

## Fattori angiogenetici e peptidi vasoattivi nella preeclampsia e nel ritardo di crescita intrauterino

L. BATTISTA, F. TREZZA, A. VITELLI, L.O. SCALDARELLA, A.E. PARETO, R. BORRELLI, A. TOLINO

**RIASSUNTO:** Fattori angiogenetici e peptidi vasoattivi nella preeclampsia e nel ritardo di crescita intrauterino.

L. BATTISTA, F. TREZZA, A. VITELLI, L.O. SCALDARELLA, A.E. PARETO, R. BORRELLI, A. TOLINO

*Difetti angiogenetici possono essere coinvolti in una alterata placentazione che sottende a molteplici patologie ostetriche. Abbiamo studiato diversi fattori angiogenetici e peptidi vasoattivi che regolano il flusso placentare con un equilibrio tra vasodilatazione, indotta dal VIP, e vasocostrizione, data dal NPY, e soprattutto di promozione all'angiogenesi, dovuta al VEGF e potenziata dall'Ang-1, a sua volta antagonizzata dall'Ang-2. La ricerca di alterazioni quantitative di questi elementi ha lo scopo di aggiungere informazioni sulla patogenesi di preeclampsia e IUGR, con la speranza di poter poi trattarle farmacologicamente. Abbiamo selezionato 2 gruppi, uno di controllo (n=20), composto da gravidanze singole, fisiologiche, e un gruppo complicato con IUGR (n=10). Ne è risultato un aumento di VEGF, Ang-1 e Ang-2 nelle placente di donne con IUGR.*

**SUMMARY:** Angiogenic factors and vasoactive peptides in preeclampsia and intrauterine growth retardation.

L. BATTISTA, F. TREZZA, A. VITELLI, L.O. SCALDARELLA, A.E. PARETO, R. BORRELLI, A. TOLINO

*Angiogenic defects may be involved in impaired placenta that underlies many obstetric diseases. Aim of the study has been investigate angiogenic factors and vasoactive peptides which regulate the blood flow and could explain the pathogenesis of preeclampsia and IUGR: VIP (induces placental vasodilation), NPY (induces vasoconstriction), VEGF (promotes angiogenesis, enhanced by Ang-1 and antagonized by Ang-2). We selected two groups: one complicated with IUGR (n = 10) versus a control group (n = 20) with physiological pregnancies. In the group with IUGR there was an increase of VEGF, Ang-1 and Ang-2.*

KEY WORDS: VEGF - Ang-1 - Ang-2 - VIP - NPY - IUGR - Preeclampsia.  
VEGF - Ang-1 - Ang-2 - VIP - NPY - IUGR - Preeclampsia.

### Introduzione

La nascita di un neonato sano a termine dipende da una serie coordinata di eventi che consentono un regolare sviluppo della placenta, dell'embrione e del feto. Un'alterazione, in una o più fasi fondamentali della placentazione, può causare un'ampia gamma di complicanze gravidiche che vanno dall'aborto nel primo trimestre alla morte fetale, nonché ad alcune delle più

importanti patologie del terzo trimestre, ovvero la preeclampsia ed il ritardo di crescita intrauterino (IUGR). Diversi gradi di sviluppo anomalo della placenta e processi patologici secondari sottendono queste complicanze gravidiche.

Da queste premesse è facile ipotizzare un *primum movens* patogenetico comune di queste patologie, quale appunto un'alterazione dell'angiogenesi placentare.

Esistono diversi fattori angiogenetici e peptidi vasoattivi coinvolti nello sviluppo della placenta, tra cui il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), l'Angiopietina 1 (Ang-1), l'Angiopietina 2 (Ang-2), il NeuroPeptide Y (NPY) ed il Peptide Intestinale Vasoattivo (VIP).

