

UDK 618.3-006:575.1

Funkcionalna nejednakost roditeljskih genoma u etiologiji gestacijskih trofoblastičnih bolesti

Functional non-equivalence of parental genomes in the etiology of gestational trophoblastic disease

Nina Pereza¹ i Saša Ostojić^{1*}¹Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Primljeno: 17. 2. 2008.

Prihvaćeno: 15. 4. 2008.

SAŽETAK. *Gestacijska trofoblastična bolest (GTB)* heterogena je skupina novotvorina koje nastaju iz trofoblastnih stanica placente. Pravilna diferencijacija i funkcija trofoblasta tijekom implantacije i placentacije od iznimne su važnosti za uspješnu trudnoću u sisavaca. Epigenetički mehanizmi koji omogućuju transkripcijsku kontrolu genske ekspresije bez promjene nukleotidnog slijeda samog gena, ključni su čimbenici koji određuju normalan rast i razvoj placente i embrija. *Genomski upis* je posljedica *epigenetičkih modifikacija* koje dovode do ekspresije samo jednog alela istog gena, ovisno o roditeljskom podrijetlu. Iako su po genskoj strukturi genomi oca i majke identični, oni nisu jednaki i funkcionalno, te je za uspješnu trudnoću nužna prisutnost oba roditeljska genoma u zigoti. Genomski upisani geni imaju ključnu ulogu u kontroli rasta i razvoja embrija, te reguliraju glavne funkcije na fetoplacentarnoj jedinici, kao što su prijenos hranjivih tvari, proliferacija i invazivnost trofoblasta, te angiogeneza. Nepravilnosti genomskog upisa, uključujući nepravilan omjer majčinih i očevih genoma, dovode do brojnih poremećaja u rastu i razvoju fetusa i placente, te imaju ključnu ulogu u patogenezi GTB. Stalni napredak u području (epi)genetike reprodukcije pruža mogućnost da će u skoroj budućnosti modifikacije epigenetičkih mehanizama koji kontroliraju gensku ekspresiju biti temeljem moderne dijagnostike, praćenja i liječenja patoloških trudnoća. U ovom preglednom radu dajemo prikaz sadašnjih spoznaja uloge (epi)genetičkih čimbenika u etiologiji GTB.

Ključne riječi: epigenetika, genetika reprodukcije, genomski upis, gestacijska trofoblastična bolest, trudnoća

ABSTRACT. Gestational trophoblastic disease (GTD) is a heterogeneous group of neoplastic conditions which arise from abnormal proliferation of trophoblastic tissues during pregnancy. The proper differentiation and function of trophoblast during embryo implantation and placentation is essential for successful pregnancy. Epigenetic mechanisms, which provide transcriptional control of gene expression without alterations in gene sequence, are critical components of normal development of placenta and embryo. Genomic imprinting is an epigenetic form of gene regulation which results in the parent-of-origin specific gene expression and leads to functional non-equivalency of parental genomes. This indicates that the presence of both the maternal and paternal genomes is required in the zygote for normal development. Genomically imprinted genes regulate embryonic and placental development and have major functions at the feto-maternal interface, including nutrient transport, trophoblast proliferation, invasion and angiogenesis. Abnormalities in *genomic imprinting*, including altered ratio between maternal and paternal genomes, lead to numerous disorders of fetal and placental growth, and have a key role in the pathogenesis of GTD. The constant progress in the field of reproductive (epi)genetics indicates that modification of epigenetic mechanisms which control gene expression will have an important role in the diagnosis, prognostic assessment and treatment of pathological pregnancies. In this review we present the current understanding of the (epi)genetic mechanisms involved in the etiology of GTD.

Key words: epigenetics, genomic imprinting, gestational trophoblastic disease, pregnancy, reproductive genetics

Adresa za dopisivanje:

***Doc. dr. sc. Saša Ostojić, dr. med.**

Zavod za biologiju i medicinsku genetiku

Medicinski fakultet

Sveučilišta u Rijeci

Braće Branchetta 22

51000 Rijeka

e-mail: sasa.ostojic@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

Proces reprodukcije u čovjeka visoko je selektivan. Čak do 75% oplođenih jajnih stanica propada tijekom implantacije, odnosno prije klinički prepoznate trudnoće, dok samo 50-60% svih trudnoća napreduje iza 20. tjedna gestacije¹. Moguće je da su spontani pobačaji, bilo pojedinačni ili učestali, evolucijsko sredstvo uklanjanja nenormalnih embrija kojim se smanjuje učestalost rađanja djece s prirođenim malformacijama².

Razvojem medicinske znanosti širi se krug spoznaja i mogućnosti pristupa fenomenu trudnoće u čovjeka. Unatoč brojnim istraživanjima u području biologije reprodukcije, temeljni molekularni mehanizmi trudnoće još su uvijek nepoznati, što ograničava dijagnostiku i liječenje *bolesti trudnoće* na uzročnoj, genetičkoj razini. Pokušaj liječenja je zasad moguć samo u skupini negenetičke etiologije, uključujući ispravljanje anatomskih nepravilnosti reproduktivnog sustava, liječenje općih oboljenja, suzbijanje infekcija, reguliranje hormonskih poremećaja i imunosnu terapiju.

Iako se smatra da je veći dio spontanih pobačaja uzrokovan genskim ili kromosomskim abnormalnostima, u novije se vrijeme govori i o značajnoj ulozi *epigenetičkih promjena genoma sisavaca*, kao važnog čimbenika u regulaciji razvoja i funkcije embrija i placente, kao i nastanka patoloških trudnoća³. **Epigenetika** je znanost o nasljednim, reverzibilnim promjenama genske ekspresije bez promjene u DNA slijedu. Stoga epigenetički mehanizmi osiguravaju dodatnu razinu kontrole transkripcije, procesa koji regulira ekspresiju gena bez promjena same sekvence gena. Upravo su ti mehanizmi kritični za normalan rast i razvoj stanica embrija i placente, dok njihovi poremećaji pridonose razvoju brojnih patoloških oblika trudnoće. Posljedica epigenetičkih modifikacija je i fenomen **genomskog upisa** (engl. **genomic imprinting**), izuzetka konvencionalnog Mendelovog shvaćanja da dva alela istog gena nose identičnu

informaciju neovisno o roditeljskom podrijetlu. *Genomski upis*, razlika u ekspresiji gena s obzirom na roditeljsko podrijetlo, može se očitovati na razini gena, dijela ili čitavog kromosoma te sveukupnog genoma.

Većina autosomalnih gena sisavaca aktivna je s oba roditeljska alela, no zbog genomskog upisa određeni su geni aktivni sa samo jednog alela ovisno o tome od kojeg je roditelja taj alel naslijeđen. U ljudi su poremećaji *genomskog upisa* povezani s nastankom novotvorina (npr. Wilmsov tumor i hepatocelularni karcinom), kao i poremećajima

Temeljni molekularni mehanizmi trudnoće još su uvijek nepoznati, što ograničava dijagnostiku i liječenje *bolesti trudnoće* na uzročnoj, genetičkoj razini. **Epigenetika** je znanost o nasljednim, reverzibilnim promjenama genske ekspresije bez promjene u DNA slijedu. Epigenetičke modifikacije djeluju poput prekidača u kontroli genske aktivnosti, tj. stišavaju gene čija ekspresija nije potrebna, a aktiviraju one koji su potrebni za diferencijaciju i funkciju određene vrste stanica. Epigenetički nadzor funkcije stanica je ključni čimbenik koji određuje normalan rast i razvoj placente i embrija.

rasta i razvoja (npr. Prader-Willi sindrom, Angelman sindrom i Beckwith-Wiedemann sindrom). Relativno velik broj aneuploidnih gameta koje nastaju tijekom gametogeneze u čovjeka dovodi do stvaranja diploidnih zigota koje imaju kromosome određenog homolognog para istog roditeljskog podrijetla, što se naziva *uniparentna disomija*. Primjerice, u ljudi je ukazano na postojanje majčine *uniparentne disomije* 15. kromosoma kod *Prader-Willi sindroma* i očeve *uniparentne disomije* 15. kromosoma kod *Angelman sindroma*.

Genomski upis je jedan od najvažnijih regulatornih mehanizama povezanih s razvojem i diferencijacijom placente. O važnosti mehanizma *genomskog upisa* na rani rast i razvoj govori i činjenica da su svi *upisani* geni izraženi u placenti, bez obzira na to jesu li aktivni u embriju. Tkivo placente, jedinstvenog privremenog organa građenog od stanica podrijetlom od embrija i majke, čini razgranatu krvožilnu vezu važnu za prijenos i izmjenu hranjivih i štetnih tvari i plinova između

majčine i fetalne cirkulacije (respiratorna i nutritivna funkcija), te proizvodnju proteina i hormona (endokrina funkcija). Na taj način placenta tijekom intrauterina života direktno i indirektno provodi aktivnu ulogu fetalnog programiranja, što će se odraziti na kvalitetu života djeteta nakon poroda⁴. Poremećaji tih mehanizama mogu dovesti do abnormalnog razvoja krvotoka placente ili ploda, s posljedičnim razvojem komplikacija trudnoće, uključujući intrauterini zastoj u rastu ploda (engl. intrauterine growth retardation – IUGR), kao i razvoj *gestacijskih trofoblastičnih bolesti* (GTB), te EPH gestoza (akutna toksemija trudnoće – preeklampsija i eklampsija, kronična hipertenzija i neklasificirana stanja i bolesti)⁵.

Sve *gestacijske trofoblastične bolesti* čine jedinstvenu skupinu novotvorina čovjeka jer nastaju iz tkiva trofoblasta koje pripada fetusu i sadrži očev genetički materijal, te za majku predstavljaju polupresadnicu (semialograft). Cilj je ovog preglednog rada prikaz sadašnjih spoznaja uloge (epi)genetičkih čimbenika u etiologiji *gestacijskih trofoblastičnih bolesti*.

