

# Μελέτη της πλακουντιακής έκφρασης των ρυθμιστικών γονιδίων καταστάσεων υποξίας (HIF-1a, HIF-2a, HIF-b & PHD-3) σε κνήσεις με ενδομήτρια καθυστέρηση της αύξησης

Γκούρβας Β.<sup>1</sup>, Δάλπα Ε.<sup>1</sup>, Σουλιτζής Ν.<sup>1</sup>, Κουτρούλακης Δ.<sup>2</sup>, Κούκουρα Ο.<sup>2</sup>, Κωνσταντινίδου Α.<sup>3</sup>, Σπαντίδος Δ.Α.<sup>1</sup>, Σηφάκης Σ.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Ιολογίας Παν/μίου Κρήτης, Ηράκλειο

<sup>2</sup>Μαιευτική & Γυναικολογική Κλινική Παν/μίου Κρήτης, Ηράκλειο

<sup>3</sup>Α' Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Παν/μίου Αθηνών, Αθήνα

Αλληλογραφία: Σταύρος Σηφάκης, Μαιευτική Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο  
Τηλ.: 2810392609, E-mail: stavros.sifakis@yahoo.com

## Περίληψη

**Εισαγωγή:** Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (EYA) οδηγεί σε αυξημένη περιγεννητική νοσηρότητα και θνητότητα και σχετίζεται με παθολογική πλακουντοποίηση. Η έγκαιρη και κατάλληλη διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων στη χοριακή τροφοβλάστη, που ελέγχεται από την υποξία, είναι κρίσιμη για την ομαλή πλακουντοποίηση. Οι HIFs (Hypoxia Inducible Factors) είναι μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν ρόλο στην κυτταρική και συστηματική απάντηση στην υποξία, μέσω ρυθμίσεως του μεταβολισμού, του κυτταρικού κύκλου, της αγγειογένεσης και της απόπτωσης. Μελετήσαμε τη συσχέτιση των μονοπατιών της υποξικής απάντησης σε χοριακές λάχνες σε κνήσεις με EYA με τον ποσοτικό προσδιορισμό της πλακουντιακής έκφρασης των HIF-1a, HIF-2a, ARNT (aryl-hydrocarbon-receptor-nuclear-translocator) και PHD-3 (Prolyl Hydroxylation Domains-3).

**Υλικά και μέθοδος:** Έγινε συλλογή ιστοτεμαχίων πλακούντα από 20 κνήσεις με EYA και από 20 φυσιολογικές κνήσεις. Μετά από εκχύλιση του mRNA και δημιουργία cDNA, εφαρμόστηκε τεχνική quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) με χρησιμοποίηση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων. Η στατιστική σημαντικότητα ελέγχθηκε με το λογισμικό SPSS και η πολυπαραγοντική ανάλυση έγινε με χρήση μη παραμετρικών δοκιμασιών (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test). Ο έλεγχος της κατανομής της πλακουντιακής έκφρασης των γονιδίων έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov, ενώ οι ποικίλες συσχετίσεις μεταξύ των υπό εξέταση δεικτών και των κλινικών παραμέτρων έγινε με Spearman rank correlation.

**Αποτελέσματα:** Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των HIF-2a και HIF-b μεταξύ των κνήσεων με EYA και των φυσιολογικών κνήσεων. Αντιθέτως τα επίπεδα έκφρασης του PHD-3 και HIF-1a βρέθηκαν μειωμένα στις κνήσεις με EYA ( $p=0,007$  &  $p=0,044$  αντίστοιχα). Η έκφραση του PHD-3 μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας κύησης ( $p=0,026$ ), καθώς και με την αύξηση EΘ του βάρους γέννησης ( $p=0,029$ ). Οι κνήσεις με EYA και λιγότερο διαταραγμένες τιμές Doppler ταχυμετρίας στην ομφαλική αρτηρία παρουσίασαν σημαντικότερη μείωση της έκφρασης του PHD-3 ( $p=0,004$ ). Η μελέτη των προτύπων συνέκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων ανά ζεύγη έδειξε θετική συνέκφραση

