

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

**«Μηχανισμοί συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη
δράση της προγεστερόνης και της ενδοθηλίνης»**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΠΑΧΟΥΜΗ

ΙΑΤΡΟΣ

ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

Επιβλέπων Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής-
Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής	κ. Ιωάννης Μεσσήνης
Καθηγητής	κ. Πασχάλης- Αδάμ Μολυβδάς
Αν. Καθηγητής	κ. Αθανάσιος Καλλιτσάρης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής	κ. Ιωάννης Μεσσήνης
Καθηγητής	κ. Πασχάλης-Αδάμ Μολυβδάς
Καθηγητής	κ. Δημήτριος Αρβανίτης
Αν.Καθηγητής	κ. Γεώργιος Κουκούλης
Αν.Καθηγητής	κ. Αθανάσιος Καλλιτσάρης
Λέκτορας	κ. Χαρίκλεια Σκέντου
Λέκτορας	κ. Κων/νος Νταφόπουλος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	σελ. 5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 7
ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ	
Βιοχημεία	σελ.8
Μηχανισμός δράσης	σελ.12
Υποδοχείς προγεστερόνης	σελ.14
Κατονομή προγεστερόνης	σελ.16
Δράση προγεστερόνης	σελ.18
ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ 1	
Βιοχημεία	σελ.26
Υποδοχείς ενδοθηλίνης 1	σελ.33
Κατανομή ενδοθηλίνης 1	σελ.36
Δράση ενδοθηλίνης 1	σελ. 39
ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΥΟΜΗΤΡΙΟΥ	
Ανατομία	σελ. 45
Φυσιολογία	σελ. 48
Βιοχημεία συστολής	σελ. 52
Επίδραση προγεστερόνης στη συσταλτικότητα του μυομητρίου	σελ. 60
Επίδραση ενδοθηλίνης 1 στη συσταλτικότητα του μυομητρίου	σελ. 66

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	σελ. 69
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	σελ.70
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ.72
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ	σελ.73
Πειραματικό πρωτόκολλο προγεστερόνης	σελ.80
Πειραματικό πρωτόκολλο ενδοθηλίνης 1	σελ. 86
Μελέτη αποτελεσμάτων	σελ. 92
Στατιστική ανάλυση	σελ. 93
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
Πειραματικό πρωτόκολλο προγεστερόνης	σελ. 95
Πειραματικό πρωτόκολλο ενδοθηλίνης 1	σελ. 110
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ. 135
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ. 157
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ. 159
SUMMARY	σελ. 163
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ. 167

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συσταλτικότητα του μυομητρίου είναι αντικείμενο μεγάλου αριθμού ερευνών τα τελευταία χρόνια, λόγω του σημαντικού ρόλου της τόσο κατά τη διάρκεια του τοκετού όσο και κατά τα πρώτα στάδια της κύησης όπου έχει σημαίνοντα ρόλο στην εμφύτευση του κυήματος. Η προγεστερόνη είναι μία από τις στεροειδείς ορμόνες η οποία φαίνεται να έχει κατασταλτική δράση στη συσταλτικότητα του μυομητρίου. Δεν είναι όμως ξεκάθαρος ο μηχανισμός δράσης της. Η ενδοθελίνη 1 είναι ισχυρό αγγειοσυσταλτικό πεπτιδίο παρατεταμένης δράσης που έχει ρυθμιστική δράση στη συσταλτικότητα του μυομητρίου δρώντας κυρίως ως τοπικά εκλυόμενος παράγοντας. Και για την ενδοθελίνη 1 οι ακριβείς βιοχημικοί μηχανισμοί δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί .

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης και της ενδοθελίνης. Μελετήθηκε η δράση των ορμονών ξεχωριστά, αλλά και η επίδραση που είχε η προγεστερόνη, στη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της ενδοθελίνης 1.

