωή κατά τη διάρκεια της αναπτυξιακής διαδικασίας, καθώς και μετά από τραυματισμούς. Ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από τον εγκέφαλο ρυθμίζει τη νευρογένεση και τη πλαστικότητα των συνάψεων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη οξειδωτική βλάβη μειώνει τα επίπεδα πρωτεΐνης που δεσμεύουν τα στοιχεία απόκρισης cAMP/Ca²⁺, αυξάνει την έκφραση του πυρηνικού παράγοντα-κάππα Β, μειώνει τα επίπεδα νευροτροφικού παράγοντα που προέρχεται από τον εγκέφαλο και βλάπτει τις γνωστικές λειτουργίες [101].

Ο εγκέφαλος και οι νευρικοί ιστοί έχουν προδιάθεση για οξειδωτικό στρες λόγω της ταχύτητας της διακίνησης Ca²⁺ μεταξύ των νευρωνικών μεμβρανών, της υψηλής κατανάλωσης οξυγόνου και της παρουσίας διεγερτικών της οξείδωσης αμινοξέων (γλουταμινικό και ασπαρτικό). Επιπλέον, αυτοί οι ιστοί έχουν προδιάθεση για οξειδωτικό στρες λόγω της εύκολης αυτο-οξείδωσης ορισμένων νευροδιαβιβαστών, των χαμηλών επιπέδων αντιοξειδωτικών ενζύμων των λιπιδίων στις νευρωνικές μεμβράνες, την παρουσία του κυτοχρώματος P450 σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου, του εγκεφαλικού μεταβολισμού του H₂O₂ και τα υψηλά επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η μόνιμη βλάβη στον εγκέφαλο μπορεί να προκληθεί από οξειδωτική βλάβη λόγω διαταραγμένης ισορροπίας οξειδωτικών/ αντιοξειδωτικών παραγόντων κατά την εμβρυϊκή περίοδο και την πρώιμη παιδική ηλικία [102].

Η μελέτη των NumanCimetal. [103] παρείχε στοιχεία που επιβεβαίωνε την ύπαρξη οξειδωτικού στρες στο αμνιακό υγρό εμβρύων με συγγενείς ανωμαλίες του νευρικού συστήματος, το οποίο αντανακλάται από τη μειωμένη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών της καταλάσης και γλουταθειονίνης σε έγκυες γυναίκες των οποίων τα έμβρυα είχαν συγγενείς ανωμαλίες του νευρικού συστήματος. Παράλληλα, διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα μαλονδιαλδεΐδης, μιας οργανικής

ουσίας που προκύπτει από την υπεροξειδωση των λιπιδίων και πιο συγκεκριμένα, από την δράση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου πάνω στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η μαλονδιαλδεΐδη είναι τοξική ουσία για τα κύτταρα επειδή σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες ενώ έχει επίδραση και στο DNA του κυττάρου προκαλώντας μεταλλάξεις. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης αποτελεί ένα μέτρο της επίδρασης των δραστικών ριζών οξυγόνου πάνω στα λιπίδια και έτσι μια εκτίμηση του οξειδωτικού στρες του οργανισμού.

Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι μπορεί να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ συγγενών ανωμαλιών του νευρικού συστήματος στο έμβρυο, της φλεγμονής και της αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η βλάβη των ιστών λόγω της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και της αποτυχίας των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών, ενζυμικών και μη ενζυμικών, μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νευρογένεσης. Ως εκ τούτου, η οξειδωτική-αντιοξειδωτική κατάσταση του αμνιακού υγρού μπορεί να χρησιμεύσει ως διαγνωστικός δείκτης σε ανωμαλίες του νευρικού συστήματος του εμβρύου. Το άγχος, τα τερατογόνα, η ακτινοβολία και η μόλυνση θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως οξειδωτικές καταστάσεις και μια ισχυρή αντιοξειδωτική αντιρρόπηση έχει σίγουρα θετική επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου [103].

Η ειδική νευρωνική ενολάση στο αμνιακό υγρό ως πιθανός δείκτης εμβρυϊκού στρες και εγκεφαλικής βλάβης

Η ειδική νευρωνική ενολάση (NSE) είναι ένα γλυκολυτικό ένζυμο που βρίσκεται σε νευρωνικά και νευροενδοκρινικά κύτταρα του κεντρικού και του περιφερικού νευρικού συστήματος. Δεδομένου ότι οι νευρώνες είναι πιο ευαίσθητοι στην υποξία από ότι τα γλοιακά κύτταρα, μια ειδική νευρωνική παράμετρος στο αμνιακό υγρό, όπως η ειδική νευρωνική ενολάση, θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για την πρόιμη διάγνωση της εγκεφαλικής βλάβης λόγω υποξίας. Στη μελέτη των Zinsmeyeretal [104] έγινε αξιολόγηση των επιπέδων της ειδικής νευρωνικής ενολάσης στο αμνιακό υγρό φυσιολογικών κυήσεων και κυήσεων υψηλού κινδύνου.

Η διέλευση πρωτεϊνών τόσο εμβρυϊκής προέλευσης, όσο και μητρικής προέλευσης στο αμνιακό υγρό είναι γνωστή [105], όπως και η υψηλή διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού κατά τη διάρκεια όλης της εμβρυϊκής περιόδου έως και του πρώτου έτους της ζωής του νεογνού [106]. Δεδομένου ότι τα νεφρά του εμβρύου δεν ωριμάζουν πλήρως μέχρι τη γέννηση, ειδικές πρωτεΐνες νευρωνικής προέλευσης,

οι οποίες απελευθερώνονται από τον εγκέφαλο μετά από τραυματισμό ή βλάβη εκκρίνονται στο αμνιακό υγρό. Παράγοντες υψηλού κινδύνου, οι οποίοι σχετίζονται με την κατάσταση του εμβρύου σε εγκυμοσύνες με σοβαρές επιπλοκές προκαλούν σημαντική αύξηση των επιπέδων της ειδικής νευρωνικής ενολάσης, η ανίχνευση της οποίας αποτελεί δείκτη εγκεφαλικής βλάβης του εμβρύου.

Στις φυσιολογικές κυήσεις που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη [104] διαπιστώθηκαν επίπεδα NSE $1.02 \pm 0,31$ $\mu\text{g/L}$ αμνιακού υγρού (επίπεδα αναφοράς). Ασθένειες της μητέρας όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η υψηλή αρτηριακή πίεση, η πυελονεφρίτιδα, η ηπατίτιδα, η θρόμβωση δεν είχαν επίδραση στην συγκέντρωση της NSE στο αμνιακό υγρό. Σε μια περίπτωση παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων NSE 18 ώρες μετά την τοπική εφαρμογή προσταγλανδίνης για την έναρξη των συσπάσεων της μήτρας, ενώ παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με το έμβρυο και τον τοκετό, όπως η παρουσία μηκωνίου στο αμνιακό υγρό, η περιέλιξη του ομφάλιου λώρου, σοβαρές επιβραδύνσεις του εμβρυϊκού καρδιακού ρυθμού ή συνδυασμός αυτών των καταστάσεων φαίνεται να οδηγούν σε σημαντική αύξηση των τιμών της NSE πάνω των φυσιολογικών ορίων. Μια ασθενής με Rh-ισοανοσοποίηση παρουσίασε φυσιολογικές τιμές σε τρεις διαφορετικές μετρήσεις. Επίσης, υψηλές τιμές NSE στο αμνιακό υγρό διαπιστώθηκαν σε μια περίπτωση ενός εμβρυϊκού θανάτου προ του τοκετού και σε μια περίπτωση ανεγκεφαλίας. Ωστόσο, δεν διαπιστώθηκε σχέση της συγκέντρωσης της NSE με την ηλικία κύησης, τις συσπάσεις της μήτρας, την ηλικία ή τον αριθμό προηγούμενων κυήσεων της μητέρας, το βάρος γέννησης του νεογνού ή το σκορ Apgar 1' λεπτού.

Κορτικοεκλυτίνη και Ουροκορτίνη Αμνιακού Υγρού Δευτέρου Τριμήνου σε σχέση με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και το στρες κατά την εγκυμοσύνη

Το 2017 διεξήχθη μια μελέτη από τους La Marca-Ghaemmaghami et al. [107] στην οποία διερευνήθηκε η προγνωστική αξία των επιπέδων κορτικοεκλυτίνης (CRH) και ουροκορτίνης (UCN) από δείγματα αμνιακού υγρού εγκύων δευτέρου τριμήνου σε σχέση με την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την έκβαση της εγκυμοσύνης. Επιπλέον, εξετάστηκε η σχέση της απόκρισης σε οξύ ή χρόνιο ψυχοβιολογικό στρες με τα επίπεδα CRH και UCN του αμνιακού υγρού. Να σημειωθεί ότι οι CRH και UCN στο αμνιακό υγρό είναι εμβryo-πλακουντιακής προέλευσης [108] και τα επίπεδα τους μπορούν να προσδιοριστούν κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης από δείγματα αμνιακού υγρού που λαμβάνονται με αμνιοπαρακέντηση.