Università degli Studi di Napoli "Federico II"  
Dipartimento Clinico di Emergenza Ostetrica e Ginecologica  
e Medicina della Riproduzione, Urologia  
(Direttore: A. Tolino)

## Fattori coinvolti nell'angiogenesi placentare

La regolazione dell'angiogenesi è complessa e prevede l'interazione di diversi fattori inibitori e stimolanti. Una delle famiglie di geni responsabili della stimolazione dell'angiogenesi è quella del *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). È stata dimostrata l'espressione del VEGF-A nella placenta umana con metodica RT-PCR. Le cellule che maggiormente esprimono VEGF-A sono macrofagi endometriali localizzati nella zona necrotica tra la placenta e l'endometrio. L'espressione di VEGF è regolata dall'ipossia; esso rappresenta uno dei più potenti e selettivi fattori di crescita con attività angiogenetica essendo altamente mitogeno, in maniera specifica, per le cellule endoteliali vascolari, e riveste un ruolo fondamentale nella regolazione dell'angiogenesi fisiologica e patologica. Oltre al VEGF (VEGF-A), sono stati identificati anche altri 4 geni strutturalmente correlati al VEGF, i cui prodotti sono conosciuti come PIGF (*Placental Growth Factors*): VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E.

Le **angiopoietine 1 e 2** sono coinvolte nella formazione della vascolarizzazione durante la vasculogenesi. Entrambe sono ligandi per il recettore Tie2 (recettore tipo tirosin-kinasi, espresso dalle cellule endoteliali ed ematopoietiche). È stato dimostrato che Ang-1 è espressa dal citotrofoblasto e dal sinciziotrofoblasto, mentre Ang-2 e Tie2 sono prevalentemente espressi nel citotrofoblasto.

L'**Ang-1 (angiopoietina 1)** è una citochina in grado di potenziare gli effetti di altri fattori angiogenetici quali, soprattutto, il VEGF. Essa, infatti, non è in grado da sola di promuovere la crescita di cellule endoteliali, ma interviene attivamente nell'angiogenesi solo dopo che altri fattori angiogenetici iniziano ad esplicare il loro effetto.

L'**Ang-2 (angiopoietina 2)** rappresenta l'antagonista naturale dell'Ang-1 e viene espressa precocemente in cellule endoteliali e in diverse linee cellulari tumorali non endoteliali.

Il **neuropeptide Y (NPY)** è composto da 36 aminoacidi ed è presente a livello placentare nel citotrofoblasto e nel trofoblasto intermedio ed in quantità ridotta nella porzione periferica del villo. L'NPY incrementa il rilascio del *Corticotropin-Releasing Factor* (CRF) da parte di cellule placentari in coltura, per cui si è ipotizzata una possibile azione paracrina ed un sinergismo tra NPY e noradrenalina nella regolazione del CRF. Questa interazione indica che l'NPY potrebbe essere coinvolto nella regolazione del flusso ematico placentare, poiché esso è espresso dai neuroni vasocostrittori sintetizzanti catecolamine.

È stato riscontrato un gene per un recettore ad ele-

vata affinità per il Peptide Intestinale Vasoattivo (*Vasoactive Intestinal Peptide - VIP*) nei tessuti placentari. In queste cellule, il VIP attiva l'adenilciclasi e modula l'espressione di hCG attraverso la via del cAMP. La potenzialità del VIP di avere ruoli nella gravidanza è supportata dall'osservazione che la pecora gravida presenta livelli più elevati di VIP rispetto agli animali non gravidi. Recentemente è stata dimostrata l'espressione di mRNA per il VIP da parte della placenta umana e la localizzazione della proteina nel citotrofoblasto e nel sinciziotrofoblasto. L'interesse per quanto riguarda il VIP nella regolazione del flusso ematico placentare deriva dalla sua presenza in neuroni vasodilatatori sintetizzanti acetilcolina.

## Scopo dello studio

Abbiamo voluto valutare il coinvolgimento di fattori angiogenetici e peptidi vasoattivi nella patogenesi di due patologie di vasta importanza nella pratica ostetrica, la preeclampsia e l'IUGR, che riconoscono nel loro *movens* patogenetico un insufficiente sviluppo della placenta.

Ad oggi non esistono terapie efficaci, nè strategie di prevenzione che possano ridurre l'incidenza di queste alterazioni. Notevoli sviluppi sono stati effettuati nel campo dell'ecografia e della flussimetria per poter in qualche modo prevedere l'insorgenza delle patologie, ma i risultati da un punto di vista terapeutico sono stati deludenti.

Appare necessario, quindi, approfondire le conoscenze fisiopatologiche della formazione placentare e della sua vascolarizzazione, in modo da poter approntare o opportunità terapeutiche efficaci o strategie preventive per favorire una placentazione efficace.