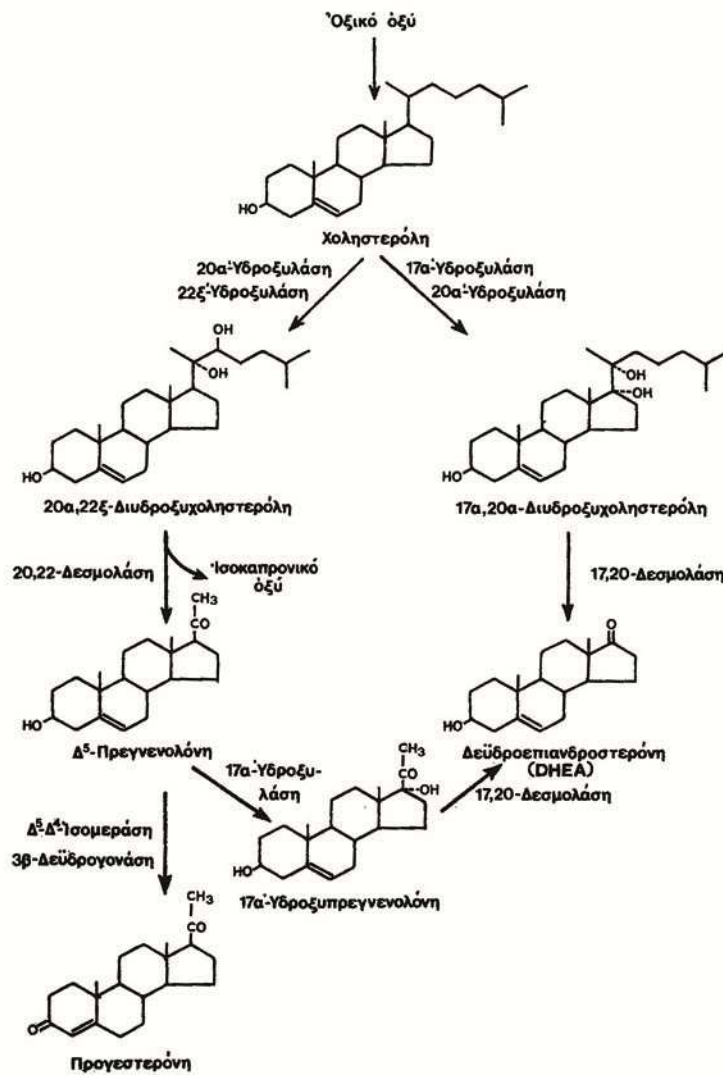
Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας, κ. Ιωάννη Μεσσήνη που μου ανέθεσε την εργασία αυτή, καθώς και για την άρτια επιστημονική καθοδήγηση, την κατανόηση και την υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά, και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη για την αμέριστη βοήθειά τους.

Η μελέτη αυτή προέρχεται από τη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα πειράματα εκπονήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου και στον τεχνικό κ.Ιωάννη Μακαντάση, για την πολύτιμη βοήθειά τους.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ.



Σχήμα 1 : Βιοσύνθεση των στεροειδών.

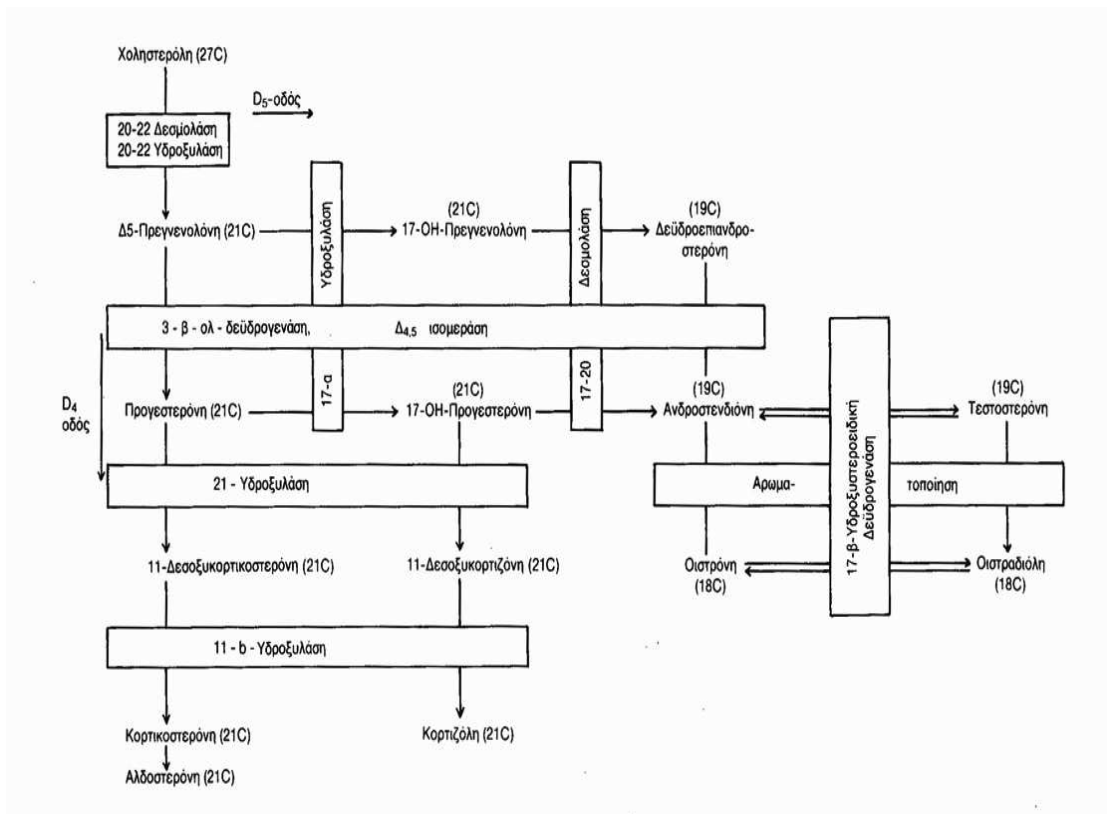
Η προγεστερόνη ανήκει στην ομάδα των στεροειδών ορμονών. Πρόδρομος ουσία των στεροειδών ορμονών είναι η χοληστερόλη κυρίως