Η CRH εκκρίνεται από τον υποθάλαμο ως απόκριση σε καταστάσεις στρες. Κατά την εγκυμοσύνη, ο πλακούντας παράγει CRH, η οποία εκκρίνεται στην μητρική κυκλοφορία, προκαλώντας αύξηση των επιπέδων στο μητρικό πλάσμα περί την 16η εβδομάδα κύησης, με επιτάχυνση του ρυθμού μεταξύ 24ης και 30ης εβδομάδας κύησης. Η πλακουντιακή CRH φτάνει στη μητρική υπόφυση και διεγείρει την παραγωγή αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) και κορτιζόλης. Η κορτιζόλη, με τη σειρά της, διεγείρει την έκκριση CRH του πλακούντα, δράση η οποία είναι αντίθετη με την ανασταλτική επίδραση που έχει στην υποθαλαμική CRH [109]. Αυτή η κυκλική διαδικασία συμβάλλει στη γνωστή θετική ανατροφοδότηση του άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη.

Ο πλακούντας απελευθερώνει μικρές ποσότητες CRH στην κυκλοφορία του εμβρύου, ενώ τα επίπεδά της στο εμβρυϊκό πλάσμα και το αμνιακό υγρό είναι μετρήσιμα μεταξύ της 15ης και 17ης εβδομάδας της κύησης [110]. Τα επίπεδα της CRH στο έμβρυο είναι χαμηλότερα και συσχετίζονται μετρίως με τα επίπεδα της μητέρας [111]. Μέχρι σήμερα μελέτες έχουν δώσει αντιφατικά ευρήματα σχετικά με το αν οι συγκεντρώσεις του εμβρύου αυξάνονται με την πρόοδο της κύησης. Αν και κάποιες από αυτές δεν έχουν διαπιστώσει σημαντική σχέση μεταξύ της ηλικίας κύησης και της CRH του εμβρυϊκού πλάσματος κατά το δεύτερο μισό της κύησης [112] ή μεταξύ της ηλικίας κύησης και της αμνιακής CRH στο τρίτο τρίμηνο [113], άλλες έχουν αναφέρει σημαντική αύξηση της αμνιακής CRH από το δεύτερο τρίμηνο έως τη γέννηση [114]. Συνολικά, εκτιμάται ότι τα επίπεδα CRH του εμβρύου αυξάνονται κατά τη διάρκεια της κύησης [115], αλλά πιθανώς με βραδύτερο ρυθμό από τα επίπεδα της μητέρας. Η πλακουντιακή CRH διεγείρει τον εμβρυϊκό άξονα HPA, την έκκριση κορτιζόλης εμβρύου, την ωρίμανση και την ανάπτυξη οργάνων. Παρόλα αυτά, οι αυξημένες συγκεντρώσεις φαίνεται να συνδέονται με περιορισμό της ανάπτυξης [116].

Επιπλέον, η CRH του πλακούντα μπορεί να δώσει στοιχεία και για τον χρόνο του τοκετού. Για παράδειγμα, οι μητρικές συγκεντρώσεις CRH κατά τη διάρκεια του δεύτερου τριμήνου μπορούν να προβλέψουν πιθανή προωρότητα ή καθυστέρηση του τοκετού [117]. Ωστόσο, οι Gangestadetal. [118], στη μελέτη τους το 2012, υποστήριξαν ότι οι αυξημένες συγκεντρώσεις CRH στο αμνιακό υγρό, αντί να προκαλούν περιορισμό της ανάπτυξης ή πρόωρο τοκετό, αντανakλούν στην ουσία την απόκριση του πλακούντα σε δυσμενείς ενδομήτριες καταστάσεις για την ενίσχυση της ροής των θρεπτικών ουσιών στο έμβρυο και την επιτάχυνση της

ανάπτυξης. Εάν αυτές οι αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις δεν μπορούν πλέον να ικανοποιηθούν, ενεργοποιείται η έναρξη του τοκετού.

Η ουροκορτίνη (UCN) έχει βιολογική ομολογία με την CRH και συνδέεται με CRH υποδοχείς και την δεσμευτική πρωτεΐνη της CRH (CRH-BP) [119]. Τα νευρωνικά κυκλώματα CRH και UCN αλληλοσυνδέονται και η UCN φαίνεται να παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην προσαρμογή σε συνθήκες στρες [120]. Η UCN εκφράζεται σε ποικίλους αναπαραγωγικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του πλακούντα [119], αλλά έχει δοθεί μικρή έμφαση σε αυτή στην έρευνα για τις επιπτώσεις του στρες κατά την κύηση.

Στη μελέτη των PearlLaMarca-Ghaemmaghami[107] διαπιστώθηκε μια αρνητική σχέση μεταξύ των επιπέδων CRH του αμνιακού υγρού και του βάρους του εμβρύου κατά την αμνιοπαρακέντηση. Αντίστοιχα, διαπιστώθηκε μια θετική σχέση μεταξύ CRH και της αύξησης του βάρους του εμβρύου ως τη γέννηση. Αντιθέτως, δεν διαπιστώθηκε σημαντική σχέση μεταξύ των τιμών CRH και UCN στο αμνιακό υγρό και τα αποτελέσματα έκβασης της εγκυμοσύνης (πχ. βάρος γέννησης, ηλικία κυήσεως κατά την έναρξη του τοκετού, σωματομετρικά μεγέθη κατά τη γέννηση). Επιπλέον, τα ευρήματα της εν λόγω μελέτης ήρθαν σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [121] αναφορικά με τη σχέση μεταξύ μητρικού στρες κατά την εγκυμοσύνη και τα επίπεδα κορτιζόλης στο αμνιακό υγρό, όπου δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική σχέση. Επίσης, επιβεβαιώθηκε ότι η ενεργοποίηση του HPA άξονα της μητέρας δεν οδηγεί σε σημαντικές αυξήσεις στις συγκεντρώσεις CRH και UCN του αμνιακού υγρού, οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, είναι κυρίως εμβryo-πλακουντιακής προέλευσης. Οι προστατευτικοί βιολογικοί μηχανισμοί στον ανθρώπινο πλακούντα, όπως η CRH-BP και το ένζυμο 11β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση τύπου 2 (11β-HSD2) πιθανώς εξηγούν αυτά τα ευρήματα. Και οι δύο προλαμβάνουν τις δράσεις της CRH, είτε άμεσα, όπως στην περίπτωση της CRH-BP ή έμμεσα, όπως στην περίπτωση της 11β-HSD2. Έχει αποδειχθεί ότι η βιολογικά ενεργή κορτιζόλη της μητέρας μπορεί να περάσει τον πλακούντα, με αποτέλεσμα να έχει διεγερτικό αποτέλεσμα στην έκκριση CRH [122]. Ωστόσο, στη συγκυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα - το σημείο της μητρικής εμβρυϊκής ανταλλαγής - η 11β-HSD2 απενεργοποιεί ένα μεγάλο ποσοστό μητρικής κορτιζόλης στον αδρανή μεταβολίτη της, την κορτιζόνη. Αντίστοιχα, το ένζυμο 11β-HSD2 του πλακούντα μπορεί, έμμεσα επίσης, να αναστέλλει την διέγερση έκκρισης

CRH του πλακούντα όταν υψηλά επίπεδα μητρικής κορτιζόλης εισέρχονται στον πλακούντα μετά από οξύ στρες.

Μελέτες τρωκτικών δείχνουν ότι το οξύ μητρικό στρες προκαλεί άμεση αύξηση της δραστηριότητας της πλακουντιακής 11β-HSD2 κατά 160% [123]. Ωστόσο, η έκθεση σε χρόνια στρες οδηγεί σε βλάβη αυτού του προστατευτικού μηχανισμού. Οι περισσότερες μελέτες που εξετάζουν συσχετίσεις μεταξύ μητρικού χρόνιου στρες και πλακουντιακής CRH, μέτρησαν αυτό το πεπτίδιο στο μητρικό αίμα και ανέφεραν ασυνέπεια μεταξύ των ευρημάτων [124], [125], [126]. Οι λίγες μελέτες που αξιολόγησαν τα επίπεδα της CRH του αμνιακού υγρού [127], [108] ή τα επίπεδα της UCN [108] δεν περιλάμβαναν ως μεταβλητή το ψυχολογικό στρες. Η τρέχουσα μελέτη, επομένως, συνέβαλε στην επιβεβαίωση της θεωρητικής υπόθεσης και των στοιχείων από προηγούμενες έρευνες [124], [125], [126] ότι το μητρικό άγχος σε χρόνια βάση οδηγεί σε μη φυσιολογικές αυξήσεις στην έκκριση της εμβρυϊκής-πλακουντιακής CRH. Η χρόνια αυξημένη κορτιζόλη της μητέρας θεωρείται ότι είναι ένας αιτιολογικός παράγοντας σε αυτό το μονοπάτι. Παρ' όλα αυτά, και άλλοι μηχανισμοί, όπως η αύξηση των συγκεντρώσεων νορπινεφρίνης και επινεφρίνης στη μητέρα, οι οποίοι έχουν βρεθεί ότι διεγείρουν την απελευθέρωση CRH από τον πλακούντα *in vitro* [128] ή μεταβολές που προκαλούνται από το στρες στο μητρικό ανοσοποιητικό σύστημα, στη ροή του μητρικού αίματος στον πλακούντα ή στην παροχή οξυγόνου μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην διέγερση της υπερέκκρισης CRH από τον πλακούντα.