GRAĐA TROFOBLASTA

Trofoblast (grč. trophos=hrana) je tkivo embrija koje omogućuje invaziju blastociste u maternicu, signalizira prepoznavanje trudnoće i omogućuje prehranu embrija. Implantacija u čovjeka je izrazito invazivan proces u kojem se blastocista potpuno ukopa unutar majčinog endometrija i površnog miometrija, potičući pretvorbu spiralnih arteriola, kako bi se uspostavila uteroplacentalna, a nakon toga i fetoplacentalna cirkulacija⁶. U sisavaca trofoblast stvara vezu s majčinim krvnim žilama (hemokorijalni tip placente), a stanice trofoblasta prodiru u stromu endometrija procesom koji nalikuje invazivnosti malignog tumora⁷. Najdublja razina implantacije vidljiva je u čovjeka, gdje stanice trofoblasta prodiru u gotovo čitav lumen majčinih spiralnih arterija. U drugih placentalnih sisavaca nema duboke invazije trofoblasta u maternicu niti izravnog dodira majčine krvi i fetalnog tkiva, a plod ostaje u njenom lumenu tijekom čitave trudnoće.

Stanice trofoblasta su prve stanice koje se diferenciraju iz zigote, a razvijaju se 4-5 dana nakon oplodnje i izgrađuju *vilozni trofoblast* koji proizvo-

di hormone i sudjeluje u izmjeni tvari između majke i ploda, te *ekstravilozni (intermedijarni) trofoblast* čija je osnovna funkcija prodiranje i ugradnja placente u stromu maternice⁸. Vilozni i ekstravilozni trofoblast izgrađeni su od niza specijaliziranih staničnih vrsta koje sudjeluju u placenciji i prilagodbi na trudnoću. Citotrofoblastne stanice su vrsta matičnih stanica iz kojih se razvijaju sve ostale stanice trofoblasta. Sinciotrofoblast nastaje fuzijom citotrofoblastnih stanica u jedinstvenu masu citoplazme s mnogo jezgara i čini površni dio viloznog trofoblasta. Oko 14. dana nakon oplodnje, stanice citotrofoblasta probijaju sloj sinciotrofoblasta i formiraju ekstravilozni trofoblast.

Epitel endometrija regulira proces implantacije putem *decidualne reakcije*, tijekom koje vezivne stanice endometrija poprimaju epiteloidan oblik i nakupljaju glikogen i lipide, dok se međustanični prostori ispunjavaju tekućinom pa tkivo postaje edematozno⁹. Decidualna reakcija ograničava invazivnost blastociste i određuje stupanj prodiranja u stromu endometrija, odnosno kontrolira pseudomaligni rast alogeničnog fetalnog tkiva. Trofoblastne stanice su jedina vrsta stanica podrijetlom od embrija koje su izložene decidui i krvi majke, te stoga čine zaštitu od majčinih izvršnih imunskih stanica. Zaštitni učinak trofoblasta uključuje njegovo "maskiranje" jedinstvenim izražajem humanih leukocitnih antigena (HLA), primarno neklasičnih antigena I razreda – HLA-G molekula¹⁰.

Poremećaji regulacije invazivnosti blastociste podloga su nastanka većine patoloških trudnoća⁵. Primjerice, prekomjernim prodiranjem trofoblasta u endometrij nastaje *placenta accreta*, a nesposobnost odgovarajućeg prodora u endometrij dovodi do preeklampsije⁸. Dvije trećine ranih spontanih pobačaja karakterizirane su tankim i fragmentiranim trofoblastnim slojem, smanjenim prodiranjem i nepotpunim urastanjem citotrofoblasta u lumen spiralnih arterija, što rezultira nepravilnom transformacijom spiralnih arterija i abnormalnom cirkulacijom u placenti^{11,12}. Dakle, pravilna diferencijacija i funkcija trofoblasta tijekom implantacije i placencije od iznimne su važnosti za uspješnu trudnoću u sisavaca, a poremećaji u ovim procesima pridonose razvoju broj-

nih patoloških oblika trudnoće, uključujući *gestacijske trofoblastične bolesti*¹³.

FENOMEN FUNKCIONALNE NEJEDNAKOSTI GENOMA RODITELJA U REGULACIJI TRUDNOĆE

Embrionalni razvoj određen je nizom precizno reguliranih procesa koji počinju oplodnjom, a završavaju oblikovanjem više od 200 različitih vrsta stanica ljudskog organizma. Svaka od ovih stanica ima identičan genom, a njihova je diferencijacija i specijalizacija posljedica *epigenetičkih modifikacija* koje dovode do specifične genske ekspresije¹⁴. Epigenetičke modifikacije, uključujući DNA metilaciju, histonske modifikacije i remodeliranje kromatina, djeluju poput prekidača u kontroli genske aktivnosti – stišavaju gene čija ekspresija nije potrebna, a aktiviraju one koji su potrebni za diferencijaciju i funkciju određene vrste stanica. Epigenetičke modifikacije omogućuju preciznu regulaciju genske ekspresije ovisno o razdoblju razvoja i vrsti stanice i u svakoj stanici čine jedinstven *epigenetički kod*. Takav je kod sustavno nadređen *genetičkom kodu* koji je identičan u svakoj stanici, jer u svakoj stanici “označava” određene gene i određuje obrazac genske aktivnosti koja se prenosi tijekom stanične diobe, ali i transgeneracijski¹⁵.

Iako genetička struktura zigote zajedno s čimbenicima okoliša (primarno majčinom prehranom i razinom kisika) određuje razvoj ploda i placente, precizni molekularni mehanizmi koji reguliraju razvoj tijekom rane trudnoće još uvijek nisu poznati. Genski eksperimenti i metode *pronuklerne transplantacije* (presađivanje haploidnih jezgara) u miševa pokazali su da su za normalan razvoj sisavaca u zigoti potrebni haploidni genomi i oca i majke, što upućuje na činjenicu da genetički čimbenici imaju ključnu ulogu u regulaciji razvoja trudnoće^{16,17}. Ova su istraživanja ukazala da **ženski i muški pronukleusi imaju različit razvojni potencijal**, pa tako zigote u kojima se jezgra sastoji samo od dva haploidna očeva genoma (*androgenetičke zigote*) propadaju u ranoj trudnoći bez vidljivog razvoja embrija i prekomjerno razvijenim izvanembrionalnim strukturama (placenta). Zigote čiju jezgru sačinjavaju isključivo dva haploidna majčina genoma (*ginogenetičke zigote*) pokazuju razvoj embrija, ali imaju slab razvoj izvanembrionalnih tkiva. Iako ginogenetički plodovi preživlja-

vaju nešto dulje nego androgenetički, razvijaju se samo do stadija blastociste, a odmah nakon implantacije trudnoća završava spontanom pobačajem.

Iako su prema **genskoj strukturi genomi oca i majke identični, oni nisu jednaki i funkcionalno**, te je za uspješnu trudnoću nužna prisutnost oba roditeljska genoma u zigoti¹⁸. Ova *funkcionalna nejednakost* genoma roditelja posljedica je *genomskog upisa* koji predstavlja jedinstven fenomen u genetici sisavaca i glavna je prepreka nespolnom razmnožavanju, pa u sisavaca *partenogeneza* prirodno nije moguća¹⁹. Prilikom oplodnje, zigota nastaje spajanjem haploidnih genoma oba roditelja, pa su zato u diploidnom genomu sisavaca svi autosomni geni prisutni u dvije kopije, jedna majčinog, a druga očevog podrijetla. *Genomski upis* je posljedica *epigenetičkih modifikacija* koje dovode do ekspresije samo jednog alela istog gena ili određenih kromosomskih regija ovisno o roditeljskom podrijetlu.

Upisivanje (engl. *imprinting*) je proces kojim se ekspresija majčinog ili očevog alela određenog genskog lokusa u embriju epigenetski označava tako da sa njega nema ekspresije, odnosno on je transkripcijski utihnut (engl. *imprinted*), dok je aktivan samo sa drugog alela. Primjerice, epigenetske modifikacije očevih upisanih gena sprječavaju transkripciju, te se na taj način omogućava da u embriju bude aktivan samo alel koji je naslijeđen od majke.

Različita modifikacija alela istog gena u majke i oca postavlja se tijekom oogeneze i spermatogeneze i služi raspoznavanju roditeljskih alela nakon oplodnje, pa tako svaki alel nosi “*upis ili oznaku*” (engl. *imprint*) svog roditeljskog podrijetla. Ovo različito “*označavanje*” alela tijekom gametogeneze dovodi do funkcionalne nejednakosti gameta i različite genske ekspresije genoma oca i majke u zigoti¹⁷. Jedna od epigenetičkih modifikacija kojom se označavaju aleli jest DNA metilacija – postavljanje metilnih skupina na citozinske nastavke (slika 1).

Većina gena je aktivna s oba alela (*bialelna ekspresija*), no u genomu sisavaca postoji između 200-600 *genomski upisanih* gena koji su izraženi samo s jednog alela (*monoalelna ekspresija*)²⁰. *Genomski upis* omogućuje genima da “pamte”

jesu li naslijeđeni od oca ili od majke, pa tako postoje geni koji su izraženi samo s alela naslijeđenog od majke, dok su ostali izraženi samo s alela naslijeđenog od oca. Najvažnija biološka posljedica razlika u epigenetičkoj strukturi majčinog i očevog pronukleusa je **apsolutna nužnost da oba genoma budu prisutna u zigoti sisavaca** kako bi bio omogućen normalan razvoj. Istraživanja na androgenetičkim i ginogenetičkim miševima pokazala su da poremećaji u *genomskom upisu* utječu na rast, debljinu i organizaciju tkiva placente, što posljedično utječe i na promjenu njene

funkcije. Kao što je vidljivo iz ovih studija, iako su roditeljski genomi funkcionalno različiti, oni izvršavaju komplementarne funkcije, pa tako majčini geni pridonose i usmjeravaju razvoj samoga embrija, dok su očevi geni važni za razvoj izvanembrionalnih tkiva, odnosno poticanje invazivnosti trofoblasta.

Iako čine samo 1% ukupnog broja gena, *genomski upisani* geni imaju ključnu ulogu u kontroli stanične proliferacije, rasta i razvoja embrija, te reguliraju glavne funkcije na fetoplacentarnoj jedinici, kao što su proliferacija i invazivnost trofoblasta, vaskulogeneza i angiogeneza, te prijenos hranjivih tvari²¹⁻²⁴. Kako *genomski upis* ima ključnu ulogu u fiziologiji placente, smatra se da je presudan za razvoj i funkciju placente i evoluciju placentalnih sisavaca^{25,26}. Implantacija i razvoj placente omogućili su optimalne fiziološke izmjene tvari između fetalne i maternične cirkulacije za dobrobit razvijajućeg fetusa.