**των HIF-1a, PHD-3 και HIF-b, όχι όμως και του HIF-2a.**

**Συμπεράσματα:** Από τα αποτελέσματα της μελέτης μπορεί να υποστηριχθεί η ύπαρξη ενός μοντέλου κεντρικής απάντησης του εμβρύου στην υποξία μέσω παραγωγής παραγόντων από τον πλακούντα. Στις κνήσεις EYA με καλύτερο προφίλ εμβρυϊκής κατάστασης (καλύτερα Doppler ομφαλικής αρτηρίας, μεγαλύτερη EΘ βάρους γέννησης και μεγαλύτερη διάρκεια κύησης) παρουσιάστηκαν εντονότερες μεταβολές στην έκφραση του PHD-3 - εύρημα που υποδηλώνει τη δημιουργία απάντησης στην υποξική αιτία που προκάλεσε ή συμμετείχε στην EYA σε σχέση με τις κνήσεις με χειρότερο κλινικοεργαστηριακό προφίλ, όπου η δημιουργία μιας τέτοιας απάντησης δεν επιτεύχθηκε.

*Λέξεις κλειδιά:* ενδομήτρια καθυστέρηση αύξησης, παθολογική πλακουντοποίηση, υποξία, ARNT, Hypoxia Inducible Factors, HIF-1a, HIF-2a, PHD-3

**Εισαγωγή**

Η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (EYA) αποτελεί μία πολύπλοκη παθολογία στο χώρο της σύγχρονης μαιευτικής με συχνότητα εμφάνισης περί του 4-7% των γεννήσεων και σχετίζεται με αυξημένη περιγεννητική νοσηρότητα και θνητότητα<sup>1,2</sup>. Ο όρος γενικά αναφέρεται σε ένα έμβρυο που παρουσιάζει μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης από τον φυσιολογικό (<10η εκατοστιαία θέση). Η EYA είναι μία οντότητα που δεν έχει συγκεκριμένη πάντα παθοφυσιολογία<sup>3</sup>. Μία πληθώρα παραγόντων έχουν συσχετιστεί με τη νόσο, που συμπεριλαμβάνει συγγενείς ανωμαλίες, κατάχρηση ουσιών, λοιμώξεις, καθώς και ανοσολογικούς ή ανατομικούς παραγόντες. Τα έμβρυα τα οποία παρουσιάζουν EYA μπορεί να ταξινομηθούν σε αυτά στα οποία ο βλαπτικός παράγοντας έδρασε από την αρχή της κύησης όπως λοιμώξεις, χρωμοσωμικές ανωμαλίες και άλλα γενετικά αίτια (συμμετρική υπολειπόμενη ανάπτυξη) και σε όσα ο βλαπτικός παράγοντας έδρασε αργότερα - στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησης - όπως η πλακουντιακή δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια (ασύμμετρη υπολειπόμενη ανάπτυξη). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των περιπτώσεων αποτελεί η παρατήρηση ότι σχεδόν πάντοτε συνυπάρχουν στοιχεία ατελούς ή παθολογικής πλακουντοποίησης<sup>4</sup>.

Η φυσιολογική πορεία της εγκυμοσύνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ομαλή δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας στις χοριακές λάχνες, που ξεκινάει με τη διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στο τοίχωμα της μήτρας και ολοκληρώνεται με την ένωσή της με τα σπειροειδή μητριαία αγγεία<sup>5,6</sup>. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ατελής τροφοβλαστική διείσδυση μπορεί να οδηγήσει σε εμβρυϊκή υποξία και διαταραχές της ανάπτυξης<sup>7</sup>. Η έγκαιρη και κατάλληλη διαφοροποίηση των πολυδύναμων κυττάρων στη χοριακή τροφοβλάστη, που φαίνεται να ελέγχεται από την υποξία, είναι κρίσιμη

για την ομαλή πλακουντοποίηση<sup>8,9</sup>. Επομένως, το σύνολο των ρυθμιζόμενων και επαγόμενων από την υποξία παραγόντων είναι σε ενεργή κατάσταση κατά τη διάρκεια του σχηματισμού της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας και πιθανά να αποτελούν κρίσιμους δείκτες για τη μετέπειτα εμφάνιση παθολογιών, όπως η EYA. Οι HIF (Hypoxia Inducible Factors) είναι σίγουρα από τους σημαντικότερους τέτοιους παράγοντες.