Το αποτέλεσμα μιας αρνητικής συσχέτισης μεταξύ CRH, βάρους και μεγέθους εμβρύου κατά την αμνιοπαρακέντηση είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα των Goland et al. [129] και Wadhwa et al [130]. Και οι δύο διαπίστωσαν ότι τα υψηλότερα επίπεδα CRH στο αίμα της μητέρας ή του ομφάλιου λώρου συνδέονται με περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου. Ωστόσο, τα αυξημένα επίπεδα CRH δεν φαίνεται να προκαλούν αυτά καθ' αυτά περιορισμό της ανάπτυξης του εμβρύου, αλλά αντίθετα, ο περιορισμός της ανάπτυξης φαίνεται να αντικατοπτρίζει εχθρικές ενδομήτριες συνθήκες στις οποίες ο πλακούντας ανταποκρίνεται με μεγαλύτερη έκκριση CRH προκειμένου να επιταχυνθεί η ανάπτυξη του εμβρύου και να εξασφαλιστεί η επιβίωση [118]. Αξιοσημείωτα παραδείγματα τέτοιων αποκρίσεων έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες με έγκυες γυναίκες, οι οποίες αφού εκτέθηκαν σε παρατεταμένη περίοδο χωρίς πρόσληψη τροφής, άνω των 13 ωρών, εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα CRH στο πλάσμα σε σύγκριση με τις μη εκτεθειμένες έγκυες

γυναίκες [131]. Έχει ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι στους ανθρώπους, η CRH του πλακούντα ρυθμίζει πολύπλοκα την έκφραση των πρωτεϊνών του μεταφορέα γλυκόζης και επομένως τη διαθεσιμότητα γλυκόζης για την ανάπτυξη του εμβρύου [132]. Το εύρημα για μια θετική συσχέτιση μεταξύ CRH δεύτερου τριμήνου και ανάπτυξης του εμβρύου είναι σύμφωνο με αυτές τις παρατηρήσεις και εμπλουτίζει την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει την προγνωστική αξία των επιπέδων CRH και UCN στο αμνιακό υγρό κύησης δεύτερου τριμήνου αναφορικά με τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τον πρόωρο τοκετό. Η CRH αμνιακού υγρού δεύτερου τριμήνου και η UCN ενδέχεται να μην δίνουν προς το παρόν αξιόπιστα αποτελέσματα σχετικά με το χρόνο γέννησης.

Αν και η CRH και η UCN έχουν παρόμοια δομή, παίζουν διαφορετικούς ρόλους και ασκούν τις ενέργειές τους μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Για παράδειγμα, οι συγκεντρώσεις CRH πλακουντιακής προέλευσης αυξάνονται με την πρόοδο της κύησης, ενώ τα επίπεδα της UCN φαίνεται να παραμένουν σταθερά [119]. Επιπλέον, η CRH έχει φλεγμονώδεις ιδιότητες και η UCN αντιφλεγμονώδεις [108].

Συνοπτικά, οι στατιστικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι η απόκριση στο οξύ ψυχοβιολογικό στρες της μητέρας δεν σχετίζεται με τα πεπτίδια του αμνιακού υγρού, ενώ το χρόνιο στρες της μητέρας και η αμνιακή CRH συσχετίστηκαν θετικά. Τα ευρήματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι το χρόνιο, αλλά όχι οξύ στρες της μητέρας μπορεί να επηρεάσει την έκκριση CRH από τον εμβρυϊκό πλακούντα και ότι η CRH εμπλέκεται πολύπλοκα σε διαδικασίες ανάπτυξης του εμβρύου, όπως είχε προηγουμένως αποδειχθεί μόνο σε ζώα. Επιπλέον, η αμνιακή CRH συσχετίστηκε αρνητικά με το μέγεθος του εμβρύου κατά την αμνιοπαρακέντηση και θετικά με την αύξηση του μεγέθους από την αμνιοπαρακέντηση έως τη γέννηση [107].

Μεταβολικό προφίλ αμνιακού υγρού, αίματος ομφάλιου λώρου και μητρικού αίματος σε φυσιολογική εγκυμοσύνη και στον διαβήτη της κύησης σε επαναλαμβανόμενες περιόδους νηστείας

Η νηστεία για μεγάλα χρονικά διαστήματα στην εγκυμοσύνη έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη υπογλυκαιμίας, αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων, κετονοσωμάτων και υποαλανιναιμίας [133]. Αυτά μπορούν να αποτελούν έναν μηχανισμό ταχείας προσαρμογής της μητέρας στον μεταβολισμό των λιπιδίων, έτσι

ώστε η γλυκόζη και τα αμινοξέα να μπορούν να διατεθούν στην ανάπτυξη του εμβρύου [134]. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι κάποια προϊόντα καταβολισμού των λιπιδίων περνάνε μέσω του πλακούντα με απλή διάχυση [135]. Η πηγή αυτών των προϊόντων, τα οποία ανευρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αμνιακό υγρό διαβητικών εγκύων δεν έχει αποσαφηνιστεί, ούτε και αν είναι απολύτως αβλαβή για το έμβρυο ή όχι.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η μελέτη των Saleh A.K. et al [136], στην οποία μελετήθηκε η επίδραση της επιλαμβανόμενης στέρησης τροφής κατά τη διάρκεια του Ραμαζανιού στα ενεργειακά αποθέματα μητέρας και εμβρύου, καθώς και στις ρυθμιστικές ορμόνες, κατά κύριο λόγο στο διαβήτη της κύησης, στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Απώτερος στόχος της μελέτης ήταν να λάβουν σωστές και τεκμηριωμένες οδηγίες οι έγκυες γυναίκες που για θρησκευτικούς λόγους υποβάλλουν τον οργανισμό τους σε περιόδους νηστείας.

Στη μελέτη διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων γλυκερόλης, μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων και β-υδροξυβουτυρικού οξέος στο πλάσμα. Η γλυκερόλη και τα μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα προκύπτουν από την κινητοποίηση των αποθεμάτων του λιπώδους ιστού για την παροχή ενέργειας, διασφαλίζοντας έτσι γλυκόζη για το έμβρυο. Η αύξηση του β-υδροξυβουτυρικού οξέος μπορεί να οφείλεται στη Β οξειδωση των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων. Το τελευταίο εύρημα έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές μελετών που διεξήχθησαν ωστόσο σε άρρενες συμμετέχοντες [137] και σε αρουραίους [138]. Η αλανίνη δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο ως καύσιμο κατά τη διάρκεια της σύντομης περιόδου νηστείας που εφαρμόστηκε στη μελέτη, καθώς τα επίπεδα που ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα τόσο εγκύων σε νηστεία, όσο και εγκύων που δεν νήστεψαν δεν παρουσίαζαν σημαντικές διαφορές.