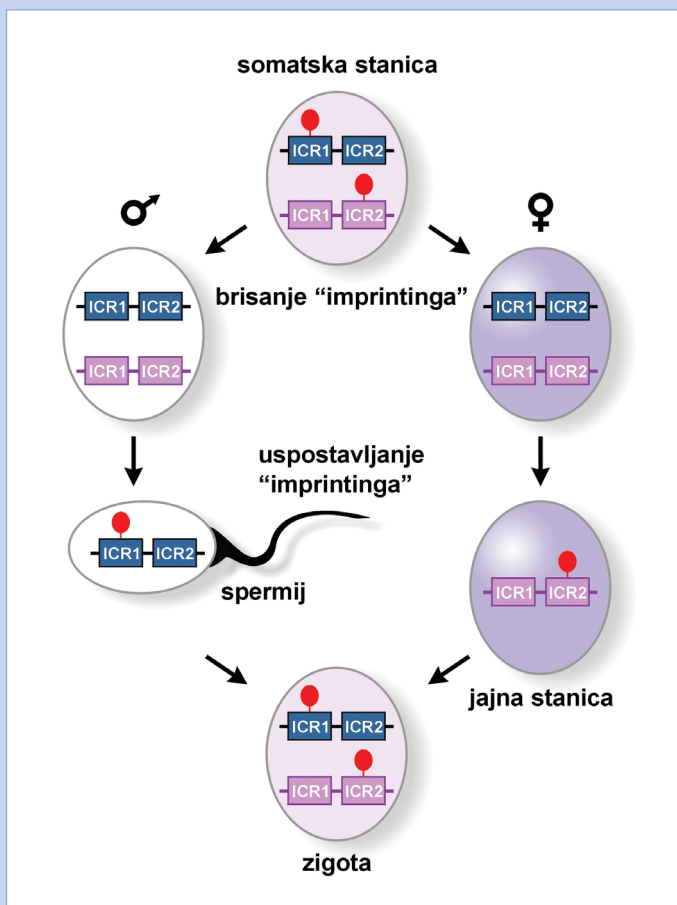
Podrijetlo alelne ekspresije, slijed i poredak upisanih gena na kromosomima i regulacija njihove ekspresije u placentalnih sisavaca su evolucijski konzervirani, što čini mišje modele pogodnima za istraživanje uloge *genomskog upisa* u patološkim trudnoćama u čovjeka.

S obzirom na važnost *genomskog upisa* u regulaciji funkcije placente, smatra se da su poremećaji epigenetičkih mehanizama glavni čimbenici u etiologiji idiopatskih patoloških trudnoća, uključujući abnormalnosti fetalnog rasta (npr. Beckwith-Wiedeman sindrom, intrauterini zastoj u rastu) i placente (npr. *gestacijske trofoblastične bolesti*, preeklampsija, učestali spontani pobačaji)²⁷⁻²⁹.

Iako točan mehanizam nastanka *gestacijskih trofoblastičnih bolesti* nije poznat, poznato je da genetički čimbenici imaju najvažniju ulogu. Sve *gestacijske trofoblastične bolesti* nastaju kao posljedica kromosomskih i genskih abnormalnosti, odnosno nejednakog omjera između majčinih i očevih gena/kromosoma/genoma, što dovodi do poremećaja u *genomskom upisu*.

DEFINICIJA I PODJELA GESTACIJSKIH TROFOBLASTIČNIH BOLESTI

Gestacijska trofoblastična bolest (GTB), naziv je za heterogenu skupinu novotvorina koje nastaju iz trofoblastnih stanica placente. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), GTB se s obzi-



Slika 1. Genomski upis je posljedica epigenetičkih modifikacija koje dovode do ekspresije samo jednog alela istog gena ovisno o roditeljskom podrijetlu.

Figure 1. Genomic imprinting is the result of epigenetic modifications which lead to expression of one allele of the same gene in parent-of-origin specific manner.

Epigenetičke oznake kojima se raspoznaju roditeljski aleli postavljaju se tijekom oogeneze i spermatogeneze na regijama genoma koji nadziru ekspresiju upisanih gena (engl. imprinting control regions, ICR). Zbog ove funkcionalne nejednakosti gameta, u zigoti dolazi do različite genske ekspresije genoma oca i majke. Označavanje alela najčešće se provodi DNA metilacijom (crvene oznake na genima).

rom na makroskopska i mikroskopska obilježja novotvorina, patogenezu i terapiju klasificiraju u nekoliko kategorija: *hidatiformna mola* (kompletna i parcijalna), *invazivna mola*, *tumor ležišta placente*, *koriokarcinom* i ostale rijetke i neklasificirane promjene trofoblasta.

Kako genetička podloga zigote određuje razvojni program normalne i patološke trudnoće, svaka od ovih GTB je karakterizirana specifičnim i jedinstvenim obrascem genske ekspresije koja utječe na različite fenotipske karakteristike samih novotvorina. S obzirom na različit potencijal lokalne invazije i metastaziranja, GTB se prema kliničkoj klasifikaciji dijele na benigne i maligne³¹. *Kompletna i parcijalna hidatiformna mola* su lokalizirani tumori i spadaju u skupinu benignih GTB, dok ostale novotvorine spadaju u klinički maligne GTB zbog iznimnog potencijala lokalnog prodiranja i metastaziranja. Nekontrolirana proliferacija i invazivnost trofoblasta, koje su karakteristične za novotvorine trofoblasta, dovode do neprimjerno velike i nediferencirane placente nepravilne funkcije.

GTB su jedinstvena skupina novotvorina čovjeka zato što nastaju iz fetalnog tkiva koje prodire u majčina tkiva³². Za razliku od negestacijskih tumora trofoblasta koji nastaju u gonadama, retroperitoneumu i medijastinumu iz stanica istog organizma, fetalni trofoblast sadrži očevo genetički materijal, te ove novotvorine za majku predstavljaju *semialograft*.

EPIDEMIOLOGIJA I ČIMBENICI RIZIKA

Učestalost GTB se razlikuje s obzirom na određene dijelove svijeta, pa je tako incidencija veća u nekim dijelovima Azije, Srednjeg istoka i Afrike, dok je u Europi i Sjevernoj Americi niska³³. Incidencija GTB u Europi i Sjevernoj Americi iznosi 1:1000-2000 trudnoća, dok je u nekim Azijskim zemljama 7-10 puta veća³³. Osim etniciteta, najvažniji čimbenici rizika jesu dob majke manja od 15 i veća od 40 godina, te GTB u prethodnoj trudnoći. Žene koje su već imale molarnu trudnoću imaju 5-10 puta veći rizik od ponovnog javljanja nekog od oblika GTB, što upućuje na njihovu moguću genetičku predodređenost³⁴. Prethodni spontani pobačaji također povisuju rizik od GTB. Nije poznato kako očeva dob utječe na rizik za razvoj GTB, iako su neke studije pokazale da

starija dob oca utječe na pojavnost GTB^{35,36}. Od ostalih čimbenika rizika najviše se spominje utjecaj krvnih grupa, te prehrambeni čimbenici, poglavito nedostatak vitamina A³³.

BENIGNE GESTACIJSKE TROFOBLASTIČNE BOLESTI

HIDATIFORMNA MOLA

(LAT. MOLA HYDATIFORMIS)

Hidatiformna mola (mola hidatidosa ili grozdasta potajnica), najčešća je novotvorina trofoblasta u kojoj dolazi do djelomične ili potpune transformacije korionskih resica i hiperproliferacije trofoblasta. Kod hidatiformne mole ogranci resica zadebljaju i mjestimično postanu mjehurasti, ponekad do veličine zrna grožđa. Rane citogenetičke studije su pokazale da *molarne trudnoće* nastaju kao posljedica prekomjernog ili isključivo očevog doprinosa genomu zigote, što predstavlja kromosomski poremećaj koji utječe na rast i razvoj fetusa i placente^{37,38}. *Hidatiformna mola* se na temelju različitih genetičkih, patohistoloških, morfoloških i kliničkih značajki klasificira kao *kompletna ili parcijalna*³⁹. Žene s kompletnom i parcijalnom molom mogu imati uspješne trudnoće, ali imaju povećani rizik od razvoja sljedeće molarne trudnoće. Molarne trudnoće se smatraju premaligim lezijama jer se mogu maligno preobraziti, pa tako rizik od razvoja koriokarcinoma nakon molarne trudnoće iznosi oko 3 do 7%, što je 1000 puta više nego nakon normalne trudnoće⁴⁰.

KOMPLETNA HIDATIFORMNA MOLA

Kompletna hidatiformna mola karakterizirana je avaskularnim hidropski promijenjenim korionskim resicama, hiperplazijom trofoblasta (cito-, sincicio- i ekstraviloznog trofoblasta) na površini resica, te sklonosti trofoblasta invazivnom rastu uz istovremeni nedostatak embrija. Makroskopski se ove promjene očituju kao deformirane resice u obliku manjih ili većih grozdova. Kompletna mole imaju potpuno odsutan razvoj embrija ili se degeneracija embrija događa vrlo rano, između 15. i 31. dana nakon oplodnje³⁸.

Većina *kompletnih hidatiformnih mola* javlja se sporadično i ima diploidni genom. Postoje dvije vrste *kompletnih mola* koje se razlikuju po mehanizmu nastanka, a posljedica su poremećaja ga-

metogeneze ili abnormalne oplodnje. U 80% slučajeva *kompletne mole* imaju genom isključivo očevog podrijetla (*androgenetičke mole*), dok preostalih 20% ima genom oba roditelja (*biparentne mole*)⁴¹. Androgenetička i biparentna mola se patohistološki ne mogu razlikovati, već je potrebna genetička analiza. Kompletna mola ima visok rizik maligne transformacije (20%)⁴².