A tale scopo, il nostro interesse si è rivolto verso i fattori angiogenetici notoriamente coinvolti in questo processo, ovvero il VEGF, l'angiopoietina 1 e l'angiopoietina 2 e la molecola legante questi ultimi due, Tie-2, cercando di valutare le differenti concentrazioni plasmatiche nelle gravidanze fisiologiche e patologiche. Inoltre, abbiamo voluto investigare anche il comportamento di due neuropeptidi, l'NPY ed il VIP, coinvolti nella regolazione dei vasi, rispettivamente vasocostrittore il primo e vasodilatatore il secondo.

Queste molecole regolerebbero l'angiogenesi nelle prime fasi di placentazione, quando verosimilmente si verifica la *noxa* patogena (del resto ancora non nota), che porterebbe ad una riduzione della vascolarizzazione placentare, causa a monte dell'insufficienza placentare, e successivamente potrebbero regolare il flusso ematico in condizioni di ipossia. La conoscenza di questi meccanismi potrebbe in qualche modo portare all'identificazione di sostanze adiuvanti la vascolarizza-

zione in una prima fase e, successivamente, favorenti i meccanismi vasodilatatori rispetto a quelli vasocostrittori, con conseguente miglioramento del flusso ematico utero-placentare.

## Materiali e metodi

Abbiamo reclutato venti donne con gravidanza fisiologica singola e dieci donne la cui gravidanza era complicata da ritardo di crescita intrauterino (IUGR). Le donne sono state reclutate presso gli ambulatori di Ostetricia e di Ecografia Ostetrica e Ginecologica del nostro Dipartimento. La diagnosi di IUGR è stata posta utilizzando il 10° percentile dei valori di riferimento per feti di epoca gestazionale simile in Italia. La diagnosi di IUGR è stata confermata alla nascita in base al fatto che il peso del neonato era inferiore al 10° percentile degli standard italiani di peso alla nascita ed epoca gestazionale. Tutte le pazienti hanno fornito il loro consenso informato a partecipare allo studio. Tutte le ecografie sono state effettuate dallo stesso operatore utilizzando lo stesso ecografo. Tra l'ultima ecografia e la nascita non sono mai trascorsi più di sette giorni. Al momento del parto è stato prelevato un cotiledone placentare che veniva diviso in due parti, di cui una immediatamente fissata in formalina per l'esecuzione degli studi di immunoistochimica e l'altra congelata e conservata a -80°C per l'analisi con RT-PCR; sono stati dosati inoltre i livelli plasmatici materni e fetali, tramite il sangue cordonale, dei peptidi coinvolti nell'angiogenesi, oggetto del nostro studio.

## Risultati

Non abbiamo riscontrato differenze per quanto riguarda l'età delle pazienti dei due gruppi, mentre l'epoca gestazionale, il peso fetale alla nascita ed il peso della placenta sono risultati significativamente inferiori nelle pazienti con IUGR (Tab. 1).

Tutti i peptidi studiati hanno mostrato un contenuto significativamente inferiore nelle placente da gravidanze complicate da IUGR in confronto con le placente normali da gravidanze fisiologiche (Tab. 2), ad eccezione dell'NPY, il cui contenuto era significativamente maggiore nelle placente patologiche (Tab. 2).

Lo stesso tipo di risultato è stato riscontrato per i fattori angiogenetici ed il VIP, che presentavano un'espressione significativamente inferiore nelle gravidanze patologiche rispetto a quelle fisiologiche (Tab. 3) ad eccezione dell'NPY, anche in questo caso espresso in quantità significativamente maggiori (Tab. 3).

Il nostro studio è in accordo con i dati di Cooper et al., i quali hanno dimostrato una riduzione dell'e-

TABELLA 1 - CARATTERISTICHE DELLE PAZIENTI.

Variabili	Normali (n = 20)	IUGR (n = 10)
Età (anni)	31.2±6.0	28.9±9.1
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.1±1.0	25.0±1.3
Peso alla nascita (g)	2928.7±386.4*	1543.3±181.7
Peso placentare (g)	552±21*	391±15
Maschi/femmine	9/11	4/6
Fumatrici (%)	60%	60%

\* = p<0.05 vs. IUGR

TABELLA 2 - IMMUNOLOCAZZAZIONE DEI PEPTIDI VALUTATI IN PLACENTE NORMALI E DA GRAVIDANZE COMPLICATE DA IUGR E PREECLAMPSIA.