Τα επίπεδα ινσουλίνης, ωστόσο, ήταν χαμηλότερα σε έγκυες σε νηστεία, πιθανότατα δευτερογενώς λόγω υπογλυκαιμίας. Τα επίπεδα γλυκαγόνης δεν επηρεάζονταν από την νηστεία, το οποίο επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης [139]. Παρά τις διαφορές των ενεργειακών υποστρωμάτων στο μητρικό πλάσμα, οι διαφορές αυτές δεν αντανακλώνται στο αμνιακό υγρό που υποδηλώνει ότι η πηγή τους δεν είναι απευθείας η μητέρα. Η θετική συσχέτιση των επιπέδων β-υδροξυβουτυρικού οξέος στη μητέρα και στο φλεβικό αίμα του ομφάλιου λώρου αφενός και των επιπέδου του στο αρτηριακό αίμα του ομφάλιου λώρου και το αμνιακό υγρό αφετέρου υποδηλώνει ότι αυτό το ενεργειακό υπόστρωμα περνά

αχρησιμοποίητο μέσω του εμβρύου στο αμνιακό υγρό. Ωστόσο, ο ανθρώπινος εμβρυϊκός εγκέφαλος μπορεί να χρησιμοποιήσει το β-υδροξυβουτυρικό οξύ [140] για τη σύνθεση βασικών εγκεφαλικών λιπιδίων [141] όταν μειώνεται η παροχή γλυκόζης [142]. Το ίδιο βέβαια δεν φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση της γλυκερόλης και των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων που ήταν χαμηλότερα στο αρτηριακό αίμα από ότι στο φλεβικό αίμα του ομφάλιου λώρου. Αυτό υποδηλώνει ότι το έμβρυο ενδεχομένως να χρησιμοποιεί αυτά τα δύο καύσιμα. Τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο φλεβικό αίμα του ομφάλιου λώρου σε έγκυες με διαβήτη της κύησης ήταν χαμηλότερα από εκείνα των φυσιολογικών κύησεων, πιθανότατα λόγω βραδύτερης μεταφοράς αυτού του υποστρώματος στον πλακούντα με αποτέλεσμα να διατηρείται ελαφρώς υψηλότερο στο μητρικό πλάσμα. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι μια έγκυος γυναίκα στο τρίτο τρίμηνο θα πρέπει να αποφεύγει τη νηστεία για μεγάλα χρονικά διαστήματα, είτε για θρησκευτικούς λόγους, είτε για προγραμματισμένη καισαρική τομή, ειδικά εάν είναι διαβητική [136].

Μεταβολομική ανάλυση αμνιακού υγρού σε έμβρυα με αυξημένη αυχενική διαφάνεια

Η εμβρυϊκή αυχενική διαφάνεια αντιπροσωπεύει έναν χώρο γεμάτο με υγρό στον αυχένα του εμβρύου μεταξύ του δέρματος και του μαλακού ιστού στο επίπεδο της ΑΜΣΣ όπως απεικονίζεται στην υπερηχογραφική εξέταση [143]. Κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, η αυχενική διαφάνεια στα φυσιολογικά έμβρυα αυξάνεται με το μήκος της κεφαλο-ουριαίας διαμέτρου του εμβρύου. Στην προγεννητική διάγνωση, η αυξημένη αυχενική διαφάνεια είναι ένας από τους πιο ευαίσθητους και ειδικούς δείκτες [144], [145] για γενετικά σύνδρομα, συγγενείς λοιμώξεις, άλλες δυσπλασίες, συμπεριλαμβανομένων συγγενών καρδιακών δυσπλασιών ή καθυστερημένη ανάπτυξη του λεμφικού συστήματος, δομικά ελαττώματα και βιομετρικές αποκλίσεις. Ωστόσο, η αυξημένη αυχενική διαφάνεια δεν είναι εγγενώς παθολογική, καθώς εντοπίζεται και στο 5% των υγιών εμβρύων. Η μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού, είναι ένα νέο πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την αξιολόγηση διαφόρων μεταβολικών σε βιολογικούς οργανισμούς, ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες. Η μελέτη των Iuculanoetal [146] διερεύνησε το μεταβολομικό προφίλ των δειγμάτων αμνιακού υγρού εμβρύων με αυξημένη αυχενική διαφάνεια, σε σύγκριση με μια ομάδα ελέγχου, με σκοπό να συλλέξουν περισσότερες πληροφορίες για τους υποκείμενους μηχανισμούς, οι οποίοι

θα μπορούσαν να προκαλέσουν αυτή την κατάσταση, όταν άλλες αιτίες δεν είναι προφανείς. Διαπιστώθηκε ότι τα έμβρυα με αυξημένη αυχενική διαφάνεια παρουσίαζαν τροποποιημένες μεταβολικές οδούς με ενεργειακή "στροφή" προς την γλυκολυτική οδό (μεταβολισμός αλανίνης, ασπαρτικού οξέος και γλουταμικού οξέος, μεταβολισμός αζωτούχων ενώσεων, αργινίνης και προλίνης, γλυκόλυση και γλυκονεογένεση και μεταβολισμός πυρουβικού οξέος) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Διαπιστώθηκε επίσης μείωση των επιπέδων γλουταμίνης και ηλεκτρικής αφυδρογονάσης, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετές μιτοχονδριακές ενεργειακές διαδικασίες που φαίνεται να εκτελούνται με βραδύτερους ρυθμούς στα έμβρυα με αυξημένη αυχενική διαφάνεια. Η γλουταμίνη είναι το πιο άφθονο ελεύθερο αμινοξύ στο ανθρώπινο σώμα και δρα ως δότης αζώτου για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων πουρίνης και πυριμιδίνης για νέο DNA, επιδιόρθωση mRNA, σύνθεση αμινοξέων, καρβαμυλοφωσφορικό, αμινο σάκχαρα και άλλους μεταβολίτες [147]. Η γλουταμίνη είναι ένα σημαντικό μιτοχονδριακό υπόστρωμα που εμπλέκεται στην προστασία των κυττάρων από οξειδωτικό τραυματισμό [148].

Παράλληλα, στην ομάδα των εμβρύων με την αυξημένη αυχενική διαφάνεια διαπιστώθηκε μείωση σε αρκετά αντιοξειδωτικά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη, μείωση στα επίπεδα γλυκόζης και αύξηση στα επίπεδα γαλακτικού οξέος. Η αύξηση του γαλακτικού οξέος και η μείωση των αντιοξειδωτικών μορίων που βρέθηκαν στο αμνιακό υγρό των εμβρύων με αυξημένη αυχενική διαφάνεια υποδηλώνουν ένα περιβάλλον με οξειδωτικό στρες. Από την άλλη μεριά, η γλουταθειονίνη και το ασκορβικό οξύ είναι απαραίτητα για την εξουδετέρωση των αντιδραστικών οξειδωτικών μορίων. Το οξειδωτικό στρες έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας στις διαταραχές που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη στον άνθρωπο και παίζει βασικό ρόλο στην παθοφυσιολογία των διαταραχών που σχετίζονται με τον πλακούντα [149].

Τέλος, χαμηλά επίπεδα κρεατινίνης βρέθηκαν στο αμνιακό υγρό της ομάδας με αυξημένη αυχενική διαφάνεια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής εγκυμοσύνης, τα επίπεδα κρεατινίνης στα ούρα του εμβρύου αυξάνονται, όπως έχει ήδη αναφερθεί από τους Orczyk-Pawilowicz et al [3]. Μια πιθανή υπόθεση θα μπορούσε να είναι μια καθυστέρηση στην ωρίμανση του συστήματος απέκκρισης στα έμβρυα με αυξημένη αυχενική διαφάνεια, απαιτούνται ωστόσο και άλλες στοχευμένες μελέτες για την αποσαφήνιση αυτού του φαινομένου.

Συμπεράσματα

Το αμνιακό υγρό περιέχει υδατάνθρακες, λιπίδια και φωσφολιπίδια, ουρία και πρωτεΐνες, τα οποία διαμορφώνουν το μεταβολικό του προφίλ και αντανακλούν την κατάσταση της υγείας εμβρύου και μητέρας. Οι αλλαγές στα μεταβολικά πρότυπα του αμνιακού υγρού σχετίζονται με παθοφυσιολογικά περιστατικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Σε αυτήν την ανασκόπηση, παρείχαμε μια περίληψη της έρευνας που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια σχετικά με τη μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού, τους φυσιολογικούς μεταβολικούς δείκτες της ανάπτυξης του εμβρύου και τη χρησιμότητα κάποιων άλλων μεταβολικών δεικτών του αμνιακού υγρού στη παθολογικών καταστάσεων και στην εκτίμηση της πιθανότητας ενός πρόωρου τοκετού.

Από τα αποτελέσματα των μελετών προέκυψε ότι στις φυσιολογικές κύσεις η μεταβολομική ανάλυση έδειξε στο τρίτο τρίμηνο ελαφρά μείωση των επιπέδων γλυκόζης, αλβουμίνης και ολικών πρωτεϊνών ενώ τα επίπεδα χολίνης και αλκαλικής φωσφατάσης σημείωσαν αύξηση. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε στο γεγονός ότι οι ρυθμοί εμβρυϊκής ανάπτυξης σε αυτό το στάδιο της εγκυμοσύνης σημείωσαν επίσης αύξηση. Κατά το ίδιο στάδιο μάλιστα, διαπιστώθηκε αύξηση και στα επίπεδα κρεατινίνης και ουρικού οξέος. Αυτό συνέβη διότι ωρίμασαν οι νεφροί του εμβρύου. Παράλληλα, οι μετρήσεις της χολερυθρίνης μετά την 36^η εβδομάδα της κύησης είναι χρήσιμες για την ανίχνευση αιμόλυσης, όπως σε περίπτωση Rh ευαισθητοποίησης. Χρήσιμος είναι επίσης και ο λόγος λεκιθίνης/σφιγγομυελίνης (L/S) για την εκτίμηση της ωριμότητας του εμβρυϊκού πνεύμονα.