Androgenetička/uniparentna kompletna hidatiformna mola. Većina *kompletnih hidatiformnih mola* ima diploidni kariotip gdje su oba kromo-

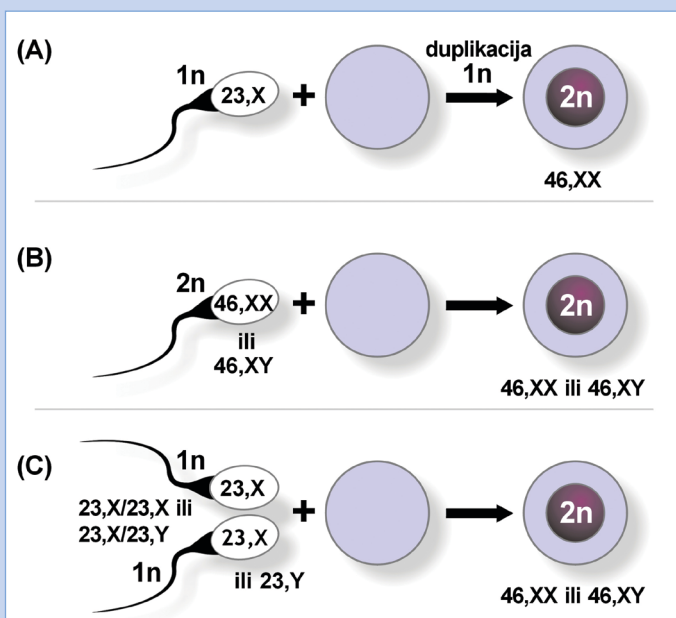
somska seta očeva podrijetla^{43,44}. Ovakva se organizacija genoma naziva androgenetičkom zbog toga što se čitav genetički materijal sastoji samo od očeve DNA (*androgenetički genom*). Androgenetička zigota može nastati monospermijom ili dispermijom (slika 2). U 75-80% slučajeva dolazi do oplodnje jednog haploidnog spermija i jajne stanice koja nema jezgru (engl. *blighted ovum*) ili ima inaktiviranu jezgru, nakon čega se haploidni genom oca udvostruči (diandrija)⁴³. Androgenetička zigota također može nastati oplodnjom prazne oocite diploidnim spermijem koji nastaje kao posljedica nerazdvajanja kromosoma tijekom prve ili druge mejotičke diobe⁴⁵. Ovakve se *kompletne mole* nazivaju "homozigotne mole" jer su nastale monospermijom, pa su na oba seta kromosoma prisutni isti aleli podrijetlom od oca. S obzirom na to da trudnoće bez X kromosoma nisu spojive sa životom, mole sa 46,YY kariotipom nisu nikada opisane, pa su tako sve homozigotne *hidatiformne mole* ženskoga spola (46,XX).

U preostalih 20-25% slučajeva, androgenetička mola nastaje dispermijom, odnosno oplodnjom dvaju spermija i prazne jajne stanice^{46,47}. Ovakve su mole heterozigotne i mogu imati kariotip 46,XX ili 46,XY. Mehanizam nastanka prazne oocite nije poznat, no moguće je da dolazi do nerazdvajanja kromosoma koji završavaju u jednoj polociti.

Bez obzira na androgenetički genom jezgre, mitohondrijska DNA uvijek potječe od majke kao i u normalnih zigota⁴⁸. Iako su opisani rijetki slučajevi triploidnih i tetraploidnih *kompletnih mola*, one su i dalje androgenetičkog podrijetla s tri ili četiri očeva seta kromosoma⁴⁹.

S obzirom na to da je u *kompletnim molama* genom jezgre u potpunosti očeva podrijetla, ovi su tumori u majčinom tkivu maternice potpuni alografti. Međutim dokazano je da sve GTB, uključujući *kompletne mole*, izražavaju visoke razine HLA-G molekule, koja štiti plod od majčinog imunskog sustava i omogućuje razvoj molarne trudnoće⁵⁰.

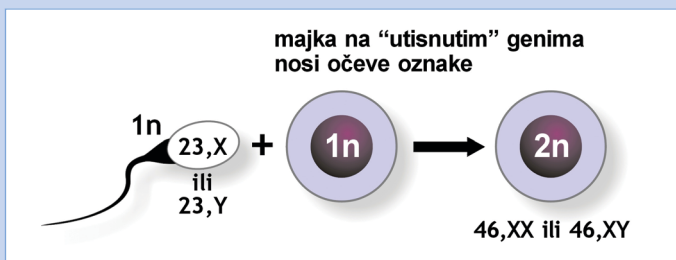
Biparentna kompletna hidatiformna mola. Iako većina *hidatiformnih mola* nastaje sporadično, opisani su slučajevi *učestalih hidatiformnih mola*⁵¹⁻⁵⁴. Učestale mole ne sadrže prekomjerni očev genetički materijal, već imaju normalan diploidni genom koji je nastao spajanjem oba roditeljska genoma. Međutim iako su u zigoti prisutni geno-



Slika 2. Mehanizam nastanka androgenetičke kompletne hidatiformne mole.

Figure 2. Mechanisms of origin of androgenetic complete hydatidiform mole.

- A) oplodnja haploidnog spermija i "prazne oocite" (*blighted ovum*) nakon čega se haploidni genom oca udvostruči (diandrija)
- B) oplodnja prazne oocite diploidnim spermijem
- C) oplodnja dvaju spermija i prazne jajne stanice (dispermijska)



Slika 3A. Mehanizam nastanka biparentne kompletne hidatiformne mole.

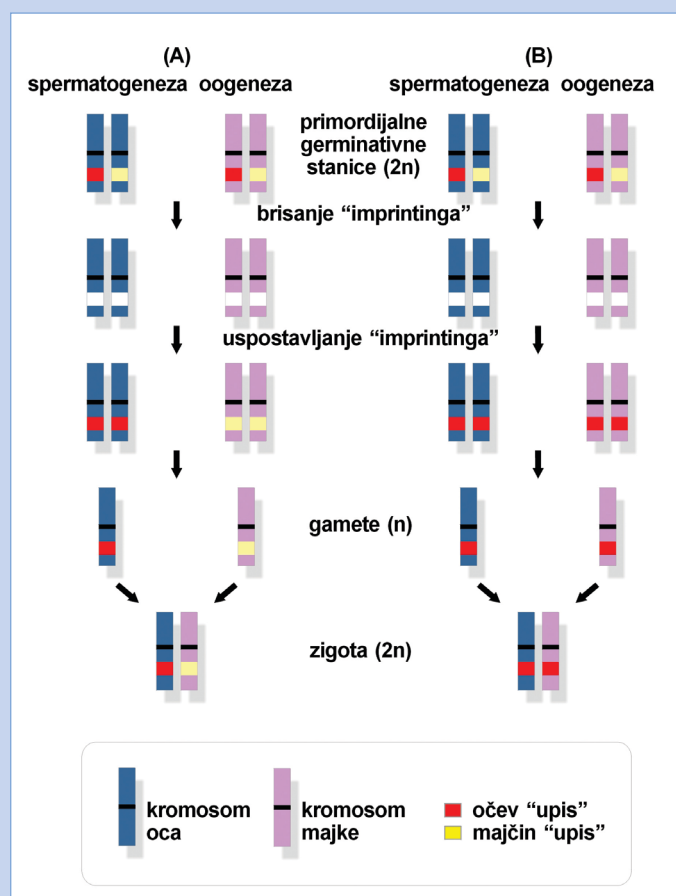
Figure 3A. Mechanisms of origin of biparental complete hydatidiform mole.

mi oca i majke, ova molarna trudnoća nastaje zbog toga što tijekom oogeneze aleli gena upisanih na majčinom genomu poprimaju *oznake (epigenetičke modifikacije)* karakteristične za očeve alele, pa u zigoti dolazi do gubitka pravilnog *genomskog upisa* i nepravilnog omjera majčinih i očevih upisanih gena^{55,56} (slika 3A).

Svaka diferencirana stanica ima svoju epigenetičku strukturu koja određuje njezin fenotip i funkciju. *Epigenetičke modifikacije* koje se jednom uspostave u diferenciranim stanicama održavaju se stabilnima tijekom staničnih dioba. Međutim s obzirom na to da je *genomski upis* reverzibilan proces, tijekom određenih razvojnih razdoblja sisavaca (gametogeneza i prije implantacije) genomi prolaze opsežno *epigenetičko "reprogramiranje"*⁵⁷. Naime, kako bi novonastala zigota imala pravilan *genomski upis*, tijekom oogeneze i spermatogeneze brišu se postojeći majčini i očevi "upisi" i nanovo se *postavljaju* prema spolu roditelja u kojem se razvijaju (slika 3B-A). Tako u zrelim spermijima svi aleli istog gena nose mušku "oznaku", a u oociti ovi isti aleli nose ženske "oznake", što rezultira *funkcionalnom nejednakošću roditeljskih genoma*. Međutim u *učestalih kompletnih mola* tijekom oogeneze dolazi do nepravilnog *postavljanja genomskih upisa*, tako da ženski aleli upisanih gena nose oznake muških alela, što dovodi do dvostruko veće ekspresije očevih upisanih gena u zigoti (slika 3B-B)^{55,56}. Žene s *učestalim kompletnim molama* su recesivni homozigoti za mutaciju u **NALP7** genu ili nosioci različite mutacije na oba alela (engl. compound heterozygous). **NALP7** pripada *Caterpillar* porodici gena koji su uključeni u regulaciju upalnih i apoptotičkih procesa, a također je aktivan u oocitama tijekom metafaze I i endometriju gdje regulira sekreciju citokina IL-1 β koji sudjeluje u decidualizaciji i trofoblastnoj invaziji. Homozigotna mutacija **NALP7** gena dovodi do uspostavljanja očevog *genomskog upisa* na majčinih kromosomima tijekom gametogeneze. Nepravilna DNA metilacija u *biparentnim molama* zahvaća samo upisane gene, dok su ostali dijelovi genoma pošteđeni, što ponovno dokazuje kako je *genomski upis* ključni faktor koji regulira razvoj trudnoće⁵⁸. Žene s mutacijama u **NALP7** genu mogu imati uzastopne *kompletne mole* s različitim partnerima, što dokazuje da

očev genom ne pridonosi razvoju *biparentne mole*⁵⁹. U određene skupine žena s *biparentnom kompletnom molom* nisu nađene mutacije **NALP7** gena, pa se smatra da postoji genetička heterogenost koja dovodi do tog poremećaja⁵⁶.