	Gravidanze fisiologiche	Gravidanze patologiche	Significatività (p)
VEGF	1.81±0.22	1.36±0.23	< 0.01
Ang-1	1.64±0.19	1.37±0.16	< 0.01
Ang-2	1.56±0.16	1.27±0.15	< 0.01
VIP	1.61±0.13	1.32±0.16	< 0.01
NPY	0.87±0.29	1.53±0.10	< 0.01

TABELLA 3 - ESPRESSIONE DEI PEPTIDI VALUTATI IN PLACENTE NORMALI E DA GRAVIDANZE COMPLICATE DA IUGR E PREECLAMPSIA.

	Gravidanze fisiologiche	Gravidanze patologiche	Significatività (p)
VEGF	1.31±0.25	1.02±0.13	< 0.01
Ang-1	1.35±0.21	1.06±0.11	< 0.01
Ang-2	1.32±0.12	0.98±0.05	< 0.01
VIP	1.41±0.13	1.12±0.17	< 0.01
NPY	0.77±0.19	1.34±0.14	< 0.01

spressione di mRNA per il VEGF da parte di placente provenienti da gravidanze con pre-eclampsia. È interessante il dato che lo stesso gruppo ha anche dimostrato un aumento dei livelli sierici materni di questo fattore angiogenetico significativamente più elevato rispetto ai controlli; rispettivamente, nelle gravidanze con preeclampsia i valori di VEGF sierici materni erano compresi tra 10.3 e 64 ng/ml, mentre nei controlli i valori erano compresi tra 6,3 e 24,3 ng/ml.

Nel gruppo di controllo i valori di NPY prelevati dal sangue del cordone ombelicale sono risultati significativamente più elevati (111,28±17 pg/ml) di quelli prelevati da neonati di donne preeclampatiche (49,65 ± 7,01 pg/ml). Abbiamo valutato, inoltre, le

concentrazioni di VIP nel sangue cordonale di neonati da gravidanze patologiche e di quelli nati dal gruppo di controllo. Ne è risultato che non ci sono differenze significative nei due gruppi nel sangue arterioso cordonale, bensì una differenza significativa è presente a livello del sangue venoso ( $p < 0.005$ ). I valori di VIP risultavano, rispettivamente,  $12,6 \pm 3,4$  pg/ml nel gruppo di controllo e  $28,1 \pm 8,4$  pg/ml nelle pazienti con preeclampsia e IUGR.

La preeclampsia e l'IUGR sono anche associati a una diminuzione delle molecole solubili, Tie-2, leganti Ang-1 e Ang-2. Le concentrazioni medie di Tie-2 nel sangue materno risultavano essere minori in donne con gravidanza fisiologica ( $16,1$  ng/ml) rispetto a donne non in stato di gravidanza ( $20,2$  ng/ml). Ancora differenti sono le concentrazioni ottenute in caso di preeclampsia o IUGR: nel primo caso abbiamo valori medi di  $14,9$  ng/ml ( $p < 0.004$ ), in caso di IUGR le concentrazioni medie di Tie-2 risultano  $10,9$  ng/ml ( $p < 0.001$ ).

## Discussione

Questo studio ha dimostrato che nelle placente umane da gravidanze complicate da IUGR, l'espressione di fattori angiogenetici e di peptidi vasoattivi con azione vasodilatante è ridotta rispetto alle placente normali da gravidanze fisiologiche. Questo potrebbe indicare che in caso di IUGR, causato verosimilmente da difetto di placentazione e conseguente ipossia, i fattori angiogenetici risultano essere significativamente sottoespressi ed il loro contenuto inferiore rispetto alle placente da gravidanze fisiologiche.

Precedentemente, anche Lyall et al. hanno riscontrato una immunolocalizzazione placentare del VEGF significativamente ridotta in gravidanze con preeclampsia e IUGR rispetto al gruppo di controllo, suggerendo che questa riduzione del VEGF possa essere almeno in parte responsabile dell'alterazione del processo di vascolarizzazione caratteristico di queste condizioni.