αυτή που κυκλοφορεί στο αίμα υπό μορφή χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (LDL – low density lipoproteins). Όλα τα όργανα που συνθέτουν στεροειδή (εκτός του πλακούντα) έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν χοληστερόλη από οξεικό οξύ. Η χοληστερόλη του αίματος εισέρχεται στα κύτταρα που συνθέτουν στεροειδή μέσω ειδικού υποδοχέα της μεμβράνης.

Βασική δομή των στεροειδών ορμονών είναι ο δακτύλιος κυκλοπεντανοπερυδροφαιναθρένιο, ο οποίος αποτελείται από τρεις δακτυλίους με έξι άτομα άνθρακα και έναν με πέντε άτομα άνθρακα. Ο αριθμός των ατόμων άνθρακα είναι αυτός που χαρακτηρίζει τα στεροειδή. Έτσι διακρίνονται τα C₂₁ – στεροειδή στα οποία ανήκουν τα κορτικοστεροειδή και η προγεστερόνη, τα C₁₉ στεροειδή στα οποία περιλαμβάνονται τα ανδρογόνα και τα C₁₈ –στεροειδή στα οποία ανήκουν τα οιστρογόνα.

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στη στεροειδογένεση είναι είτε δευδρογενάσες είτε μέλη της ομάδας του κυτοχρώματος P450 οξυδασών, που δρουν στα μιτοχόνδρια. Κατά τη σύνθεση της προγεστερόνης λαμβάνουν χώρα οι παρακάτω αντιδράσεις:

- Αποκοπή της πλαγίας αλύσου (δράση δεσμολάσης)
- Μετατροπή υδροξυλομάδων σε κετομάδες ή κετομάδων σε υδροξυλομάδες (δράση δευδρογενάσης)
- Προσθήκη υδροξυλομάδας (δράση υδροξυλάσης)
- Δημιουργία διπλών δεσμών
- Προσθήκη υδρογόνου σε διπλό δεσμό.



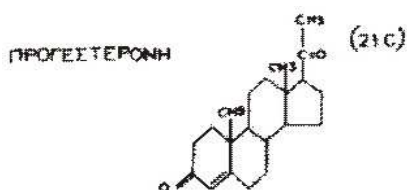
Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση των βιοχημικών αντιδράσεων που συμμετέχουν στη σύνθεση προγεστερόνης.

Μετά τη σύνθεση της Δ5-πρεγνενολόνης είναι δυνατόν να ακολουθήσουν δύο βιοσυνθετικές οδοί :

A. Η Δ5- οδός όπου η Δ5 πρεγνενολόνη γίνεται 17-OH πρεγνενολόνη και μετά δεϋδροεπιανδροστερόνη

B. Η Δ4-οδός όπου η Δ5 πρεγνενολόνη γίνεται προγεστερόνη και μετά 17-OH-προγεστερόνη.

Ο χημικός τύπος της προγεστερόνης είναι:



Η σύνθεση των στεροειδών λαμβάνει χώρα μέσα στο κυτταρόπλασμα, στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων που τα παράγουν. Ο έλεγχος της σύνθεσης των στεροειδών ορμονών γίνεται μέσω της περιοριστικής δράσης των ενζύμων της βιοσυνθετικής οδού. Αυτό γίνεται με τη δράση των τροπικών ορμονών (FSH, LH) μέσω του συστήματος κυκλικού-αδενοσινομονοφωσφορικού οξέος.

Η χοληστερόλη που χρησιμοποιείται στη σύνθεση των στεροειδών προέρχεται από την κινητοποίηση και μεταφορά της από τον εξωκυττάριο χώρο. Μετά από σύνδεσή της με ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων μεταφέρεται στο εσωτερικό τους όπου υπάρχει το σύμπλεγμα ενζύμων του κυττοχρώματος P450 που συμμετέχει στη στεροειδογένεση.