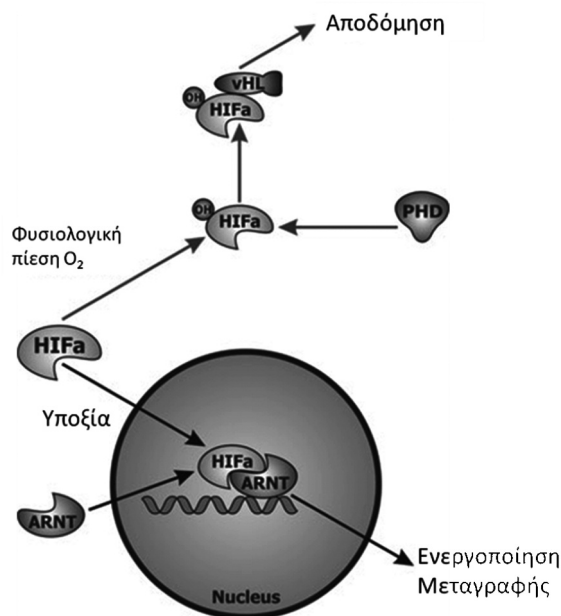
Οι HIFs είναι μεταγραφικοί παράγοντες, που ανακαλύφθηκαν σε κύτταρα θηλαστικών κάτω από υποξικές συνθήκες και φαίνεται να έχουν βασικό ρόλο στην κυτταρική και συστηματική απάντηση στην υποξία, μέσω ρυθμίσεως του μεταβολισμού, του κυτταρικού κύκλου, της αγγειογένεσης και της απόπτωσης. Οι HIFs είναι διμερή αποτελούμενα από τον HIF-a (1 ή 2) και τον HIF-b ή ARNT (aryl-hydrocarbon-receptor-nuclear-translocator). Η υπομονάδα HIF-a ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, από όπου αφού σταθεροποιηθεί, μεταφέρεται στον πυρήνα για να ενωθεί με την άλλη υπομονάδα ARNT, η οποία εκφράζεται και εντοπίζεται σταθερά στον πυρήνα, ώστε το σχηματιζόμενο διμερές να μπορέσει να επιτύχει το μεταγραφικό του ρόλο. Έχει βρεθεί ότι η μεταγραφική δράση του HIF-1 γίνεται μέσω μιας bHLH (basic helix-loop-helix)-PAS περιοχής στο αμινοτελικό του άκρο<sup>11</sup>. Για τη δράση αυτή χρειάζεται η στρατολόγηση των συνενεργοποιητών p300/CBP (cAMP response element-binding protein ή CREB binding protein). Οι HIF-1 και HIF-2 έχουν παρόμοια δομή και φαίνεται να έχουν επίσης παρόμοια δράση<sup>11</sup>.

Η υπομονάδα HIF-a όταν οι συνθήκες είναι νορμοξικές, υδροξυλιώνεται σε δύο θέσεις προλίνης (Pro402 και Pro564) από τους Prolyl Hydroxylation Domains (PHD-1, 2 και 3) που χρειάζονται ως συνενεργοποιητή το O<sub>2</sub> με μια Km (σταθερά χημικής ενζυμικής ισορροπίας) λίγο πάνω από τη συγκέντρωση

του O<sub>2</sub> της ατμόσφαιρας<sup>12</sup>, γεγονός που επιτρέπει την σύνδεση με τον von Hippel-Lindau (VHL)<sup>13</sup>, σχηματίζοντας ένα διμερές, το οποίο έπειτα αποδομείται από πρωτεασώματα<sup>14</sup>. Η ρύθμιση αυτή φαίνεται να είναι κοινή για τους παράγοντες HIF-a (Σχήμα 1).