Biparentne mole se najčešće pojavljuju u jedne članice obitelji koja može imati i do 9 uzastopnih mola⁶⁰. Zabilježeni su i obiteljski slučajevi gdje je zahvaćeno više članica iste porodice. Zbog mutacija u **NALP7** genu iznimno je rijetko moguć normalan ishod trudnoće, pa tako uz *hidatiformnu*



Slika 3B. Reprogramiranje roditeljskih "upisa" tijekom normalne i nepravilne gametogeneze (hipotetski model očevog "upisanog" gena).

Figure 3B. Reprogramming of parental imprints during normal and abnormal gametogenesis (hypothetical model of a parental imprinted gene).

A) Pravilno "postavljanje upisa" tijekom oogeneze i spermatogeneze. Shematski prikaz očevog "upisanog" gena koji je aktivan samo s majčinog alela (crvena oznaka), a stišan na očevom alelu (plava oznaka). Ovaj gen će u novonastaloj zigoti biti aktivan s kromosoma koji je naslijeđen od oca, a stišan na kromosomu naslijeđenom od majke.

B) Nepravilno "postavljanje" upisa tijekom oogeneze i spermatogeneze. Biparentne kompletne hidatiformne mole su autosomno recesivne bolesti u kojih zbog mutacije **NALP7** gena tijekom oogeneze dolazi do postavljanja očevih oznaka (engl. imprints) na majčine alele. U zigoti dolazi do nepravilnog omjera majčinih i očevih upisanih gena što dovodi do gubitka pravilnog genomskog upisa.

molu ove žene razvijaju i učestale spontane pobačaje ili mrtvorodstvo^{61,62}. Kako ove mutacije dovede do širokog spektra kliničkih sindroma vezanih uz neuspješnu trudnoću, vjerojatno je da NALP7 gen nema ulogu samo u oogenezi, već i tijekom same trudnoće.

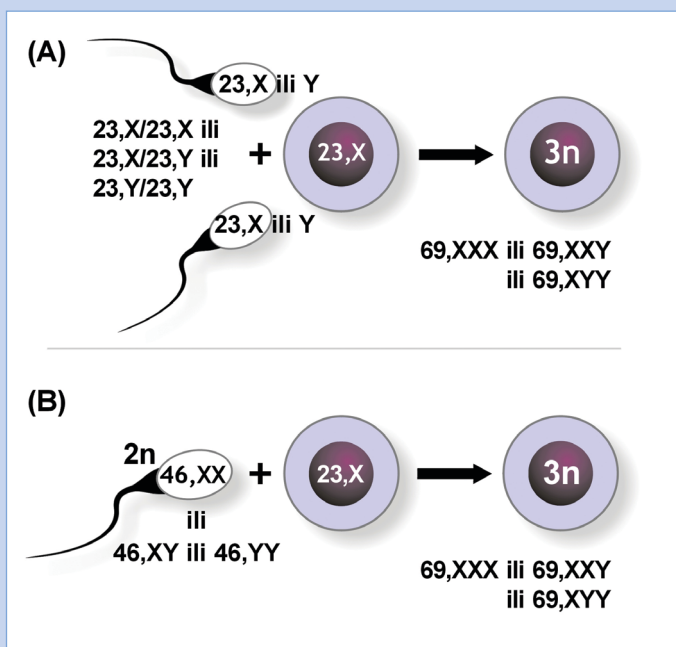
Biparentne mole patohistološki se ne mogu razlikovati od klasične mole koje imaju dvostruki set očevih kromosoma⁶³. Detekcija ovih razlika moguća je samo molekularnim metodama.

Iako u *parcijalne mole* postoji prisutnost fetalnih krvnih žila i fetalnog tkiva zbog prisutnosti majčinog genoma, većina ovih trudnoća završava spontanom pobačajem unutar prvih par tjedana nakon oplodnje. Fetusi koji dožive kasniju dob pokazuju zastoj u rastu i brojne malformacije, poput srčanih anomalija, spine bifide, sindaktilije i mnogih drugih⁶⁵.

Maligna transformacija je vrlo rijetka, no u 4-11% slučajeva ipak moguća⁶⁶.

OMJER MAJČINI I OČEVIH UPISANIH GENA REGULIRA FIZIOLOŠKI/PATOLOŠKI RAST I RAZVOJ EMBRIJA I PLACENTE

Nepravilna ekspresija upisanih gena snažno pridonosi abnormalnom razvoju trofoblasta sisavaca, što je vidljivo u brojnim patološkim trudnoćama, uključujući *gestacijske trofoblastične bolesti*⁵⁶. Kromosomske aneuploidije, primarno triploidije, najčešći su uzrok spontanog pobačaja i kongenitalnih malformacija⁶⁷. Dodatni set kromosoma u triploidije može biti očevog (*diandrični triploid*) ili majčinog podrijetla (*diginični triploid*)⁴⁷. Kada su dvije od tri kopije u triploidnom genomu majčinog podrijetla (nastale zbog nerazdvajanja kromosoma tijekom mejoze I ili II), takva se trudnoća ne razvija u molarnu trudnoću, već nastaje mala placenta i ubrzan rast fetusa koji imaju makrocefaliju⁶⁸. Za razliku od toga, prekomjeran ili isključiv broj očevih haploidnih genoma dovodi do razvoja hidatiformne mole, s izrazitim razvojem placente i odsutnim razvojem fetusa. Iako su opisane i parcijalna i kompletna mola s diploidnim, tetraploidnim i mozaičnim kariotipovima, na razvoj parcijalne i kompletne mole ne utječe ploidnost, već brojčani omjer majčinih i očevih kromosoma, odnosno upisanih gena^{49,69}. Primjerice, tetraploidija bez majčinog genoma se razvija u kompletnu molu, a ukoliko postoji barem jedan haploidni set majčinih kromosoma, razvija se parcijalna mola. Učestale kompletne mole, koje imaju normalan diploidni genom podrijetlom od oca i majke, nastaju zbog greške u *postavljanju genomskog upisa* tijekom oogeneze. Zbog toga u haploidnom genomu jajne stanice ženski aleli upisanih gena nose oznake muških alela, pa u zigoti dolazi do gubitka pravilnog *genomskog upisa*, poremećenog odnosa majčinih i



Slika 4. Mehanizam nastanka parcijalne mole.

Figure 4. Mechanisms of origin of partial mole.

A) oplodnja jajne stanice s dva spermija (dispermija)

B) oplodnja jajne stanice s diploidnim spermijem

PARCIJALNA HIDATIFORMNA MOLA

Za razliku od euploidne kompletne mole, *parcijalna mola hidatidosa* najčešće ima triploidni kariotip koji se sastoji od dva haploidna genoma oca i jednog haploidnog genoma majke (69xxy, 69xxx, 69xyy)³⁸. *Parcijalna mola* najčešće nastaje kao posljedica oplodnje jajne stanice s dva spermija (dispermija) ili s diploidnim spermijem (uzrok nerazdvajanje tijekom prve ili druge mejozičke diobe) (slika 4)⁶⁴. U *parcijalnoj moli* postoje korionske resice normalne morfologije te manji dio edematoznih, cistično promijenjenih (hidropskih) resica s lokalno ograničenom hiperplazijom trofoblasta.

očevih alela upisanih gena, odnosno prekomjerne količine očevih alela.

Nepravilan omjer majčinih i očevih kromosoma rezultira prekomjernom ili nedovoljnom količinom *upisanih gena*. S obzirom na to da *genomski upisani geni* reguliraju rast i razvoj embrija i placente, te nadziru glavne funkcije na fetoplacentarnoj jedinici, poremećaji u ovim precizno reguliranim mehanizmima dovode do poremećaja funkcije placente i razvoja embrija. Majčin i očev genom pridonose razvoju različitih struktura embrija tijekom trudnoće, pa tako *upisani geni* koji su aktivni s očevog genoma pridonose invazivnosti placente i povećavaju fetoplacentarno iskorištavanje majčinih resursa, dok majčin genom potiskuje invaziju, regulira iskorištavanje hranjivih tvari i potiče razvoj fetalnog mozga¹⁸. Višak ili odsutnost roditeljskih genoma dovodi do poremećaja u funkcijama koje nadziru.

MALIGNNE NOVOTVORINE TROFOBLASTA

Maligne *gestacijske trofoblastične bolesti* mogu se razviti iz svih oblika patoloških trudnoća, *de novo* nakon normalne trudnoće, spontanog i induciranog prekida trudnoće ili ektopične trudnoće³⁰. Najčešće, međutim, nastaju iz hidatiformnih mola, pa tako čak 15% potpunih mola prelazi u maligne novotvorine trofoblata⁷⁰. Sve novotvorine trofoblata, a poglavito koriokarcinom, pokazuju iznimno visoke razine ekspresije HLA-G molekule, za koju se smatra da sudjeluje u uspostavljanju imunotolerancije ploda tijekom trudnoće, što zasigurno pridonosi izbjegavanju imunološkog odgovora i potiče tumorski rast⁷¹.

Implantacija u čovjeka je genetički precizno kontroliran invazivni proces tijekom kojeg stanice trofoblata proliferiraju i prodiru u endometriju i miometriju kako bi dospjele do majčinih spiralnih arterija. Neprimjerena ekspresija gena koji reguliraju implantaciju dovodi do abnormalne invazije koja može predstavljati premalignu leziju ili visoko malignan proces kao što je to slučaj s *gestacijskim trofoblastičnim bolestima*. Tijekom normalne implantacije, stanice trofoblata luče *matriks metaloproteinaze* (engl. matrix metalloproteinase, MMP), enzime koji razgrađuju i remodeliraju izvanstanični matriks, a stanice endometrija luče *inhibitore matriks metaloproteinaza* (engl. tissue

inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP) čime reguliraju invazivnost trofoblata. Maligne novotvorine trofoblata luče visoke razine MMP-a i vrlo niske razine TIMP-ova čime ove novotvorine dobivaju sposobnost nekontrolirane invazije i metastaziranja⁷².