Ο ρυθμός μεταφοράς της χοληστερόλης διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης επηρεάζεται από τα επίπεδα FSH και LH. Ο ρυθμός παραγωγής της προγεστερόνης είναι συνδυασμός των εκκρίσεων της από τα επινεφρίδια και τις ωοθήκες. Περιφερική μετατροπή των στεροειδών σε προγεστερόνη δε συμβαίνει σε μη εγκύμων θήλυ.

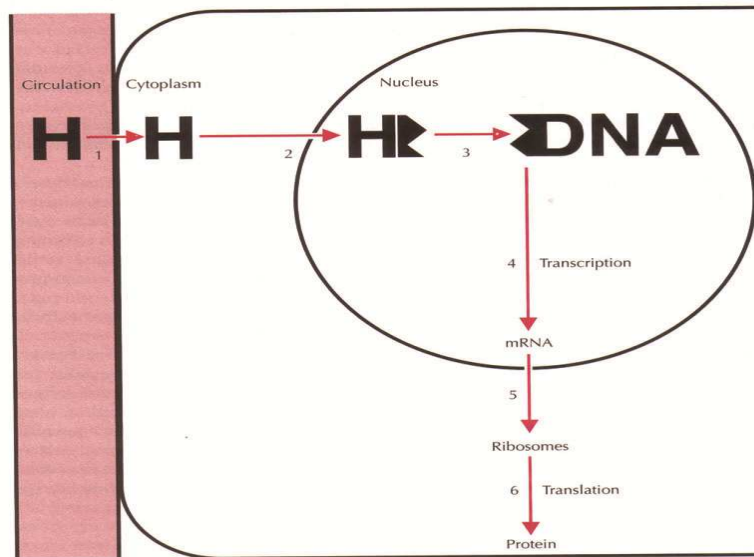
Το ποσοστό που παράγεται από τα επινεφρίδια είναι μικρό. Τα κύτταρα της θήκης του ωοθυλακίου είναι τα κύτταρα στόχοι της LH και η κύρια πηγή της προγεστερόνης ενώ κατά την ωχρινική φάση είναι το ωχρό σωματίο.

Η προγεστερόνη μεταβολίζεται σε 20-διυδρο-προγεστερόνη και μετά σε πρεγνανδιόλη, η οποία απεκκρίνεται στα ούρα.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών στα κύτταρα στόχους βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Είναι πρωτεΐνες
- Η σύνθεσή τους γίνεται στο πρωτόπλασμα των κυττάρων και μετά μεταφέρονται στον πυρήνα διαμέσου των οπών της πυρηνικής μεμβράνης.
- Αρχικά οι στεροειδείς ορμόνες εισέρχονται από τον εξωκυττάριο χώρο μέσα στο πρωτόπλασμα των κυττάρων στόχων. Ακολουθεί η σύνδεσή τους με τους πυρηνικούς υποδοχείς και η ενεργοποίηση των τελευταίων. Η ενεργοποίηση αυτή περιλαμβάνει αλλαγή στο σχήμα και το μέγεθος του υποδοχέα, απόσπαση φωσφορικών ριζών και άλλες αλλαγές που έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την ισχυρή σύνδεση του υποδοχέως με το DNA των κυττάρων.
- Η σύνδεση με το DNA οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδίων τα οποία συνθέτουν αρχικά αγγελιοφόρο RNA (m RNA), το οποίο με τη σειρά του προκαλεί στα ριβοσωμάτια του πρωτοπλάσματος σύνθεση πρωτεϊνών.
- Η ενεργοποίηση του υποδοχέα μεταβάλλει και τη χημική συγγένεια του υποδοχέα με τη στεροειδή ορμόνη. Μετά την ολοκλήρωση της πρωτεϊνοσύνθεσης η χημική αυτή συγγένεια ελαττώνεται και γίνεται η αποσύνδεση της ορμόνης από τον υποδοχέα της.

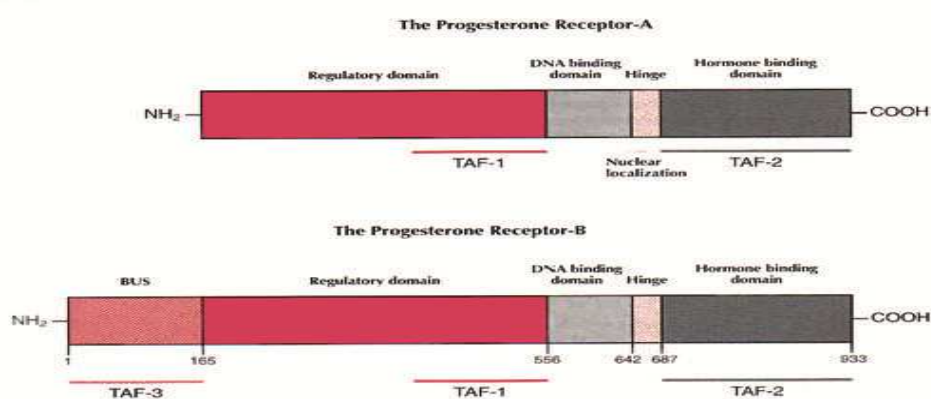


Σχήμα 3: Μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών.