Ο τρόπος ρύθμισης του HIF-1, αντιπροσωπεύει τον καλύτερα καθορισμένο μοριακό μηχανισμό απάντησης σε αλλαγές της συγκέντρωσης O<sub>2</sub> στα μεταζώα<sup>11</sup>. Ενώ ο HIF-1b εκφράζεται συνεχώς, η συγκέντρωσή του HIF-1a αυξάνεται εκθετικά καθώς η συγκέντρωση O<sub>2</sub> μειώνεται<sup>15</sup>. Προκειμένου να ανταποκριθούν άμεσα στην υποξία τα κύτταρα συνθέτουν συνεχώς, δεσμεύουν και αποδομούν τον HIF-1a σε νορμοξικές συνθήκες<sup>16-18</sup>. Κάτω από υποξικές συνθήκες όμως, αναστέλλεται η αποδόμηση του HIF-1a, με συνέπεια τη σταθεροποίησή του, τη μετάβασή του στον πυρήνα για το σχηματισμό του διμερούς με τον HIF-1b και τη δέσμευση σε HREs (hypoxia response elements) περιοχές μέσα σε γονίδια στόχους, όπως το γονίδιο EPO<sup>19,20</sup>. Παράλληλα ευοδώνεται η ενεργοποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας με παράλληλη στρατολόγηση και των συνενεργοποιητών p300/CBP. Ο HIF-2a ονομάστηκε endothelial PAS protein-1 (EPAS1) λόγω έκφρασής του στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά<sup>21</sup>. Αν και μία μελέτη παρουσίασε πρόκληση ατελούς αγγειακής αναδιαμόρφωσης, με ανώμαλα τριχοειδή αγγεία και συνέπεια την τοπική αιμορραγία<sup>22</sup>, διαφορετικοί φαινότυποι έχουν παρατηρηθεί σε δύο άλλες μελέτες. Στην πρώτη παρουσιάστηκε ανεπάρκεια στην εμβρυϊκή παραγωγή κατεχολαμίνης<sup>23</sup>, ενώ στη δεύτερη παρουσιάστηκε ανεπαρκής ωρίμανση του πνεύμονα σχετιζόμενη με ανεπάρκεια του επιφανειοδραστικού παράγοντα σε HIF-2a/- (knock out) πειραματόζωα<sup>24</sup>. Αυτές οι διαφορές στο φαινότυπο μπορεί να προκύπτουν από διαφορές στο γενετικό υπόβαθρο. Συνολικά, τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι παρά την παρόμοια δραστηριότητα στα HRE-σχετιζόμενα γονίδια αναφοράς, οι HIF-1a και HIF-2a έχουν σημαντικές μη-αλληλεπικαλυπτόμενες λειτουργίες στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Αντίθετα οι παράγοντες PHD-1, 2 και 3 φαίνεται να κατέχουν ένα παρόμοιο ρόλο στην αποδόμηση των α υπομονάδων των HIF.

Στην παρούσα μελέτη, μελετήσαμε τη συσχέτιση των μονοπατιών της υποξικής απάντησης σε χοριακές λάχνες από εγκυμοσύνες με EYA. Εστίασαμε στους HIF-1a, HIF-2a, ARNT και PHD-3, εκτιμώντας τα επίπεδα της έκφρασης του πλακουντιακού mRNA με τη μέθοδο της quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR).



**Σχήμα 1:** Γραφική αναπαράσταση του μονοπατιού των HIF υπό φυσιολογικές και υποξικές συνθήκες. Στη φυσιολογική πίεση O<sub>2</sub>, ο PHD υδροξυλιώνει την HIF-a υπομονάδα, έπειτα ενώνεται με τον vHL και οδηγείται προς πρωτεασωμική αποδόμηση. Στην υποξία η HIF-a υπομονάδα εισέρχεται στον πυρήνα, σχηματίζει διμερές με τον ARNT και έτσι ενώνεται με το DNA, προκαλώντας την ενεργοποίηση μεταγραφής των γονιδίων στόχων.