Όσον αφορά τις μελέτες μεταβολομικής ανάλυσης του αμνιακού υγρού εμβρύων με σύνδρομο Down, τα ευρήματα είναι σημαντικά. Διαπιστώθηκε ότι η μεταβολική εκτροπή έχει συνδυαστεί με την εκτροπή γονιδιακής έκφρασης στο χρωμόσωμα 21 των εμβρύων, ιδιαίτερα σε σχέση με την νοητική υστέρηση και την ανώμαλη ερυθροποίηση. Επιπλέον, όσα έμβρυα είχαν κατά τη σχετική εξέταση αυξημένη αυχενική διαφάνεια, εμφάνιζαν τροποποιημένες μεταβολικές οδούς με ενεργειακή «στροφή» προς την γλυκολυτική οδό. Για παράδειγμα, μεταβολισμός αλανίνης, ασπαρτικού οξέος και γλουταμικού οξέος, μεταβολισμό αζωτούχων ενώσεων, αργινίνης και προλίνης, γλυκόλυση και γλυκονεογένεση και μεταβολισμός πυρουβικού οξέος. Παράλληλα, σε αυτά τα έμβρυα παρατηρήθηκε μείωση σε αρκετά αντιοξειδωτικά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειονίνη, μείωση στα

επίπεδα γλυκόζης και αύξηση στα επίπεδα γαλακτικού οξέος. Τέλος, σε μια περιπτωσιολογική μελέτη με βάση τη μεταβολομική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι η σοβαρά επηρεασμένη εμβρυϊκή ανάπτυξη συνεπάγεται αυξημένη παραγωγή εγκεφαλικού νευροτροφικού παράγοντα, η οποία αποδόθηκε στους διάφορους προσαρμοστικούς μηχανισμούς.

Η παρούσα ανασκόπηση αποδεικνύει ότι η μεταβολομική ανάλυση του αμνιακού υγρού αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο ερευνητικό εργαλείο για την έγκαιρη αναγνώριση καταστάσεων που θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του εμβρύου και χρήζουν άμεσης παρέμβασης για την εξασφάλιση του βέλτιστου δυνατού αποτελέσματος για την υγεία παιδιού και μητέρας. Μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για να καθορίσουν με ακρίβεια τη διαγνωστική και θεραπευτική συμβολή της μεταβολομικής ανάλυσης του αμνιακού υγρού σε προγεννητικό και περιγεννητικό επίπεδο. Προς το παρόν, η μεταβολομική ανάλυση βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε εργαστηριακές μελέτες, ωστόσο, θα πρέπει να περάσει στο άμεσο μέλλον από τα ερευνητικά εργαστήρια στην κλινική εφαρμογή. Ο χρόνος θα δείξει εάν η αξιοποίηση των μεταβολικών δεικτών εμβρυϊκής ανάπτυξης στην κλινική πράξη και σε ευρεία κλίμακα θα είναι επιτυχής και ωφέλιμη, αλλά αναμφισβήτητα παρουσιάζεται μια πραγματική ευκαιρία για την προληπτική υγειονομική περίθαλψη, τη διάγνωση ασθενειών, την παρακολούθηση των ήδη διαγνωσμένων ασθενειών καθώς και την εύρεση νέων θεραπευτικών εργαλείων σε εξατομικευμένο επίπεδο, που θα αλλάξουν τα δεδομένα στην Περιγεννητική Ιατρική.

Βιβλιογραφία

- [1] J. AnuPriya, «Fetoplacental unit,» *Health & Medicine*, 28 February 2015.
- [2] N. Tabassum και V. Verma, «AN INSIGHT INTO AMNIOTIC FLUID,» *Nova Science Publishers*, January 2019.
- [3] M. Orczyk-Pawilowicz, E. Jawien, S. Deja, L. Hirnle, A. Zabek και P. Mlynarz, «MetabolomicsofHumanAmnioticFluidandMaternalPlasmaduringNormalPregnancy,» *PMC*, pp. 1-2, 12 April 2016.
- [4] J.-E. A. Michaels, S. Dasari, L. Pereira, A. P. Reddy, J. A. Lapidus, X. Lu, T. Jacob, A. Thomas, M. Rodland, C. T. R. Jr, M. G. Gravett και S. R. Nagalla, «Comprehensive proteomic analysis of the human amniotic fluid proteome: gestational age-dependent changes,» *ACS Publications*, 21 March 2007.
- [5] P. Panugant και R. Boddeti, «Morphology & Morphometric Anatomy of the Placenta,» *Int J Biol Med Res*, 2012.
- [6] J. F. YETTER, «Examination of the Placenta,» *Am Fam Physician*, March 1998.
- [7] Λ. ΜΑΡΓΚΑΡΙΤ, Ο ρόλος της ενδοθηλίνης στο αμνιακό υγρό ως δείκτης παθολογικών καταστάσεων της εγκυμοσύνης, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών, 2012.
- [8] V. Kapila και K. Chaudhry, «Physiology, Placenta,» *StatPearls*, 11 August 2020.
- [9] C. Theofanakis, P. Drakakis, A. Besharat και D. Loutradis, «Human Chorionic Gonadotropin: The Pregnancy Hormone and More,» *Int J Mol Sci*, May 2017.
- [10] J. Robbins και A. Bakardjiev, « Pathogens and the placental fortress,» *Curr Opin Microbiol.*, February 2012.
- [11] K. Aasa, B. Zavan, R. Luna, P. Wong και e. al, «Placental growth factor influences maternal cardiovascular adaptation to pregnancy in mice,» *Biol Reprod*, 2015.
- [12] Collins, Λεξικό Βιολογίας, Αθήνα: Εκδόσεις Ι. Φλώρος .
- [13] P. Florio και e. al, «Human placenta, chorion, amnion and decidua express different variants of corticotropin-releasing factor receptor messenger RNA.,» *Placenta*, 2000.
- [14] E. D. Fitzsimmons και T. Bajaj, «Embryology, Amniotic Fluid,» *StatPearls*, 1 July 2020.

- [15] J. Suliburska, R. Kocylowski, I. Komorowicz, M. Grzesiak, P. Bogdański και D. Baralkiewicz, «Concentrations of Mineral in Amniotic Fluid and Their Relations to Selected Maternal and Fetal Parameters,» *Biol Trace Elem Res*, 2016.
- [16] H. Pande, «Comparative structural studies of human plasma and amniotic fluid fibronectins,» *Biochem Biophys Res Commun*, 1981.
- [17] G. Graça, «Mid-infrared (MIR) metabolic fingerprinting of amniotic fluid: A possible avenue for early diagnosis of prenatal disorders?,» *Analytica chimica acta*, pp. 24-31, February 2013.
- [18] V. Fanos, L. Atzori, K. Makarenko, G. B. Melis και E. Ferrazzi, «Metabolomics application in maternal-fetal medicine,» *Biomed Res Int.*, 2013.
- [19] R. Menon, J. Jones, P. R. Gunst, M. Kacerovsky, S. J. Fortunato, G. R. Saade και S. Basraon, «Amniotic Fluid Metabolomic Analysis in Spontaneous Preterm Birth,» *SAGE*, 2014.
- [20] V. Tambor, M. Kacerovsky, J. Lenco, G. Bhat και R. Menon, «Proteomics and bioinformatics analysis reveal underlying pathways of infection associated histologic chorioamnionitis in pPROM,» *Placenta*, 2013.
- [21] S. Gracie, C. Pennell, G. Ekman-Ordeberg, S. Lye, J. McManaman, S. Williams, L. Palmer, M. Kelley, R. Menon και M. Gravett, «An integrated systems biology approach to the study of preterm birth using “-omic” technology—a guideline for research,» *BMC Pregnancy*, 2011.
- [22] A. Krastanov, «Metabolomics - the state of art,» *Biotechnol & Biotechnol Eq.*, pp. 1537-1543, 2010.
- [23] Davis's Lab & Diagnostic Tests, «Amniotic Fluid Analysis and L/S Ratio,» [Ηλεκτρονικό]. Available: https://nursing.unboundmedicine.com/nursingcentral/view/Davis-Lab-and-Diagnostic-Tests/425088/7.2/Amniotic_Fluid_Analysis_and_L_S_Ratio.
- [24] The Metabolomics Innovation Centre, «The Human Metabolome Database (HMDB),» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://hmdb.ca/>.
- [25] E. Herrera, R. Knopp και N. Freinkel, «Carbohydrate metabolism in pregnancy,» *The Journal of Clinical Investigation*, p. 2260–2272, December 1969.
- [26] F. Sun, C. Dai, J. Xie και X. Hu, «Biochemical Issues in Estimation of Cytosolic