1. Είσοδος της ορμόνης στο κύτταρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης
2. Σύνδεση της ορμόνης με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα
3. Αλληλεπίδραση του συμπλέγματος υποδοχέα ορμόνης με το πυρηνικό DNA.
4. Μεταγραφή του DNA και δημιουργία του mRNA
5. Μεταφορά του mRNA στα ριβοσωμάτια
6. Μετάφραση σύνθεση της πρωτεΐνης στα ριβοσωμάτια.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ.

Ο υποδοχέας προγεστερόνης προωθείται από τα οιστρογόνα στο επίπεδο της μεταγραφής και μειώνεται από τα προγεσταγόνα στο επίπεδο της μετάφρασης. Οι υποδοχείς προγεστερόνης έχουν δύο τύπους, τους A και B υποδοχείς, με βάση τη συνδεόμενη με αυτούς πρωτεΐνη. Οι δύο τύποι εκφράζονται από το ίδιο γονίδιο, και προκύπτουν από τη μετάφραση δύο διαφορετικών mRNA που μεταγράφουν διαφορετικές περιοχές του ίδιου γονιδίου. Κάθε τύπος συνδέεται με πρωτεΐνες, που είναι σημαντικές για την αναδίπλωση του πολυπεπτιδίου σε μία τέτοια δομή που επιτρέπει τη σύνδεση με ορμόνες και την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Το μοριακό βάρος του τύπου A είναι 94.000 και του B 114.000 με 933 αμινοξέα, 164 περισσότερα από ότι ο A τύπος (Horwitz and Alexander 1983). Ο τύπος B έχει ένα μοναδικό τμήμα στον μη ενεργό πόλο του υποδοχέα. BUS (B-upstream segment).



Σχήμα 4: Υποδοχείς προγεστερόνης A και B

[TAF (transcriptional activation function) είναι το τμήμα του υποδοχέα που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου μετά τη σύνδεση του υποδοχέα.]

Η μεταγραφή των δύο μορφών ρυθμίζεται από δύο διαφορετικούς προωθητές, που ενεργοποιούνται παρουσία οιστογόνων (Kastner et al 1990). Μελέτες έδειξαν ότι οι δύο τύποι του υποδοχέα παρουσιάζουν διαφορετική εξειδίκευση στο γονίδιο στόχο και έτσι ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στην επίδραση του ίδιου προωθητή (Kastner et al 1990). Στον υποδοχέα προγεστερόνης το TAF-1 βρίσκεται στο 91-αμινοξύ τμήμα ακριβώς στον άλλο πόλο σύνδεσης του DNA. Το TAF-2 βρίσκεται στον χώρο σύνδεσης της ορμόνης. Σε ένα τμήμα στο οποίο λείπει ο χώρος σύνδεσης της πρωτεΐνης, ενεργοποιεί τη μεταγραφή σε επίπεδο συγκρίσιμο με πλήρους μήκους B τύπου υποδοχέα ενεργοποιητή της ορμόνης, και υψηλότερο από ένα A τύπου υποδοχέα. Σε κανονικά κύτταρα υπάρχει και ένας τρίτος χώρος ενεργοποίησης το TAF-3 για την περιοχή BUS (B-upstream segment). Ο παράγοντας TAF-3 μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή αυτόνομα ή συνεργικά με τους άλλους TAFs.

Όταν δεν γίνεται η σύνδεση με την ορμόνη το καρβοξυτελικό τμήμα του προγεστερονικού υποδοχέα λειτουργεί ανασταλτικά στη μεταγραφή.

Οι αγωνιστές προγεστερόνης προκαλώντας δομική αλλαγή εξουδετερώνουν την ανασταλτική δράση του καρβοξυτελικού άκρου του υποδοχέα με αποτέλεσμα την επίτευξη της μεταγραφής. Οι ανταγωνιστές προγεστερόνης προκαλώντας άλλου τύπου δομική αλλαγή συνεισφέρουν στην ανασταλτική δράση, και επομένως στην αναστολή της μεταγραφής.