### Υλικά και Μέθοδος

Πραγματοποιήθηκε συλλογή ιστοτεμαχίων πλακούντα από 20 κήσεις με EYA και από 20 κήσεις με φυσιολογικό βάρος γέννησης. Η συλλογή έγινε με έξι βιοψίες από τη μητρική επιφάνεια κάθε πλακούντα με τέτοιο τρόπο, ώστε κάθε δείγμα περιελάμβανε το βασικό φθαρτό και πλακουντιακές λάχνες, αλλά όχι χοριακό δίσκο<sup>25-26</sup>. Η διάγνωση κήσεων με EYA στηρίχθηκε σε τακτικούς υπερηχογραφικούς ελέγχους (ασύμμετρου τύπου IUGR) και στο βάρος γέννησης (<3η ΕΘ για το φύλο και την εβδομάδα κύησης), ενώ αποκλείστηκαν οι περιπτώσεις EYA που αποδίδονται σε συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα (θρομβοφιλία, ανοσολογικά και γενετικά αίτια, λοιμώξεις κ.ά). Μετά από εκχύλιση του mRNA από τα δείγματα πλακούντα και δημιουργία cDNA, ακολούθησε η εφαρμογή της RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αληθινού χρόνου) με χρησιμοποίηση ειδικά σχεδιασμένων εκκινήτων, ώστε να διερευνηθεί η ποσοτική ανίχνευση της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων.

Η ανάλυση για την εξαγωγή στατιστικής σημαντικότητας έγινε με το λογισμικό SPSS και την εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης με τη χρήση μη παραμετρικών δοκιμασιών (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test). Ο έλεγχος της κατανομής της πλακουντιακής έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov, ενώ μελετήθηκαν οι ποικίλες συσχετίσεις μεταξύ των υπό εξέταση δεικτών και των κλινικών παραμέτρων (Spearman rank correlation).

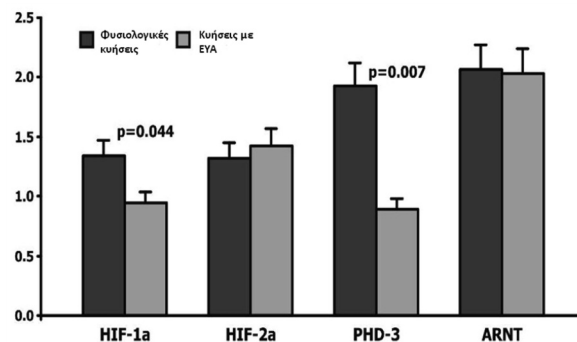
### Αποτελέσματα

Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση των HIF-2a και HIF-b μεταξύ των κήσεων με EYA και των φυσιολογικών κήσεων. Αντιθέτως τα επίπεδα έκφρασης του PHD-3 και HIF-1a βρέθηκαν μειωμένα στις κήσεις με EYA ( $p=0,007$  και  $p=0,044$  αντίστοιχα – Σχήμα 2). Ανάλυση συσχέτισης με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους έδειξε ότι η έκφραση του PHD-3 μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας κύησης (Spearman's rho test,  $p=0,026$ ), καθώς και με την αύξηση της εκατοστιαίας θέσης (ΕΘ) του βάρους γέννησης (Mann-Whitney U test,  $p=0,029$ ). Επιπρόσθετα, οι κήσεις με EYA και λιγότερο διαταραγμένες τιμές Doppler ταχυμετρίας στην ομφαλική αρτηρία παρουσίασαν σημαντικότερη μείωση της έκφρασης του PHD-3 (Fisher's exact test,  $p=0,004$ ). Η μελέτη των προτύπων συνέκφρασης (Spearman's rank correlation) των υπό εξέταση γονιδίων ανά ζεύγη έδειξε θετική συνέκφραση των HIF-1a, PHD-3 και HIF-b, όχι όμως και του HIF-2a.