MOLA INVASIVA (CHORIOADENOMA DESTRUENS)

Invazivna ili destruirajuća mola ima slične histološke karakteristike kao i klasična molarna trudnoća, ali pojedine korionske resice imaju hiperplastični epitel koji je na pojedinim mjestima atipičan i pokazuje veću sklonost invazivnom rastu³³. Karakteriziraju je povećane molarne resice koje prodiru duboko u mišićni sloj maternice, a iznimno rijetko mogu i metastazirati. *Invazivna mola* ima manji maligni potencijal od *kompletne mole* i vrlo rijetko prelazi u koriokarcinom. Može se povući spontano.

S obzirom na to da više od 15% molarnih trudnoća napreduje u *invazivnu molu*, one su većinom diploidne, iako je moguća i aneuploidija, kao i mozaicizam diploidnih stanica s visokim postotkom stanica s tetraploidnim genomom⁷³.

KORIOKARCINOM

Koriokarcinom je najmalignija novotvorina trofoblastnog podrijetla koja ne sadrži korionske resice, već je karakterizira invazivna proliferacija stanica sincicio-, cito- i ekstraviloznog trofoblata koje pokazuju visok stupanj anaplazije i sposobnost metastaziranja, a okružene su zonama nekroze i krvarenja⁷⁰. Struktura genoma matičnih stanica citotrofoblata određuje specifičnu diferencijaciju trofoblata u novotvorinu koja će oponašati određeni stadij ranog razvoja placente. Tako je koriokarcinom najnezreliji oblik novotvorina trofoblata jer stanice nalikuju onima iz primitivnog trofoblata previloznog stadija razvoja placente, za razliku od tumora ležišta placente i epiteloidnog tumora trofoblata koji pokazuju određeni stupanj diferencijacije. Koriokarcinom ima većinom aneuploidni kariotip, te pokazuje širok spektar kromosomskih abnormalnosti (delecije, translokacije, inverzije), ali niti jedna promjena nije specifična baš za ovaj tumor⁷⁴.

Koriokarcinom se može razviti iz bilo kojeg oblika trudnoće, pa struktura njegovog genoma i ploidnost ovisi iz koje je trudnoće nastao. Oko 30% koriokarcinoma nastaje iz tkiva placente koje je ostalo u maternici nakon spontanog pobačaja, a može se razviti i iz normalnog tkiva placente tijekom trudnoće. Najveći broj koriokarcinoma (>50%) nastaje iz *hidatidiformne mole* i to su gotovo uvijek *kompletne mole*. Iako su neke studije pokazale kako homozigotna mola ima veći maligni potencijal zbog homozigotnosti za recesivna genska svojstva, kasnije studije to nisu potvrdile, pa se smatra da je višak očevih gena važniji čimbenik rizika nego recesivna svojstva takvog genoma^{75,76}. Potrebne su, međutim, dodatne studije koje će pokazati koja vrsta mole ima veći rizik od maligne transformacije.

Iako se većina *gestacijskih trofoblastičnih bolesti* može izliječiti kirurškim zahvatom i kemoterapijom, određen broj žena razvija metastatsku bolest koja je otporna na kemoterapiju, pa je stoga razvoj genske dijagnostike od iznimne važnosti⁷⁴. Pomoću genske će dijagnostike također biti moguće odrediti prognostičke čimbenike za prijelaz molarnih trudnoća u koriokarcinom, koji se pomoću patohistoloških i citogenetičkih metoda ne mogu otkriti.

TUMOR LEŽIŠTA PLACENTE

Tumor ležišta placente je rijetka novotvorina trofoblasta, nedovoljno istražena na molekularnoj razini. Sastoji se od slojeva stanica ekstraviloznog trofoblasta i ne sadrži korionske resice. Većina ovih tumora ima diploidni kariotip, a na molekularnoj razini su povezani s abnormalnom ekspresijom gena koji reguliraju stanični ciklus⁷⁷. Nastaje na mjestu implantacije trofoblasta i može nastati kao komplikacija bilo kojeg oblika trudnoće. Za razliku od koriokarcinoma može nastati i puno vremena nakon završetka trudnoće⁷⁸. Većina ovih tumora je benigna, no u svom malignom obliku iznimno su otporni na kemoterapiju.

RASPRAVA

Embrionalni razvoj je (epi)genetički fenomen tijekom kojeg se razlike u obrascima genske ekspresije u različitim organima i tkivima odvijaju bez promjene u DNA sekvenci¹⁴. Koristeći različite

kombinacije epigenetičkih modifikacija na oko 30.000 gena u čovjeka, epigenetička kontrola usmjerava diferencijaciju od zigote koja je totipotentna, preko blastomera i blastociste koje su pluripotentne, do specijaliziranih stanica svakog tkiva i organa.

Genomski upis je jedinstven fenomen u genetici placentarnih sisavaca, ključan za razvoj placente i embrija. Nepravilan omjer majčinih i očevih kromosoma rezultira prekomjernom ili nedovoljnom količinom alela *upisanih gena*. S obzirom na to da su genetički i epigenetički mehanizmi regulacije razvoja stanice precizno kontrolirani, čak i najmanje promjene u funkciji upisanih gena dovode do značajnih poremećaja i brojnih klinički prepoznatljivih sindroma, uključujući patološke trudnoće.

Većina genetičkih ali i negenetičkih studija neuspješnih trudnoća uključuje samo žene, međutim zbog fenomena *genomskog upisa* i ostalih epigenetičkih modifikacija, muškarci, ali i sam embrij, snažno utječu na razvoj normalne i patološke trudnoće. Stoga fenomen trudnoće možemo smatrati *genetičko-hormonalno-imunološkim sukobom triju genoma* (embrij-majka-otac) na fetoplacentarnoj jedinici²⁷. Jedna smo od prvih znanstvenih skupina u svijetu koja genetičke studije neuspješnih trudnoća u čovjeka temelji na istraživanju genetičkih/epigenetičkih promjena u genomima obaju roditelja, s obzirom na to da otac jezgrinom genomu embrija i daljnjem razvoju pridonosi jednako kao i majka²⁷.

Pravilan majčin i očev doprinos genomu zigote nuždan je za pravilan razvoj embrija i formiranje fetoplacentarne jedinice, uključujući niz složenih interakcija između trofoblasta i majčinih decidualnih i vaskularnih endotelnih stanica, te zahtijevaju preciznu vremensku i prostornu regulaciju kontrolnih mehanizama²⁷. Poremećaji u ovim procesima dovode do promjena u trofoblastnom rastu, invaziji, vaskulogenezi i angiogenezi i povezani su s brojnim patologijama trudnoće, uključujući preeklampsiju, rani gubitak trudnoće i intauterini zastoj u rastu⁷⁹.

Uspješna/neuspješna trudnoća, kao na primjeru *gestacijskih trofoblastičnih bolesti*, nije ovisna samo o genetičkoj podlozi genoma oca i majke, nego i o epigenetičkim mehanizmima (*epigene-*

tički potpis) koji određuju kvalitetu i kvantitetu genske ekspresije u embriju i placenti, pa tako *genomski upis* ima ključnu ulogu u patogenezi *gestacijskih trofoblastičnih bolesti*. Kod *kompletnih mola*, gdje su oba kromosomska komplementa očeva podrijetla, postoji prekomjeran razvoj izvanembrionalnih tkiva (embrionalnih ovojnica), dok se fetus uopće ne razvija ili propada vrlo rano. Teratom jajnika koji je genetički analog kompletne mole, posljedica je razvoja diploidne zigote čiji je nasljedni materijal u cijelosti majčina podrijetla, a karakteriziran je razvojem raznovrsnih embrionalnih tkiva, dok izvanembrionalne strukture u potpunosti nedostaju⁸⁰.

Osim što ovi nalazi dokazuju da su za pravilan embrionalan razvoj potrebni majčin i očev haploidni genom u zigoti, oni također upućuju na to da pokretanje razvoja embrionalnih struktura određuju *genomski upisani geni* čiji su aleli aktivni na majčinom haploidnom genomu, a da razvoj izvanembrionalnih struktura usmjeravaju aleli koji su aktivni na očevom haploidnom genomu.

Smatra se da je *genomski upis* nastao kao posljedica "sukoba" između različitih majčinih i očevih zahtjeva u reprodukciji sisavaca. Očev genom pridonosi invazivnosti placente i povećava iskorištavanje majčinih resursa na fetoplacentarnoj jedinici, dok majčin genom potiskuje invazivnost, potiče razvoj fetalnih tkiva i modulira prijenos hranjivih tvari kako bi ih sačuvala primarno za sebe, ali i za sljedeće potencijalne trudnoće⁸¹. U tom smislu, postoji genski sukob između majke i fetusa, odnosno u samoj fetalnoj stanici između gena podrijetlom od majke i oca.

Rana trudnoća je razdoblje genetički i epigenetički precizno reguliranih događaja u embriju i placenti tijekom kojeg se odvijaju dva ključna procesa koja su preduvjet uspješne trudnoće – trofoblastna invazija, te vaskulogeneza i angiogeneza čime se uspostavlja uteroplacentarna i fetoplacentarna cirkulacija. S obzirom na to da *upisani geni* utječu na rast fetusa i placente putem regulacije vaskuloge-

neze i angiogeneze, te da je glavna funkcija placente olakšati izmjenu hranjivih i štetnih tvari između fetusa i majke, nepravilnosti *genomskog upisa* izravno utječu na ove procese. Stoga većina poremećaja placente ima polazište u ranoj trudnoći.

U kompliciranim trudnoćama, gdje postoji prekomjerna prodornost trofoblasta (*placenta accreta*, invazivna mola, koriokarcinom, tumor ležišta placente) ili nedovoljna prodornost trofoblasta (preklampsija, intauterini zastoj u rastu), dolazi do neadekvatne pretvorbe spiralnih arterija, pa je

Gestacijska trofoblastična bolest naziv je za heterogenu skupinu novotvorina koje nastaju iz trofoblastnih stanica placente, uključujući *hidatiformnu molu* (kompletna i parcijalna), *invazivnu molu*, *tumor ležišta placente*, *koriokarcinom* i ostale rijetke i neklasificirane promjene trofoblasta. *Epigenetički poremećaji*, uključujući nepravilan omjer majčinih i očevih kromosoma i *genomski upisanih gena*, te nepotpuno i nepravilno *epigenetičko reprogramiranje tijekom gametogeneze*, pridonose nastanku *gestacijskih trofoblastičnih bolesti*, sporadičnim i spontanim pobačajima, te su uzrokom neuspješnog embrionalnog razvoja kod kloniranja i oplodnje *in vitro*.

normalna krvna opskrba fetusa, kao i zdravlje same majke znatno ugroženo.