Μελέτες δείχνουν ότι οι δύο υποδοχείς μπορούν να ρυθμίζονται ανεξάρτητα. Για παράδειγμα τα σχετικά επίπεδα διαφέρουν στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Η ειδικότητα των ιστών σε υποδοχείς

προγεστερόνης επηρεάζεται από το ποιος υποδοχέας και ποιο διμερές είναι ενεργά, και επιπρόσθετα οι μεταγραφικές δραστηριότητες των A και B εξαρτώνται από τις διαφορές των κυττάρων στόχων. Ωστόσο στα περισσότερα κύτταρα ο υποδοχέας B είναι θετικός ρυθμιστής των γονιδίων που είναι ευαίσθητα στην προγεστερόνη, και ο υποδοχέας A αναστέλλει τη δράση του B υποδοχέα (Savouret et al 1998). Μεταλλάξεις στο καρβοξυτελικό άκρο του B υποδοχέα επηρεάζει τη μεταγραφική του ικανότητα. Μεταλλάξεις στον υποδοχέα A δεν έχουν επίδραση στην ανασταλτική τους δράση στη μεταγραφή. Αυτό δείχνει δύο διαφορετικές βιοχημικές οδούς για την ενεργοποίηση και την καταστολή της μεταγραφής από τους προγεστερονικούς υποδοχείς. Έτσι η μεταγραφική δραστηριότητα των οιστρογονικών υποδοχέων εξαρτάται από την έκφραση του υποδοχέα A.

Η ευρεία δράση του υποδοχέα A, όσον αφορά όλα τα στεροειδή δείχνει ότι αυτός ο υποδοχέας ρυθμίζει τη δράση των στεροειδών ορμονών όπου μπορεί να εκφραστεί.

Κατανομή των υποδοχέων στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα όσον αφορά την κατανομή των υποδοχέων στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Η συγκέντρωση των οιστρογονικών και των προγεστερονικών υποδοχέων διαφοροποιείται σε σχέση με το ορμονικό περιβάλλον και τον τύπο των κυττάρων όπου εντοπίζονται (ενδομήτριο, μυομήτριο, ωοθήκες) (Gorodeski et al 1988, Ravn et al 1994, Konopka et al 1998). Η οιστραδιόλη προάγει εκτός από τη σύνθεση των δικών της υποδοχέων, και την σύνθεση των υποδοχέων προγεστερόνης. Η προγεστερόνη από την άλλη δείχνει να αυτοπεριορίζεται.

Ο αριθμός των υποδοχέων μέσω των οποίων δρούν οι στεροειδείς ορμόνες δεν παρουσιάζει διαφορές μεταξύ ενδομητρίου- μυομητρίου σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Van Haaften et al 1997), ενώ παρατηρείται μείωση σε σύγκριση με τον αριθμό αυτών σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Samsioe et al 1994).

Οι υποδοχείς μειώνονται με την ηλικία και η θεραπεία με οιστρογόνα μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα και των υποδοχέων προγεστερόνης (Illingworth et al 1975).

Ενδομήτριο

Ο υποδοχέας προγεστερόνης σε πειράματα που έγιναν με ανοσοιστοχημικές μελέτες παρουσίασε έντονη ανοσολογική αντίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα των αδένων κατά την παραγωγική φάση. Η αντίδραση αυτή μειώθηκε στην εκκριτική φάση, ενώ στα κύτταρα του στρώματος παρατηρήθηκε παρόμοια αντίδραση και στις δύο φάσεις του κύκλου. (Amso et al 1994).

Κατά την εμμηνόπαυση παρατηρείται μείωση των υποδοχέων προγεστερόνης στο ενδομήτριο σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. (Snijders et al 1992).

Μυομήτριο

Σε ανοσοιστοχημικές μελέτες βρέθηκε ότι ο υποδοχέας προγεστερόνης παρουσιάζει σταθερή ανοσολογική αντίδραση στις λείες μυικές ίνες σε όλη τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου (Amso et al 1994, Nisolle et al 1999).

Αυξημένη έκφραση των δύο τύπων του προγεστερονικού υποδοχέα παρατηρείται στα λειομύωμα σε σχέση με το παρακείμενο υγιές μυομήτριο

(Brandon et al 1993, Nisolle et al 1999, Wu et al 2000). Τα λειομύματα παρατηρούνται σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σαν αποτέλεσμα διαφοροποιημένης έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, και συνήθως υποστρέφονται στην εμμηνόπαυση.

Στην κύηση οι υποδοχείς ανιχνεύονται τόσο στις λείες μυικές ίνες όσο και στο τοίχωμα των αγγείων. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των κυττάρων. Σε πρόσφατες μελέτες παρατηρείται 2-3 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση υποδοχέων προγεστερόνης σε σύγκριση με την ακύμονα μήτρα (Geimonen et al 1998). Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχει διαφορά στο επίπεδο των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών κατά την κύηση (Roh et al 1999).

Ωοθήκη

Ο αριθμός υποδοχέων στην ωοθήκη παρουσιάζει την κατανομή που παρατηρείται και στο ενδομήτριο κατά τις διάφορες φάσεις του κύκλου. Η ανοσολογική απάντηση είναι έντονη στην παραγωγική φάση και αμβλύνεται κατά την εκκριτική φάση.

Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά του επιπέδου των υποδοχέων στην εμμηνόπαυση (Amso et al 1994).

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ.

- Στο μεταβολισμό ενεργοποιεί τη διάσπαση του ATP και επομένως την έκλυση ενέργειας και την αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος. Επίσης προκαλεί μια παροδική αύξηση της απέκκρισής ύδατος και νατρίου.

- Στον κόλπο προκαλεί αποφολίδωση της επιφανειακής και της διαμέσου στιβάδας.
- Στον τράχηλο ελαττώνει τη διάμετρο του έξω τραχηλικού στομίου και καθιστά την τραχηλική βλέννα λιγότερο διαπερατή από τα σπερματοζωάρια.
- Στο μαστό συμβάλλει στη διαφοροποίηση του συστήματος των αδενοκυψελών και την παραγωγή γάλακτος.

Δράση στο ενδομήτριο.

Οι κυκλικές μεταβολές του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου υπόκεινται στο ρυθμιστικό έλεγχο της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης. Κατά την ωοθυλακική φάση τα επιθηλιακά κύτταρα των αδένων του ενδομητρίου, καθώς και των άλλων στιβάδων του, πολλαπλασιάζονται υπό την επίδραση της οιστραδιόλης, ενώ κατά την ωχρινική φάση μετατρέπονται σε εκκριτικά κύτταρα υπό την επίδραση της προγεστερόνης. Οι αδένες του ενδομητρίου κατά την ωχρινική φάση και υπό την επίδραση της προγεστερόνης αυξάνουν σε μέγεθος και καθίστανται ελικοειδής. Στα κύτταρά τους εναποτίθενται γλυκαγόνο και άλλες θρεπτικές ουσίες και όλο το ενδομήτριο εμφανίζει μια ελαφρά εξοίδηση. Κατά τη φάση αυτή η μήτρα είναι απόλυτα έτοιμη να δεχτεί το γονιμοποιημένο ωάριο. Εάν δεν επέλθει γονιμοποίηση το ωχρό σωματίο αρχίζει να υποστρέφεται και η υποστήριξη από την προγεστερόνη αίρεται με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του βλεννογόνου, τη σύσπαση και την απόφραξη των ακροτελικών κλάδων των ελικοειδών αρτηριών, διαταραχές της αιμάτωσης των επιφανειακών επιθηλιακών και αδενικών στοιχείων του ενδομητρίου, τη δημιουργία εστιακών νεκρώσεων και λευκοκυτταρικών διηθήσεων, την απόσπαση μεγάλων τμημάτων του ενδομητρίου και τελικά την

εμφάνιση αιμορραγίας – έμμηνος ρύση. Ακολουθεί η εκ νέου άνοδος των επιπέδων της FSH που θα προωθήσει την ωρίμανση του νέου ωοθυλακίου και το νέο γεννητικό κύκλο.

Η προγεστερόνη είναι υπεύθυνη κατά την εκκριτική φάση για τις μεταβολές που προκαλούνται, οι οποίες είναι η έκκριση του επιθηλίου των αδένων, η ανάπτυξη των σπειροειδών αρτηριών, το οίδημα του στρώματος και η αύξηση της παραγωγής γλυκαγόνου από τα κύτταρα. Προκαλεί επίσης αύξηση της όξινης φωσφατάσης και της κατανάλωσης οξυγόνου.

Τα κυμαινόμενα επίπεδα προγεστερόνης στην κυκλοφορία προκαλούν ένα είδος φλεγμονώδους αντίδρασης στο ενδομήτριο με την έκκριση ουσιών όπως η ιντερλευκίνη 8 (IL-8), η μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 (MCP-1) και η κυκλοοξυγενάση (COX-2). Στο τέλος της εκκριτικής φάσης και πριν την εμμηνορρυσία η προγεστερόνη προάγει την έκφραση μεταλλοπρωτεασών MMP-7, MMP-2 και της κολλογενάσης IV. Με αυτό τον τρόπο υπεισέρχεται στο αρχικό στάδιο κατακερματισμού και αναδιαμόρφωσης του ενδομητρίου. Ταυτόχρονα ρυθμίζει την έκκριση ισχυρών αγγειοδραστικών ουσιών όπως οι προσταγλανδίνες και ορμονικών πεπτιδίων όπως οι ενδοθηλίνες.

Δράση στο μυομήτριο.

Στο μυομήτριο η προγεστερόνη προκαλεί χάλαση των λείων μυϊκών ινών και ελάττωση της ευαισθησίας στη δράση της οξυτοκίνης, δράσεις ιδιαίτερα σημαντικές για την προστασία και τη διατήρηση της κύησης.