### Συζήτηση

Σύμφωνα με τη σύγχρονη βιβλιογραφία, η έκφραση του mRNA των HIF-1a και HIF-2a δε μεταβάλλεται σε εγκυμοσύνες με υπολειπόμενη ανάπτυξη<sup>28</sup>, αν και παρατηρείται αύξηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ειδικά για τον HIF-2a, οφειλόμενη σε μετα-εκφραστικές τροποποιήσεις<sup>27</sup>. Στην προεκλαμψία αντίθετα και οι δύο παράγοντες (HIF-1a και HIF-2a) υπερεκφράζονται<sup>28-30</sup>, ενώ η αυξημένη πρωτεΐνη του HIF-1a που ανιχνεύεται οφείλεται επίσης και σε διαταραγμένη πρωτεασωματική λειτουργία<sup>31</sup>. Τα παραπάνω μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι παράγοντες HIF συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της εκδήλωσης EYA, κυρίως μέσω της μείωσης στην έκφραση του PHD-3 - δηλαδή η ρύθμισή τους γίνεται μετα-μεταφραστικά μέσω της πρωτεϊνικής σταθεροποίησής τους<sup>32</sup>.

Από τις περαιτέρω συσχετίσεις που προέκυψαν μπορεί να υποστηριχθεί η ύπαρξη ενός μοντέλου κεντρικής απάντησης του εμβρύου μέσω παραγωγής παρα-



**Σχήμα 2:** Σχετική έκφραση του mRNA των υπό μελέτη γονιδίων σε φυσιολογικές κήσεις και σε κήσεις που εμφάνισαν EYA.

γόντων από τον πλακούντα. Στις κήσεις EYA με καλύτερο προφίλ ανάπτυξης (καλύτερα Doppler ομφαλικής αρτηρίας, μεγαλύτερη ΕΘ βάρους γέννησης και μεγαλύτερη διάρκεια κύησης) παρουσιάστηκαν εντονότερες μεταβολές στην έκφραση του PHD-3, εύρημα που υποδηλώνει τη δημιουργία απάντησης στην υποξική αιτία που προκάλεσε ή συμμετείχε στην ενδομήτρια καθυστέρηση της ανάπτυξης σε σχέση με τα υπόλοιπα έμβρυα με χειρότερο κλινικοεργαστηριακό προφίλ, που πιστεύουμε ότι η παραγωγή μιας τέτοιας απάντησης δεν επιτεύχθηκε.

## A study of the placental expression of hypoxia regulating genes (HIF-1a, HIF-2a, HIF-b & PHD-3) in pregnancies affected by fetal growth restriction

Gourvas V.<sup>1</sup>, Dalpa E.<sup>1</sup>, Soultziz N.<sup>1</sup>, Koutroulakis D.<sup>2</sup>, Koukoura O.<sup>2</sup>, Konstantinidou A.<sup>3</sup>, Spandidos D.A.<sup>1</sup>, Sifakis S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece

<sup>3</sup>First Department of Pathology, Medical School, University of Athens, Greece

Correspondence: S.Sifakis, MD, PhD, Dept. of Obstetrics & Gynaecology, University Hospital of Heraklion, Crete, Greece, Tel: +30 2810392609  
Fax: +30 2810392759  
E-mail: stavros.sifakis@yahoo.com

## Summary

**Introduction:** Fetal Growth Restriction (FGR) is a major cause of increased perinatal morbidity and mortality and is associated with abnormal placentation. Adequate proliferation and differentiation of villous cytotrophoblast into invasive extravillous trophoblast, a process that is controlled by hypoxia, is critical for successful placentation. HIFs (Hypoxia Inducible Factors) are transcriptional factors that possess a significant role in the systematic response to hypoxia, through the regulation of metabolism, cellular cycle, vasculogenesis and apoptosis. We investigated the association of hypoxia response pathways in chorionic villi of pregnancies complicated with FGR by the quantitative evaluation of placental expression of HIF-1a, HIF-2a, ARNT (aryl-hydrocarbon-receptor-nuclear-translocator) και PHD-3 (Prolyl Hydroxylation Domains-3).

**Materials and Methods:** placental tissue biopsies were collected from 20 pregnancies complicated with FGR and from 20 normal pregnancies (controls). Used methods include RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay. The main outcome measures were mRNA expression of HIF-1a, HIF-2a and HIF-b (ARNT), along with prolyl hydroxylase domain 3 (PHD3), which leads to proteasomal degradation of HIF-a subunits. Statistical analysis was performed by the use of SPSS and the multifactorial analysis with the use of non-parametric assays (Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney test). The distribution of placental expression of the examined genes was performed by the use of Kolmogorov-Smirnov test and the various correlations of the clinical parameters with the use of Spearman rank correlation.