Uspješan preimplantacijski i postimplantacijski embrionalni razvoj ovisi o genskoj predispoziciji koja utječe na razvoj patoloških trudnoća. *Epigenetički defekti (epimutacije)* glavnih gena koji reguliraju embrionalni razvoj mogu biti posljedica nasljedne predispozicije za *epigenetičku nestabilnost*⁸². Primjerice, žene koje su recesivni homozigoti za mutaciju u NALP7 genu imaju gensku predispoziciju za *epigenetičku nestabilnost*, što dovodi do nepravilnog *genomskog upisa* i učestale *kompletne hidatiformne mole*.

Predispoziciju za patološke trudnoće čine, također, i genske varijacije u ključnim genima rane trudnoće. Jedan od glavnih gena koji usmjerava razvoj embrija i placente je glavni fetalni faktor rasta, *Igf2 (engl. insulin-like growth factor 2)*, koji je genomski upisan (utihnut) na majčinom alelu i aktivan samo s očevog alela. Genske varijacije u *Igf2* mijenjaju razinu njegove ekspresije u plodu i placenti, pa tako smanjena razina *Igf2* dovodi do

intrauterinog zastoja u rastu, a prevelika razina Igf2 pridonosi invazivnosti koriokarcinoma⁸³. U svojim smo studijama pokazali da u parova s idiopatskim učestalim spontanim pobačajima, genske varijacije u Igf2 genu u muškaraca snažno doprinose njihovoj etiologiji. S obzirom na to da je Igf2 izražen samo s očevog alela, u zigoti će aktivan alel biti onaj koji je naslijeđen od oca, a ne od majke, što je izravan dokaz da je i očev genom podjednako važan u razvoju trudnoće i da njegova genska struktura pridonosi etiologiji neuspješnih trudnoća.

Iako su po genskoj strukturi genomi oca i majke identični, oni nisu jednaki i funkcionalno, te je za uspješnu trudnoću nužna prisutnost oba roditeljska genoma u zigoti. *Genomski upis* je posljedica *epigenetičkih modifikacija* koje dovode do ekspresije samo jednog alela istog gena ovisno o roditeljskom podrijetlu i jedan je od najvažnijih regulacijskih mehanizama na fetoplacentarnoj jedinici, uključujući kontrolu rasta i razvoja embrija, proliferacije i invazivnosti trofoblasta, vaskulogeneze i angiogeneze, te prijenosa hranjivih tvari. Poremećaji ovih mehanizama dovode do abnormalnog razvoja krvotoka placente ili ploda, s posljedičnim razvojem komplikacija trudnoće, uključujući intrauterini zastoj u rastu ploda, kao i razvoj *gestacijskih trofoblastičnih bolesti*, te EPH gestoza.

Brojne studije su pridonijele napretku dijagnostike i terapije GTB, no za razliku od dobro utvrđenih citogenetičkih i patohistoloških obilježja, temeljni molekularni i stanični mehanizmi nastanka i razvoja GTB još uvijek nisu poznati. Razumijevanje ovih mehanizama je od ključne važnosti ne samo zbog unapređenja terapije GTB nego i zbog razumijevanja normalnih mehanizama trudnoće, uključujući način na koji majčin i očev genom različito nadziru i usmjeravaju genetičke mehanizme koji određuju razvoj trudnoće.

NEOPHODNOST GENSKE DIJAGNOSTIKE U KLINIČKOJ DIJAGNOSTICI GTB

Danas se konačna dijagnoza molarne trudnoće temelji na patohistološkom nalazu, međutim precizna dijagnoza moguća je samo nakon gene-

tičke analize⁸⁴. Patohistološke studije nisu dovoljne za razlikovanje kompletne od parcijalne mole. *Parcijalna mola* može se zamijeniti s hidropskim pobačajem, a isto tako nemolarne trudnoće koje nastaju zbog kromosomskih abnormalnosti mogu pokazivati hidropske promjene resica i hiperplaziju trofoblasta⁸⁵. Kao dopunsku metodu patohistološkoj analizi ploda moguće je napraviti genetičku analizu (kariotipizacija, protočna citometrija i fluorescentna in-situ hibridizacija – FISH), pomoću koje se može razlikovati nemolarni spontani pobačaj od molarne

trudnoće, te koja može odrediti vrstu hidatiformne mole⁸⁴. U žena s više od dvije *kompletne mole*, bez normalnih trudnoća i s prethodnim spontanim pobačajima ili *parcijalnom molom*, može se učiniti genska analiza NALP7 gena. Također, pomoću imunohistokemijskih metoda može se detektirati ekspresija *upisanih gena* (karakteristična u molarним trudnoćama) i razlikovati parcijalna od kompletne mole. CDKN1C gen, koji je aktivan samo na majčinom alelu, gubi ekspresiju u potpunim molama, a imunohistokemijskim bojanjem njegov pro-

dukt, protein p57^{KIP2}, nedostaje u viloznom citotrofoblastu i viloznom mezenhimu⁸⁶.

Genetička analiza omogućuje precizniju dijagnozu i primjereno usmjeravanje liječenja. Smatra se da je rizik od maligne transformacije patohistološki potvrđenog nemolarnog pobačaja manji od 1:50.000, pa je vjerojatno većina gestacijskih novotvorina trofoblasta koje su prethodno dijagnosticirane kao nemolarni pobačaj, vjerojatno samo rani stadij neprepoznate molarne trudnoće⁸⁷.

BUDUĆE SMJERNICE

Epigenetički poremećaji, uključujući nepravilan omjer majčinih i očevih kromosoma i *genomski upisanih gena*, te nepotpuno i nepravilno *epigenetičko reprogramiranje tijekom gametogeneze*, pridonose nastanku *gestacijskih trofoblastičnih*

bolesti, sporadičnim i spontanim pobačajima, te su uzrokom neuspješnog embrionalnog razvoja kod oplodnje *in vitro* i u kloniranih životinja. Nadalje, iako nose identične ili slične DNA sljedove, jednojajčani blizanci mogu pokazivati brojne epigenetičke razlike. Tako *epimutacije* mogu uzrokovati pojavu određenih kliničkih simptoma samo u jednog blizanca. Čak i da oba blizanca imaju genetičku podlogu istovrsne nasljedne bolesti, malo je vjerojatno da će u njih epimutacija napredovati jednakomjerno, što ukazuje da bi takve epigenetičke razlike u kritičnoj DNA regiji mogle rezultirati razlikama u pojavnosti i izražajnosti određenih simptoma.

Precizna uloga *epigenetičkih promjena* u normalnim i patološkim trudnoćama još uvijek nije poznata, no stalni napredak u području (epi)genetike reprodukcije otvara mogućnost da će dijagnostika i liječenje *gestacijskih trofoblastičnih bolesti* u skoroj budućnosti biti usmjereni upravo na epigenetičke mehanizme. Smanjenjem rizika od *epigenetičkih nestabilnosti* koje vode nastajanju bolesti, te ispravljanjem *epigenetičkih abnormalnosti*, moguće je epigenetičku terapiju unaprijediti do stupnja u kojem će predstavljati esencijalni oblik liječenja bolesti nastalih promjenama u genskoj ekspresiji.

LITERATURA

- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2001;345:1400–8.
- Forbes LS. The evolutionary biology of spontaneous abortion in humans. *Trends Ecol Evol* 1997;12:446–50.
- Kelly TLJ, Trasler JM. Reproductive epigenetics. *Clin Genet* 2004;65:247–60.
- Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr* 2007;27:363–88.
- Cross JC. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev* 2006;18:71–6.
- Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction* 2003;126:569–77.
- Soundararajan R, Rao AJ. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': significance and contributory factors. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:15.
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:6.
- Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* 2007;25:445–53.
- Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. HLA-G expression is a fundamental prerequisite to pregnancy. *Hum Immunol* 2007;68:244–50.
- Hustin J, Jauniaux E, Schaaps JP. Histological study of the materno–embryonic interface in spontaneous abortion. *Placenta* 1990;11:477–86.
- Jauniaux E, Burton GJ. Pathophysiology of histological changes in early pregnancy loss. *Placenta* 2005;26:114–23.
- Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006;12:747–55.
- Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007;447:425–32.
- Nightingale KP, O'Neill LP, Turner BM. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:125–36.
- McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984;37:179–83.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984;308:548–50.
- Barton SC, Surani MA, Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 1984;311:374–6.
- Sturm KS, Flannery ML, Pedersen RA. Abnormal development of embryonic and extraembryonic cell lineages in parthenogenetic mouse embryos. *Dev Dyn* 1994;201:11–28.
- Luedi PP, Hartemink AJ, Jirtle RL. Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 2005;15:875–84.
- Reik W, Constância M, Fowden A, Anderson N, Dean W, Ferguson-Smith A et al. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes. *J Physiol* 2003;547:35–44.
- Rahnama F, Shafiei F, Gluckman PD, Mitchell MD, Lobie PE. Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology* 2006;147:5275–83.
- Goshen R, Ben-Rafael Z, Gonik B, Lustig O, Tannos V, deGroot N et al. The role of genomic imprinting in implantation. *Fertil Steril* 1994;62:903–10.
- Mayer W, Hemberger M, Frank HG, Grümmer R, Winterhager E, Kaufmann P et al. Expression of the imprinted genes MEST/Mest in human and murine placenta suggests a role in angiogenesis. *Dev Dyn* 2000;217:1–10.
- Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet* 2005;6:403–10.
- Coan PM, Burton GJ, Ferguson-Smith AC. Imprinted genes in the placenta—A review. *Placenta* 2005;26:10–20.
- Ostojić S, Perez N, Volk M, Kapović M, Peterlin B. Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: contribution of genetic variations in IGF-2 and H19 imprinted genes. *Am J Reprod Immunol* 2008; In press.