Dötsch et al. hanno riscontrato livelli significativamente inferiori di NPY nelle placente umane da gravidanze con preeclampsia e IUGR rispetto alle gravidanze fisiologiche, mentre Kokot et al. hanno dosato i livelli di NPY ematici non riscontrando significative riduzioni dei livelli di NPY rispetto ai controlli; diverso invece il discorso sui livelli di NPY del sangue nel cordone ombelicale di donne con preeclampsia e donne con gravidanza fisiologica. In un precedente studio, sono stati riscontrati livelli significativamente più elevati di VIP nelle gravidanze con preeclampsia rispetto a quelle fisiologiche, suggerendo che questo potesse essere un potente meccanismo di compenso di perfusione vascolare utero-placentare. In questo studio effettuato su pazienti affette da IUGR, causato da insuffi-

cienza placentare, appare uno scenario caratterizzato da una riduzione generalizzata di fattori angiogenetici e peptidi vasoattivi dilatanti ed un aumento di molecole vasocostrittrici, indicando la presenza di un ridotto sviluppo della neoangiogenesi placentare ed una risposta tendenzialmente vasocostrittrice a livello dell'interfaccia materno-fetale.

Inoltre, come precedentemente detto, il VEGF stimolerebbe la secrezione di Ang-2 da parte della placenta e l'Ang-1 coadiuverebbe il VEGF nella neoangiogenesi placentare. La generalizzata riduzione dei fattori angiogenetici osservata nelle pazienti con gravidanza complicata da IUGR indurrebbe ad ipotizzare un quadro con un primitivo deficit di VEGF e conseguente riduzione degli altri fattori angiogenetici valutati. Considerando che è stato dimostrato che l'ipossia stimola la secrezione di Ang-2, come precedentemente riportato, si può ipotizzare che in queste pazienti questo meccanismo di compenso possa essere assente o essersi esaurito. Sono stati, infatti, valutati i livelli di Ang-2 nel sangue materno e nel sangue cordonale, ma i valori ottenuti non sono risultati statisticamente significativi. I neuropeptidi vasoattivi sono espressi, oltre che dalle terminazioni nervose, anche da parte della placenta. Questo potrebbe far ipotizzare un loro effetto diretto sui vasi placentari e la loro azione potrebbe rappresentare un meccanismo di compenso in caso di ipossia placentare.

In queste gestanti, anche i neuropeptidi vasoattivi sembrano indicare un generalizzato stato di ipossia con assenza o esaurimento dei meccanismi compensativi. Infatti, l'NPY, che possiede un'azione vasocostrittiva, risulta significativamente sovraespresso nelle pazienti con IUGR.

Questi risultati sono in parte in contrasto con i dati presenti in letteratura. Bisogna considerare che l'insufficienza placentare, alterazione la cui patogenesi si cerca di comprendere per poterla prevedere, ha espressioni cliniche profondamente diverse con gravità differenti. Può essere infatti:

- a) clinicamente irrilevante, con esito completamente fisiologico della gravidanza e rilevabile esclusivamente con metodiche strumentali (flussimetria delle arterie uterine);
- b) manifestarsi come preeclampsia;
- c) indurre un rallentamento o un arresto della crescita fetale;
- d) presentarsi come associazione di queste due manifestazioni cliniche.

È facile attendersi dati differenti nell'espressione dei fattori angiogenetici e dei peptidi vasoattivi a seconda delle diverse manifestazioni cliniche e dei diversi gradi di gravità della patologia. Le discrepanze sarebbero facilmente spiegabili con le diverse popolazioni osservate.

Altra ipotesi potrebbe essere che si osservi lo stesso fenomeno in diverse fasi dell'insufficienza placentare, a seconda che i meccanismi di compenso siano attivi o si siano esauriti.

Non è infine da escludere che queste discrepanze siano dovute a differenze nell'epoca gestazionale alla nascita (le pazienti con gravidanze complicate da IU-GR e preeclampsia tendono a partorire prima), nel peso alla nascita e/o nel peso placentare.

## Conclusioni

In questo studio abbiamo valutato l'espressione di fattori angiogenetici e di fattori vasoattivi in pazienti con gravidanza complicata da preeclampsia e IUGR, ipotizzando che queste molecole potessero avere un ruolo nello sviluppo della malattia. Abbiamo rilevato una riduzione significativa dei fattori angiogenetici e dei peptidi vasodilatanti, associata ad un aumento dell'NPY (peptide vasocostrittore) nelle gravidanze patologiche.