- Free NAD/NADH Ratio,» *PLoS One*, pp. 1-10, 2012.
- [27] S. H. Zeisel, «Choline: Critical Role During Fetal Development and Dietary,» *Annual Review of Nutrition*, pp. 229-250, 2006.
- [28] F. Oliveira, E. Barros και J. Magalhães, «Biochemical profile of amniotic fluid for the assessment of fetal and renal development,» *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, pp. 215-222, 2002.
- [29] R. Pitkin και S. Zwirek, «Amniotic fluid creatinine,» *Amer. J. Obst. & Gynec.*, 1967.
- [30] W. Begnaud, T. Hawes, A. Michal και M. Samuels, «Amniotic fluid creatinine for prediction of foetal maturity,» *Obstet. & Gynec.*, 1969.
- [31] J. O'Leary και A. Bejzian, «Amniotic fluid maturity score,» *Obst. & Gynec.*, 1971.
- [32] A. Imbard, H. Blom, D. Schlemmer, R. Barto, I. Czerkiewicz, O. Rigal, F. Muller και J. Benoist, «Methylation metabolites in amniotic fluid depend on gestational age,» *Prenatal Diagnosis*, pp. 848-855, 2013.
- [33] D. Enlander, «Amniotic Fluid Indicators of Fetal Maturity,» *Obstetrics & Gynecology*, October 1972.
- [34] X.-L. Tong, L. Wang, T.-B. Gao, Y.-G. Qin, Y.-Q. Qi και Y.-P. Xu, «Potential Function of Amniotic Fluid in Fetal Development—Novel Insights by Comparing the Composition of Human Amniotic Fluid with Umbilical Cord and Maternal Serum at Mid and Late Gestation,» *J Chin Med Assoc*, pp. 368-373, 2009.
- [35] P. Burdett, J. Lizana, P. Eneroth και K. Bremme, «Proteins of human amniotic fluid. II. Mapping by two-dimensional electrophoresis,» *Clin Chem*, 1982.
- [36] F. Bloomfield, B. Breier και J. Harding, «Fate of (125)I-IGF-I administered into the amniotic fluid of late-gestation fetal sheep,» *Pediatr Res*, 2002.
- [37] C. Cho, S. Shan, E. Winsor και E. Diamandis, «Proteomics analysis of human amniotic fluid,» *Mol Cell Proteomics*, 2007.
- [38] B. Mandelbaum, G. LaCroix και M. Robinson, «Determination of foetal maturity by spectrophotometric analysis of amniotic fluid,» *Obst. & Gynec.*, 1967.
- [39] L. Gluck, M. Kulovich, R. Borer, P. Brenner, G. Anderson και W. Spellacy, «Diagnosis of respiratory distress Syndrome by amniocentesis,» *Amer. J. Obst.*

&Gynec., 1971.

- [40] L. Dunn και A. Bhatnagar, «Use of lecithin/sphingomyelin ratio in the management of problem obstetric patient,» *Amer. J. Obst. & Gynec.*, 1973.
- [41] J. Clements, A. Platzker, D. Tierney, C. Hobel, R. Creasy, A. Margolis, D. Thibeault, W. Tooley και W. Oh, «Assessment of the risk of respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid,» *N. Engl. J. Med.*, 1972.
- [42] G. Nelson και D. Freedman, «Relationship between amniotic fluid triglyceride levels and foetal maturity,» *Amer. J. Obst. & Gynec.*, 1971.
- [43] d. A. Fernandes, M. UsateguiGomez και W. Spellacy, «Amnioticfluidamylase,» *Amer. J. Obst. & Gynec.*, 1973.
- [44] A. Moltz, W. Pomerance και R. Wechsler, «Multiple amniotic fluid assays to predict the spontaneous onset of labour,» *Obst. & Gynec.*, 1972.
- [45] R. Menon, M. R. Torloni και C. Voltolini, «Biomarkers of spontaneous preterm birth: an overview of the literature in the last four decades,» *Reproductive Sciences*, pp. 1046-1070, 2011.
- [46] Conde-Agudelo, A. Papageorghiou, S. Kennedy και J. Villar, «Novel biomarkers for the prediction of the spontaneous pretermbirth phenotype: a systematic review and meta-analysis,» *BJOG An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, March 2011.
- [47] R. Goldenberg, J. Culhane, J. Iams και R. Romero, «Epidemiology and causes of preterm birth,» *The Lancet*, 05 January 2008.
- [48] R. Romero, J. Espinoza, L. F. Gonçalves, J. P. Kusanovic, L. Friel και S. Hassan, «The role of inflammation and infection in preterm birth,» *Clin Perinatol*, 2011.
- [49] E. Johnsrud, S. Koukouritaki, K. Divakaran, L. Brunengraber, R. Hines και D. McCarver, «Human hepatic CYP2E1 expression during development,» *J Pharmacol Exp Ther*, 2003.
- [50] J. Hukkanen, M. Mantyla, L. Kangas και e. al, «Expression of cytochrome P450 genes encoding enzymes active in the metabolism of tamoxifen in human uterine endometrium,» *Pharmacol Toxicol*, 1998.
- [51] R. Tuckey, «Progesterone synthesis by the human placenta,» *Placenta*, 2005.
- [52] J. Hamzelou, «Placenta's alarm clock signals when it's time for birth to begin,»

NewScientist, 12 September 2016.

- [53] B. Pathak, L. Sheibani και L. RH, «Cholestasis of pregnancy,» *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2010.
- [54] T. R. T. V. F. S. M. R. Dunlop AL, «Maternal micronutrient status and preterm versus term birth for black and white US women,» *Reprod Sci.*, 2012.
- [55] K. C. Mozurkewich EL, «Omega-3 fatty acids and pregnancy: current implications for practice,» *Curr Opin Obstet Gynecol.*, 2012.
- [56] C. Virgiliou, H. G. Gika, M. Witting, A. A. Bletsou, A. Athanasiadis, M. Zafarakas, N. S. Thomaidis, N. Raikos, G. Makrydimas και G. A. Theodoridis, «Amniotic fluid and maternal serum metabolic signatures in the 2nd trimester associated with pre-term delivery,» *J. Proteome Res*, 2017.
- [57] T. Vrijkotte, N. Krukziener, B. Hutten, K. Vollebregt, M. V. Eijsden και M. Twickler, «Maternal Lipid Profile During Early Pregnancy and Pregnancy Complications and Outcomes: The ABCD Study,» *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012.
- [58] R. Romero, S. Mazaki-Tovi, E. Vaisbuch, J. Kusanovic, T. Chaiworapongsa, R. Gomez, J. Nien, B. Yoon, M. Mazor, J. Luo και e. al., «Metabolomics in premature labor: a novel approach to identify patients at risk for preterm delivery,» *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 2010.
- [59] A. Howlett, A. Ohlsson και N. Plakkal, «Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants,» *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012.
- [60] K. Waters, «Serotonin in the sudden infant death syndrome,» *Drug News Perspect*, 2010.
- [61] I. Musilova, C. Andrys, J. Krejsek, M. Drahosova, B. Zednikova, L. Pliskova, H. Zemlickova, B. Jacobsson και M. Kacerovsky, «Amnioticfluidpentraxins: Potentialearlymarkersforidentifyingintra-amnioticinflammatorycomplicationsinpretermpre-laborruptureofmembranes,» *AmericanJournalofReproductiveImmunology*, 2017.
- [62] I. Musilova, C. Andrys, M. Drahosova, O. Soucek, L. Pliskova, M. Stepan, T. Bestvina, J. Maly, B. Jacobsson και M. Kacerovsky, «Amnioticfluidcathepsin-Ginpregnanciescomplicatedbythepretermprelaborruptureofmembranes,» *JMaternFetalNeonatalMed*, 2016.