28. Hitchens MP, Moore GE. Genomic imprinting in fetal growth and development. *Expert Rev Mol Med* 2002;4:1-19.
29. Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M: Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res* 2006;65:50-8.
30. World Health Organization Scientific Group: Gestational Trophoblastic Disease. WHO Tech Rep Ser 1983;692: 1-80.
31. Tham KF, Ratnam SS. The classification of gestational trophoblastic disease: a critical review. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;60:39-49.
32. Shih IeM. Gestational trophoblastic neoplasia—pathogenesis and potential therapeutic targets. *Lancet Oncol* 2007;8:642-50.
33. Altieri A, Franceschi S, Ferlay J, Smith J, La Vecchia C. Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol* 2003;4:670-8.
34. Sebire NJ, Foskett M, Fisher RA, Rees H, Seckl M, Newlands E. Risk of partial and complete hydatidiform molar pregnancy in relation to maternal age. *BJOG* 2002;109:99-102.
35. La Vecchia C, Parazzini F, Decarli A, Franceschi S, Fasoli M, Favalli G et al. Age of parents and risk of gestational trophoblastic disease. *J Natl Cancer Inst* 1984;73: 639-42.
36. Parazzini F, La Vecchia C, Pampallona S. Parental age and risk of complete and partial hydatidiform mole. *Br J Obstet and Gynaecol* 1986;93:582-5.
37. Szulman AE, Surti U. The syndromes of hydatidiform mole. I. Cytogenetic and morphologic correlations. *Am J Obstet Gynecol* 1978a;131:665-71.
38. Szulman AE, Surti U. The syndromes of hydatidiform mole. II. Morphologic evolution of the complete and partial mole. *Am J Obstet Gynecol* 1978b;132:20-7.
39. Slim R, Mehio A. The genetics of hydatidiform moles: new lights on an ancient disease. *Clin Genet* 2007;71: 25-34.
40. Berkowitz RS, Goldstein DP. Chorionic tumours. *N Engl J Med* 1996;335:1740-8.
41. Kovacs BW, Shahbahrani B, Tast DE, Curtin JP. Molecular genetic analysis of complete hydatidiform moles. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;54:143-52.
42. Lurain JR. Gestational trophoblastic tumors. *Seminars in Surgical Oncology* 1990;6:347-53.
43. Kajii T, Ohama K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature* 1977;268:633-4.
44. Lawler SD, Pickthall VJ, Fisher RA, Povey S, Evans MW, Szulman AE. Genetic studies of complete and partial hydatidiform moles. *Lancet* 1979;2:580.
45. Petignat P. Gestational trophoblastic diseases. Potential mechanism of formation of complete diploid moles. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2000;29:687-9.
46. Ohama K, Kajii T, Okamoto E, Fukuda Y, Imaizumi K, Tsukahara Met al. Dispermic origin of XY hydatidiform moles. *Nature* 1981;29:551-2.
47. Zaragoza MV, Surti U, Redline RW, Millie E, Chakravarti A, Hassold TJ. Parental origin and phenotype of triploidy in spontaneous abortions: predominance of diandry and association with the partial hydatidiform mole. *Am J Hum Genet* 2000;66:1807-20.
48. Azuma C, Saji R, Tokugawa Y, Kimura T, Nobunaga T, Take-mura M et al. Application of gene amplification by polymerase chain reaction to genetic analysis of molar mitochondrial DNA: the detection of anuclear empty ovum as the cause of complete mole. *Gynecol Oncol* 1991;40: 29-33.
49. Vejerslev LO, Fisher RA, Surti U, Wake N. Hydatidiform mole. Cytogenetically unusual cases and their implications for the present classification. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157: 180-4.
50. Goldman-Wohl D, Ariel I, Greenfield C, Hochner-Celnikier D, Lavy Y, Yagel S. A study of human leukocyte antigen G expression in hydatidiform moles. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:476-80.
51. Helwani MN, Seoud M, Zahed L, Zaatari G, Khalil A, Slim R. A familial case of recurrent hydatidiform molar pregnancies with biparental genomic contribution. *Hum Genet* 1999;105,112-5.
52. Ambani LM, Vaidya RA, Rao CS, Daftary SD, Motashaw ND. Familial occurrence of trophoblastic disease—report of recurrent molar pregnancies in sisters in three families. *Clin Genet* 1980;18:27-9.
53. Fisher RA, Hodges MD, Newlands ES. Familial recurrent hydatidiform mole: a review. *J Reprod Med* 2004;49: 595-601.
54. Seoud M, Khalil A, Frangieh A, Zahed L, Azar G, Nuwayri-Salti N. Recurrent molar pregnancies in a family with extensive intermarriage: report of a family and review of the literature. *Obstet. Gynecol* 1995;86:692-5.
55. El-Maarri O, Seoud M, Coullin P, Herbiniaux U, Oldenburg J, Rouleau G et al. Maternal alleles acquiring paternal methylation patterns in biparental complete hydatidiform moles. *Hum Mol Genet* 2003;12:1405-13.
56. Van den Veyver IB, Al-Hussaini TK. Biparental hydatidiform moles: a maternal effect mutation affecting imprinting in the offspring. *Hum Reprod Update* 2006;12: 233-342.
57. Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 2004;127:643-51.
58. Judson H, Hayward BE, Sheridan E, Bonthron DT. A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* 2002;416:539-42.
59. Tuncer ZS, Bernstein MR, Wang J, Goldstein DP, Berkowitz RS. Repetitive hydatidiform mole with different male partners. *Gynecol Oncol* 1999;75: 224-6.
60. Al-Hussaini TK, Abd el-Aal DM, Van den Veyver IB. Recurrent pregnancy loss due to familial and non-familial habitual molar pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2003;83: 179-86.
61. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, Seoud M, Khan R, Kuick R et al. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 2006;38:300-2.
62. Qian J, Deveault C, Bagga R, Xie X, Slim R. Women heterozygous for NALP7/NLRP7 mutations are at risk for reproductive wastage: report of two novel mutations. *Hum Mutat* 2007;28:741.
63. Fisher RA, Khatoon R, Paradinas FJ, Roberts AP, Newlands ES. Repetitive complete hydatidiform mole can be biparental in origin and either male or female. *Hum Reprod* 2000;15:594-8.
64. Lawler SD, Fisher RA, Pickthall VJ, Povey S, Evans MW. Genetic studies on hydatidiform moles. I. The origin of partial moles. *Cancer Genet Cytogenet* 1982;5: 309-20.

65. Jauniaux E. Ultrasound diagnosis and follow-up of gestational trophoblastic disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;11:367-77.
66. Bagshawe KD, Lawler SD, Paradinas FJ, Dent J, Brown P, Boxer GM. Gestational trophoblastic tumours following initial diagnosis of partial hydatidiform mole. *Lancet* 1990;335:1074-6.
67. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 2007;16:R203-8.
68. McFadden DE, Kalousek DK. Two different phenotypes of fetuses with chromosomal triploidy: correlation with parental origin of the extra haploid set. *Am J Med Genet* 1991;38:535-8.
69. Jacobs PA, Szulman AE, Funkhouser J, Matsuura JS, Wilson CC. Human triploidy: relationship between parental origin of the additional haploid complement and development of partial hydatidiform mole. *Ann Hum Genet* 1982;46:223-31.
70. Berkowitz RS, Goldstein DP. Chorionic tumours. *N Engl J Med* 1996;335:1740-8.
71. Singer G, Kurman RJ, McMaster MT, Shih IM. HLA-G immunoreactivity is specific for intermediate trophoblast in gestational trophoblastic disease and can serve as a useful marker in differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2002;26:914-20.
72. Vegh GL, Selcuk Tuncer Z, Fulop V, Genest DR, Mok SC, Berkowitz RS. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. *Gynecol Oncol* 1999;75:248-53.
73. Yang YH, Kwak HM, Park TK, Kim CK, Lee YB. Comparative cytogenetic and clinicopathologic studies on gestational trophoblastic neoplasia, especially hydatidiform mole. *Yonsei Med J* 1986;27:250-60.
74. Shih IM, Kurman RJ. Molecular basis of Gestational Trophoblastic Diseases. *Curr Mol Med* 2002;2:1-12.
75. Wake N, Seki T, Fujita H, Okubo H, Sakai K, Okuyama K et al. Malignant potential of homozygous and heterozygous complete moles. *Cancer Res* 1984;44:1226-30.
76. Fisher RA, Lawler SD. Heterozygous complete hydatidiform moles: do they have a worse prognosis than homozygous complete moles? *Lancet* 1984;2:51.
77. Finkler NJ. Placental site trophoblastic tumor. Diagnosis, clinical behavior and treatment. *J Reprod Med* 1991;36:27-30.
78. Newlands ES, Bower M, Fisher RA, Paradinas FJ. Management of placental site trophoblastic tumors. *J Reprod Med* 1998;43:53-9.
79. Nafee TM, Farrell WE, Carroll WD, Fryer AA, Ismail KM. Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG* 2008;115:158-68.
80. Mutter GL. Role of imprinting in abnormal human development. *Mutat Res* 1997;396:141-7.
81. Abu-Amero S, Monk D, Apostolidou S, Stanier P, Moore G. Imprinted genes and their role in human fetal growth. *Cytogenet Genome Res* 2006;113:262-70.
82. Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update* 2005;11:473-82.
83. Kim SJ, Park SE, Lee C, Lee SY, Kim IH, An HJ et al. Altered imprinting, promoter usage, and expression of insulin-like growth factor-II gene in gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol* 2003;88:411-8.
84. Petignat P, Billieux MH, Blouin JL, Dahoun S, Vassilakos P. Is genetic analysis useful in the routine management of hydatidiform mole? *Hum Reprod* 2003;18:243-9.
85. Chew SH, Perlman EJ, Williams R, Kurman RJ, Ronnett BM. Morphology and DNA content analysis in the evaluation of first trimester placentas for partial hydatidiform mole (PHM). *Hum Pathol* 2000;31:914-24.
86. Fisher RA, Hodges MD, Rees HC, Sebire NJ, Seckl MJ, Newlands ES et al. The maternally transcribed gene p57(KIP2) (CDNK1C) is abnormally expressed in both androgenetic and biparental complete hydatidiform moles. *Hum Mol Genet* 2002;11:3267-72.
87. Sebire NJ, Foscett M, Fisher RA, Lindsay I, Seckl MJ. Persistent gestational trophoblastic disease is rarely, if ever, derived from non-molar first-trimester miscarriage. *Med Hypotheses* 2005;64:689-93.