**Results:** No statistically significant differences in the transcription levels of ARNT and HIF-2a were found between FGR and normal placentas. By contrast, PHD3 and HIF-1a mRNA were downregulated in FGR placentas. PHD3 mRNA expression was associated with gestational age at delivery ( $P = 0.008$ ), birthweight centile ( $P = 0.029$ ) and abnormal umbilical artery (UA) Doppler measurements ( $P = 0.034$ ). The per pair co-expression pattern analysis of the examined genes showed a positive co-expression of HIF-1a, PHD-3, and HIF-b, but not for HIF-2a.

**Conclusions:** As PHD3 regulates the HIF-mediated hypoxic response in FGR, we deduce that fetal adaptation to hypoxia ranges from impaired to adequate, as observed by the gradient of PHD3 downregulation in relation to the severity of FGR.

*Key words:* abnormal placentation, ARNT, fetal growth restriction, HIF-1a, HIF-2a, hypoxia, Hypoxia Inducible Factors, PHD-3.

## Βιβλιογραφία

1. Jarvis S, Glinianaia S, Torrioli M, et. al. Cerebral palsy and intrauterine growth in single births: European collaborative study. *Lancet* 2003;362:1106-11.
2. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 1998;95:115-28.
3. Cetin I, Foidart JM, Miozzo M, et. al. Fetal growth restriction: a workshop report. *Placenta* 2004;25:753-7.
4. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: Implications for the pathogenesis of intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1-7.
5. Huppertz B, Abe E, Murthi P, Nagamatsu T, Szukiewicz D, Salafia C. Placental angiogenesis, maternal and fetal vessels – a workshop report. *Placenta* 2007;28(Suppl 1):S94-S96
6. Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004;25:127-39.
7. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiology of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:40-9.
8. James JL, Stone PR, Chamley LW. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Hum Reprod Update* 2006;12:137-44.
9. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277:1669-72.
10. Baumwell S, Karumanchi SA. Pre-Eclampsia: Clinical Manifestations and Molecular Mechanisms. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c72-c81
11. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006;59:15-26
12. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337-40.
13. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.
14. Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of an HIF-1-alpha-pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002;296: 1886-1889.
15. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* 1996; 271:C1172-80.
16. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a)

- protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redoxinduced changes. *J Biol Chem* 1997;272:22642-7.
17. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.
  18. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1<sub>α</sub> is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:17987-92.
  19. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
  20. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7.
  21. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997;11:72-82.
  22. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2<sub>α</sub> plays an important role in vascular remodelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8386-91.
  23. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev* 1998;12:3320-4.
  24. Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, et al. Loss of HIF-2<sub>α</sub> and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 2002;8:702-10.
  25. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2505-12.
  26. Winn VD, Haimov-Kochman R, Paquet AC, Yang YJ, Madhusudhan MS, Gormley M, et al. Gene expression profiling of the human maternal-fetal interface reveals dramatic changes between midgestation and term. *Endocrinology* 2007;148:1059-79.
  27. Dai SY, Kanenishi K, Ueno M, Sakamoto H, Hata T. Hypoxia-inducible factor-2<sub>α</sub> is involved in enhanced apoptosis in the placenta from pregnancies with fetal growth restriction. *Pathol Int* 2004;54:843-9.
  28. Rajakumar A, Whitelock KA, Weissfeld LA, Daftary AR, Markovic N, Conrad KP. Selective overexpression of the hypoxia-inducible transcription factor, HIF-2<sub>α</sub>, in placentas from women with preeclampsia. *Biol Reprod* 2001;64:499-506.
  29. Jarvenpaa J, Vuoristo JT, Savolainen ER, Ukkola O, Vaskivuo T, Ryyanen M. Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:351-5.
  30. Caniggia I, Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and pre-eclamptic pregnancies – a review. *Placenta* 2002;23(Suppl. A):S47-57.
  31. Rajakumar A, Doty K, Daftary A, Harger G, Conrad KP. Impaired oxygen dependent reduction of HIF-1<sub>α</sub> and -2<sub>α</sub> proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2003;24:199-208.
  32. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:617-26.