## Bibliografia

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785-99.
2. Khan KS, Wojdyla D, Say L, et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006;367:1066-74.
3. Montan S, Sjoberg NO, Svenningsen N. Hypertension in pregnancy - fetal and infant outcome: a cohort study. *Clin Exp Hypertens - Part B Hypertens Pregnancy* 1987;6:337-48.
4. Klauber N, Rohan RM, Flynn E, D'Amato RJ. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat Med* 1997;3:443-446.
5. Torry RJ, Schwartz JS, Torry DS. Vascularization of the placenta. In *Cardiovascular Molecular Morphogenesis: Assembly of the Vasculature and its Regulation*, RJ Tomanek (ed.), New York, NY, Springer-Verlag, 2002.
6. Torry DS, Labarrere CA, McIntyre JA. Uteroplacental vascular involvement in recurrent spontaneous abortion. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998;10:379-382.
7. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:1049-1059.
8. Starzyk KA, Pijnenborg R, Salafia CM. Decidual and vascular pathophysiology in pregnancy compromise. *Semin Reprod Endocrinol* 1999;17:63-72.
9. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:469-78.
10. Plank MJ, Sleeman BD, Jones PF. The role of the angiopoietins in tumour angiogenesis. *Growth Factors* 2004;22:1-11.
11. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60.
12. Kobayashi H, Lin PC. Angiopoietin/Tie2 signaling, tumor angiogenesis and inflammatory diseases. *Front Biosci* 2005;10:666-74.
13. Drenkhahn M, Gescher DM, Wolber EM, Meyhoefer-Malik A, Malik E. Expression of angiopoietin 1 and 2 in ectopic endometrium on the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril* 2004;81:869-75.
14. Petraglia F, Volpe A, Genazzani AR, et al. Neuroendocrinology of human placenta. *Front Neuroendocrinol* 1990;11:6.
15. Petraglia F, Florio P, Nappi C., Genazzani A.R. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine and endocrine mechanisms. *Endocr Rev* 1996;17:156-186.
16. Sreedharan SP, Huang J-X, Cheung M-C, Goetzl EJ. Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2939-2943.
17. Deutsch PJ, Sun Y, Kroog GS. Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin-gene activity in JEG-3 syncytial trophoblasts. *J Biol Chem* 1990;265:10274-10281.
18. Ottesen B, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1615-1631.
19. Marziani D, Fiore G, Giordano A, et al. Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2378-83.
20. Todros T, Ferrazzi E, Girolì C, Nicolini U, Parodi L, Pavoni M, et al. Fitting growth curves to head and abdomen measure-

- ments of the fetus: A multicentric study. *J Clin Ultrasound* 1987;15:95-105.
21. Parazzini F, Cortinovis I, Bortolus R, Fedele L. Standard di peso alla nascita in Italia. [Birth weight standards in Italy] *Ann Ost Gin Med Perinat* 1991;CXII:203-46.
  22. Wathén KA, Tuutti E, Stenman UH, Alfthan H, Halmesmäki E, Finne P, Ylikorkala O, Vuorela P. Maternal serum-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in early pregnancy ending in preeclampsia or intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:180-4.
  23. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:1191-6.
  24. Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JC, Greer IA. Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery. *Placenta* 1997;18:269-76.
  25. Malamitsi-Puchner A, Boutsikou T, Economou E, Tzonou A, Makrakis E, Nikolaou KE, Hassiakos D. Angiopoietin-2 in the perinatal period and the role of intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:45-8.
  26. Hagen AS, Orbus RJ, Wilkening RB, Regnault TR, Anthony RV. Placental expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2 and tie-2 during placental development in an ovine model of placental insufficiency-fetal growth restriction. *Pediatr Res* 2005;58:1228-32.
  27. Dötsch J, Nüsken KD, Knerr I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W. Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta: ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2755-8.
  28. Kokot F, Ulman I, Wiecek A, Irzyniec T, Ulman J. Concentrations of leptin and neuropeptide Y in maternal plasma, umbilical cord blood and in amniotic fluid in pregnant women with EPH-gestosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1998;46:311-6.
  29. Deutsch PJ, Sun Y, Kroog GS 1990 Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin-gene activity in JEG-3 syncytial trophoblasts. *J Biol Chem* 1990;265:10274-10281.
  30. Ottesen B, Fahrenkrug J. Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1615-1631.
-