- [63] B. Korkmaz, M. Horwitz, D. Jenne και F. Gauthier, «Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases,» *Pharmacol Rev*, 2010.
- [64] T. Burster, H. Macmillan και T. Hou, « Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond,» *Mol Immunol*, 2010.
- [65] B. Bottazzi, A. Inforzato, M. Messa και e. al, «The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling,» *J Hepatol*, 2016.
- [66] N. Cox, D. Pilling και R. Gomer, «Serum amyloid P: a systemic regulator of the innate immune response,» *J Leukoc Biol*, 2014.
- [67] K. Daigo, A. Inforzato, I. Barajon και e. al, «Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity,» *Immunol Rev*, 2016.
- [68] E. Magrini, A. Mantovani και C. Garlanda, «The dual complexity of PTX3 in health and disease: a balancing act?,» *Trends Mol Med*, 2016.
- [69] L. Cruciani, R. Romero και E. Vaisbuch, «Pentraxin 3 in maternal circulation: an association with preterm labor and preterm PROM, but not with intra-amniotic infection/inflammation,» *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2010.
- [70] L. Martin, N. Moco, B. Ramos, R. Camargo και M. Silva, «Pentraxin-3 concentration in the amniotic fluid of women at term, in spontaneous preterm labor and when not in labor,» *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014.
- [71] H. Akerud, G. Ronquist και E. Wiberg-Itzel, «Lactate distribution in culture medium of human myometrial biopsies incubated under different conditions,» *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009.
- [72] I. Sterpu, P. Anfelter, S. Wray, H. Kaihola, H. Åkerud και E. Wiberg-Itzel, «The association of second trimester biomarkers in amniotic fluid and fetal outcome,» *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 2018.
- [73] D. BINDERΑ και H. SCHARFMANB, «Brain-derived Neurotrophic Factor,» *PMC*, 9 August 2008.
- [74] N. Antonakopoulos, Z. Iliodromiti, G. Mastorakos, C. Iavazzo, G. Valsamakis, N. Salakos, A. Papageorghiou, A. Margeli, S. Kalantaridou, G. Creatsas, E. Deligeoroglou και N. Vrachnis, «Association between Brain-

- Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in 2nd Trimester Amniotic Fluid and Fetal Development,» *Hindawi - Mediators of Inflammation*, pp. 1-7, 5 December 2018.
- [75] M. Deuschle, F. Hendlmeier και S. Witt, «Cortisol, cortisone, and BDNF in amniotic fluid in the second trimester of pregnancy: effect of early life and current maternal stress and socioeconomic status,» *Development and Psychopathology*, 2018.
- [76] University of Rochester Medical Center, «Health Encyclopedia,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=90&ContentID=P02462>.
- [77] M. Alberry και P. Soothill, «Management of fetal growth restriction,» *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 2007.
- [78] S. Rees και R. Harding, «Brain development during fetal life: influences of the intra-uterine environment,» *Neuroscience*, 2004.
- [79] P. Jones και M. Bennett, «Urine organic acid analysis for inherited metabolic disease using gas chromatography-mass spectrometry,» *Methods Mol Biol*, 2010.
- [80] A. Amorini, C. Giorlandino, S. Longo, S. D'Urso, A. Mesoraca, M. L. Santoro, M. Picardi, S. Gullotta, P. Cignini, D. Lazzarino, G. Lazzarino και B. Tavazzi, «Metabolic profile of amniotic fluid as a biochemical tool to screen for inborn errors of metabolism and fetal anomalies,» *Mol Cell Biochem*, 2012.
- [81] G. Graca, I. Duarte, A. Barros, B. Goodfellow, S. Diaz, I. Carreira, A. Couceiro και E. Galhano, «NMR-based metabolomics of human amniotic fluid for the metabolic characterization of fetus malformations,» *J Proteome Res*, 2009.
- [82] G. Graca, I. Duarte, A. Barros, B. Goodfellow, S. Diaz, J. Pinto, I. Carreira, E. Galhano, C. Pita και A. Gil, «The impact of prenatal disorders on the metabolic profile of 2nd trimester amniotic fluid: a nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomic study,» *J Proteome Res*, 2010.
- [83] J. Huang, J. Mo, G. Zhao, Q. Lin, G. Wei, W. Deng, D. Chen και B. Yu, «Application of the amniotic fluid metabolome to the study of fetal malformations, using Down syndrome as a specific model,» *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 2017.

- [84] G. Graca, B. Goodfellow, A. Barros, S. Diaz, I. Duarte, K. Spagou, K. Veselkov, E. Want, J. Lindon και I. Carreira, «UPLC-MS metabolic profiling of second trimester amniotic fluid and maternal urine and comparison with NMR spectral profiling for the identification of pregnancy disorder biomarkers,» *Mol Biosyst*, 2012.
- [85] F. Bloomfield, P. v. Zijl, M. Bauer και J. Harding, «Effects of intrauterine growth restriction and intraamniotic insulin-like growth factor-I treatment on blood and amniotic fluid concentrations and on fetal gut uptake of amino acids in late-gestation ovine fetuses.,» *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002.
- [86] A. Bednov, J. Espinoza, A. Betancourt, Y. Vedernikov, M. Belfort και C. Yallampalli, «L-arginine prevents hypoxia-induced vasoconstriction in dual-perfused human placental cotyledons,» *Placenta*, 2015.
- [87] C. d. Costa, M. d. Freitas, V. Brazão, C. d. Santos, M. Sala και A. Abrahão, «Does L-arginine availability during the early pregnancy alters the immune response of Trypanosoma cruzi infected and pregnant Wistar rats?,» *Exp Parasitol*, 2014.
- [88] A. Pimentel, N. Pereira, C. Costa, C. Mann, V. Cordeiro, R. d. Moura, T. Brunini, A. Mendes-Ribeiro και A. Resende, «L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress in plasma and platelets of patients with pre-eclampsia,» *Hypertens Res*, 2013.
- [89] E. Kale και A. Kale, «Amniotic fluid amino acid concentrations in fetal skeletal dysplasia,» *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2014.
- [90] D. Dudzik, R. Revello, C. Barbas και J. Bartha, «LC-MS-based metabolomics identification of novel biomarkers of chorioamnionitis and its associated perinatal neurological damage,» *J Proteome Res*, 2015.
- [91] S. Chou, M. Byrska-Bishop, J. Tober, Y. Yao, D. Vandorn, J. Opalinska, J. Mills, J. Choi, N. Speck, P. Gadue και e. al, «Trisomy 21-associated defects in human primitive hematopoiesis revealed through induced pluripotent stem cells,» *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012.
- [92] S. Chou, J. Opalinska, Y. Yao, M. Fernandes, A. Kalota, J. Brooks, J. Choi, A. Gewirtz, G. Danet-Desnoyers, R. Nemiroff και M. Weiss, «Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development,» *Blood*, 2008.

- [93] L. Goth, «A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference,» *Clin Chim Acta*, 1991.
- [94] Y. Fang, S. Yang και G. Wu, «Free radicals, antioxidants and nutrition,» *Nutrition*, 2002.
- [95] F. Henkler, J. Brinkmann και A. Luch, «The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics,» *Cancers (Basel)*, 2010.
- [96] M. Cooke, M. Evans και M. Dizdaroglu, «Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease,» *FASEB J*, 2003.
- [97] J. Ruiz, «Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection,» *J Antimicrob Chemother*, 2003.
- [98] H. Behrman, P. Kodaman και S. Preston, «Oxidative stress and the ovary,» *J Soc Gynecol Investig*, 2001.
- [99] M. Loeken, «Free radicals and birth defects,» *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2004.
- [100] T. Chang, M. H. M, S. Jain και e. al, «Oxidant regulation of gene expression and neuraltube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects,» *Diabetologia*, 2003.
- [101] F. Kapczinski, B. Frey και A. Andreazza, «Increased oxidative stress as a mechanism for decreased BDNF levels in acute manic episodes,» *Rev Bras Psiquiatr*, 2008.
- [102] A. Wu, Z. Ying και F. Gomez-Pinilla, «The interplay between oxidative stress and,» *Eur J Neurosci*, 2004.
- [103] N. Cim, H. E. Tolunay, E. Karaman, B. Boza, M. Bilici, O. C,etin, R. Yıldızhan και H. G. Sahin, «Amniotic fluid oxidant–antioxidant status in foetal congenital nervous system anomalies,» *Journal of International Medical Research*, 2018.
- [104] J. Zinsmeyer, P. Marangos, E. Issel και J. Gross, «Neuron specific enolase in amniotic fluid — a possible indicator for fetal distress and brain implication,» *J. Perinat. Med.*, 1987.
- [105] W. DOBRYSYCKA, «Diagnostic value of biochemical analysis of amniotic fluid,» *Ergeb Exp Med*, 1980.
- [106] A. STATS και K. FELGENHAUER, «Development of the blood-CSF barrier,»

Dev Med Child Neurol, 1983.

- [107] P. L. Marca-Ghaemmaghami, S. Dainese, G. Stalla, M. Haller, R. Zimmermann και U. Ehlert, «Second-Trimester Amniotic Fluid Corticotropin-Releasing Hormone and Urocortin in Relation to Maternal Stress and Fetal Growth in Human Pregnancy,» *The International Journal on the Biology of Stress*, 2017.
- [108] M. Torricelli, C. Voltolini, L. Galleri, G. Biliotti, A. Giovannelli, M. D. Bonis και F. Petraglia, «Amniotic fluid urocortin, CRF, oestriol, dehydroepiandrosterone sulfate and cortisol concentrations at mid-trimester: Putative relationship with preterm delivery,» *European Journal*, 2009.
- [109] D. Frim, R. Emanuel, B. Robinson, C. Smas, G. Adler και J. Majzoub, «Characterization and gestational regulation of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in human placenta,» *J Clin Invest*, 1988.
- [110] R. Gitau, N. Fisk και V. Glover, «Human fetal and maternal corticotrophin releasing hormone responses to acute stress,» *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004.
- [111] R. Smith, J. Smith, X. Shen, P. Engel, M. Bowman, S. McGrath, A. Bisits, P. McElduff, W. Giles και D. Smith, «Patterns of plasma corticotropin-releasing hormone, progesterone, estradiol, and estriol change and the onset of human labor,» *J Clin Endocrinol Metab*, 2009.
- [112] R. Gitau, N. M. Fisk και V. Glover, «Human fetal and maternal corticotrophin releasing hormone responses to acute stress,» *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2004.
- [113] R. Emanuel, B. Robinson, E. Seely, S. Graves, I. Kohane, D. Saltzman και J. Majzoub, «Corticotrophin releasing hormone levels in human plasma and amniotic fluid during gestation,» *Clinical Endocrinology*, 1994.
- [114] T. Laatikainen, I. Räisänen και K. Salminen, «Corticotropin-releasing hormone in amniotic fluid during gestation and labor and in relation to fetal lung maturation,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1988.
- [115] R. Smith, «Parturition,» *New England Journal of Medicine*, 2007.
- [116] P. Wadhwa, T. Garite, M. Porto, L. Glynn, A. Chicz-DeMet, C. Dunkel-Schetter και C. Sandman, «Placental corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: A prospective investigation,»

American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2004.

- [117] M. McLean, A. Bisits, J. Davies, R. Woods, P. Lowry και R. Smith, «A placental clock controlling the length of human pregnancy,» *Nature Medicine*, 1995.
- [118] S. Gangestad, A. C. Hooper και M. Eaton, «On the function of placental corticotropin-releasing hormone: A role in maternal-fetal conflicts over blood glucose concentrations,» *Biological Reviews*, 2012.
- [119] P. Florio, W. Vale και F. Petraglia, «Urocortins in human reproduction.,» *Peptides*, 2004.
- [120] T. Kozicz, «On the role of urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in stress adaptation,» *General and Comparative Endocrinology*, 2007.
- [121] V. Glover, K. Bergman, P. Sarkar και T. O'Connor, «Association between maternal and amniotic fluid cortisol is moderated by maternal anxiety,» *Psychoneuroendocrinology*, 2009.
- [122] B. Robinson, R. Emanuel, D. Frim και J. Majzoub, «Glucocorticoid stimulates expression of corticotropin-releasing hormone gene in human placenta,» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988.
- [123] L. Welberg, K. Thirivikraman και P. Plotsky, «Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity,» *Journal of Endocrinology*, 2005.
- [124] Y. Chen, C. Holzman, H. Chung, P. Senagore, N. Talge και T. S.-K. (2010), «Levels of maternal serum corticotropin-releasing hormone (CRH) at midpregnancy in relation to maternal characteristics,» *Psychoneuroendocrinology*, 2010.
- [125] G. Latendresse και R. Ruiz, «Maternal coping style and perceived adequacy of income predict CRH levels at 14-20 weeks of gestation,» *Biological Research for Nursing*, 1981.
- [126] A. Tse, J. Rich-Edwards, K. Koenen και R. Wright, «Cumulative stress and maternal prenatal corticotropin-releasing hormone in an urban U.S. cohort,» *Psychoneuroendocrinology*, 2012.

- [127] R. Menon, C. Arora, C. Hobel και S. Fortunato, «Corticotrophin-releasing hormone in lipopolysaccharide-stimulated term fetal membranes and amniotic fluid from term and preterm birth in African Americans and Caucasians,» *Reproductive Sciences*, 2008.
- [128] F. Petraglia, S. Sutton και W. Vale, «Neurotransmitters and peptides modulate the release of immunoreactive corticotropin-releasing factor from cultured human placental cells,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1989.
- [129] R. Goland, S. Jozak και I. Conwell, «Placental corticotropin-releasing hormone and the hypercortisolism of pregnancy,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1994.
- [130] P. Wadhwa, T. Garite, M. Porto, L. Glynn, A. Chicz-DeMet, C. Dunkel-Schetter και C. Sandman, «Placental corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: A prospective investigation,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004.
- [131] T. Herrmann, A. Siega-Riz, C. Hobel, C. Auror και C. Dunkel-Schetter, «Prolonged periods without food intake during pregnancy increase risk for elevated maternal corticotropin-releasing hormone concentrations.,» *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2001.
- [132] L. G. e. al, «Differential regulation of glucose transporters mediated by CRH receptor type 1 and type 2 in human placental trophoblasts,» *Endocrinology*, 2012.
- [133] B. Metzger, V. Ravnikar, R. Vileisis και N. Freinkel, «Freinkel: "Accelerated starvation" and the skipped breakfast in late normal pregnancy,» *Lancet*, 1982.
- [134] B. Metzger και N. Freinkel, «Regulation of maternal protein metabolism and gluconeogenesis in the fasted state,» *Academic Press*, 1975.
- [135] P. Paterson, P. Sheath, P. Taft και C. Wood, «Maternal and fetal ketone concentrations in plasma and urine,» *Lancet*, 1967.
- [136] A. K. Saleh, N. Al-Muhtaseb, K. Gumaa, A. Mubarak και M. S. Shaker, «Maternal, Amniotic Fluid and Cord Blood Metabolic Profile in Normal Pregnant and Gestational Diabetics during Recurrent Withholding of Food,» *Thieme Journal*, 1989.
- [137] P. Felig και V. Lynch, «Starvation in human pregnancy: hypoglycaemia,

hypoinsulinaemia and hyperketonaemia,» *Science*, 1970.

- [138] R. Scow, S. Chernick και M. S. Brinley, «Brinley: Hyperlipaemia and ketosis in the pregnant rat,» *Am. J. Physiol*, 1964.
- [139] R. Daniel, B. E. Metzger, N. Freinkel, G. R. Falooner, R. H. Unnger και M. Nitzar, «Carbohydrate metabolism in pregnancy XI: Response of plasma glucagon to overnight fast and oral glucose during nor normal,» *Diabetes*, 1974.
- [140] P. Adam, N. Raiha, E. L. Rahiala και M. Kekomaki, «Oxidation of glucose and B-OH-butyrate by the early human fetal brain,» *Acta Paediatr. Scand.*, 1975.
- [141] M. Patel, C. A. Johnson, R. Rajan και O. E. Owen, «The metabolism ketone bodies in developing human brain: development of ketone body utilizing enzymes and ketone bodies as precursors for lipid synthesis,» *J. Neurochem.*, 1975.
- [142] H. Kraus και B. Stumpf, «Interrelationship of glucose and ketone body metabolism in brain during early infancy. Regulatory role of pyruvate,» *Eds.Stuttgart, Georg Thieme Verlag*, 1978.
- [143] E. Nafziger και A. Joel, «The anatomy of nuchal translucency at 10–14 weeks gestation in fetuses with Trisomy 21: an incredible medical mystery,» *Clin Anat*, 2014.
- [144] T. Shipp και B. Benacerraf, «Second trimester ultrasound screening for chromosomal abnormalities,» *Prenat Diagn* , 2002.
- [145] B. Benacerraf, «The role of the second trimester genetic sonogramin screening for fetal Down syndrome,» *Semin Perinatol*, 2005.
- [146] F. M. C. P. M. L. S. L. T. M. D. A. B. A. E. L. A. a. G. M. Ambra Iuculano, «Metabolic characterization of amniotic fluids of fetuses with enlarged nuchal translucency,» *Journal of Perinatal Medicine*, 2019.
- [147] J. Matés, J. Segura, J. Campos-Sandoval, C. Lobo, L. Alonso και A. FJ, «Glutaminehomeostasisandmitochondrialdynamics,» *IntJBiochemCellBiol*, 2009.
- [148] J. Matés, J. Segura, F. Alonso και J. Márquez, «Pathways from glutamine to apoptosis,» *Front Biosci*, 2006.
- [149] K. Al-Guborya, P. Fowler και C. Garrel, «The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes,» *Int J Biochem*

Cell Biol, 2010.

- [150] G. Graca, I. Duarte, A. Barros, B. Goodfellow, S. Diaz, J. Pinto, I. Carreira, E. Galhano, C. Pita και A. Gil, «Impact of prenatal disorders on the metabolic profile of second trimester amniotic fluid: A nuclear magnetic resonance metabonomic study,» *J Proteome Res*, 2010.
- [151] M. Torricelli, C. Voltolini, L. Galleri, G. Biliotti, A. Giovannelli, M. D. Bonis και e. al, «Amniotic fluidurocortin, CRF, oestriol, dehydroepiandrosteronesulfateandcortisolconcentrationsatmid-trimester: Putativerelationshipwithpretermdelivery,» *EuropeanJournalofObstetrics, GynecologyandReproductiveBiology*, 2009.
- [152] B. E. Metzger και R. V. N. F. V. Ravnikar, «Accelerated starvation and the skipped breakfast in late normal pregnancy.,» *Lancet*, 1982.