Αντικρουόμενα αποτελέσματα υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά τη συμμετοχή των στεροειδών ορμονών στην ανάπτυξη των ινομυωμάτων. Διαπιστώθηκε πως η προγεστερόνη καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί την έκφραση της κονεξίνης 43 (Anderson et al,

1993), σε αντίθεση με την οιστραδιόλη που φαίνεται να προωθεί την έκφραση της ίδιας ουσίας. Επιπλέον διαπιστώθηκε πως η προγεστερόνη εμποδίζει την δημιουργία νέων αγγείων στο μυομήτριο κάτι που με τη σειρά του εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών και των παθολογικών κυττάρων, καταστέλλοντας την έκφραση του πλασμινογόνου, διασπώντας τη λαμινίνη, και μειώνοντας τη δράση του tumor angiogenesis factor, (TAG) , και του fibroblast growth factor (FGF) (Abulafia et al, 1999).

Νεότερες μελέτες δείχνουν ότι και τα δύο στεροειδή δρουν θετικά στην ανάπτυξη των ινομυωμάτων με αύξηση της έκφρασης του πυρηνικού αντιγόνου και του FGF (Shimomura et al, 1998) και φαίνεται να έχουν θετική συνεργική δράση (Kornyei et al, 1999).

Δράση στις ωοθήκες.

Η οιστραδιόλη έχει σημαντικό ρόλο στο γυναικείο γεννητικό κύκλο. Υπεισέρχεται στον έλεγχο της έκκρισης γοναδοτροφινών καταστέλλοντας την έκκριση των FSH και LH κατά την ωοθυλακική φάση και ρυθμίζοντας τα επίπεδα της FSH στη διακυκλική φάση. Η αυξημένη έκκριση οιστραδιόλης από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο οδηγεί στην προωορρηκτική αιχμή της LH, ενώ η επίδραση της προγεστερόνης προκαλεί μείωση της συχνότητας των ώσεων σε μία κάθε 3-4 ώρες.

Μελέτες τα τελευταία χρόνια καταδεικνύουν και τη συμμετοχή και άλλων παραγόντων στην έκλυση γοναδοτροφινών από τις ωοθήκες, όπως ο μη στεροειδικός παράγοντας GnSAF (gonadotroghin surge-attenuating factor) (Messinis- Templeton 1989, Pappa et al 1999). Ο παράγοντας αυτός πιθανά ανταγωνίζεται τη δράση της οιστραδιόλης.

Δράση της προγεστερόνης στην κύηση.

Η προγεστερόνη παράγεται κατά τις 6-7 πρώτες εβδομάδες της κύησης από το κυοφόρο ωχρό σωματίο και κατόπιν από τον πλακούντα. Ο πλακούντας συνθέτει προγεστερόνη από χοληστερόλη και πρεγνενολόνη που προμηθεύεται από τη μητρική κυκλοφορία. Η χοληστερόλη εισέρχεται στο κύτταρο της τροφοβλάστης υπό μορφή λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Low density lipoproteins-LDL) μέσω ειδικών υποδοχέων. Τα αμινοξέα και τα λιπαρά οξέα που παράγονται από την διάσπαση των LDL χρησιμοποιούνται από το έμβryo. Μικρή ποσότητα β-HCG υποστηρίζεται ότι είναι αναγκαία για τη διαδικασία της στεροειδογένεσης που πραγματοποιείται στον πλακούντα. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις πως η παραγωγή προγεστερόνης στον πλακούντα ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα (Pepe et al 1995, Grimes et al 1996). Η οιστραδιόλη αυξάνει την παραγωγή προγεστερόνης μέσω αύξησης της εισόδου LDL-χοληστερόλης στην μητροπλακουντιακή κυκλοφορία. Επιπρόσθετα τα οιστρογόνα αυξάνουν τη δράση του ενζύμου P450 του πλακούντα που μετατρέπει τη χοληστερόλη σε πρεγνενολόνη, την πρόδρομο ουσία της προγεστερόνης.

Στα αρχόμενα στάδια της κύησης (ως τις 10 εβδομάδες) η εξωγενής χορήγηση προγεστερόνης υποστηρίζει την κύηση, και γι'αυτό στην κλινική πράξη και ειδικά σε κυήσεις που έχουν επιτευχθεί με εξωσωματική γονιμοποίηση η χρήση της είναι δεδομένη.

Το αμνιακό υγρό έχει αυξημένες συγκεντρώσεις προγεστερόνης μεταξύ 10-20 εβδομάδας. Μετά παρουσιάζει σταδιακή μείωση.

Το μυομήτριο έχει στην αρχή της κύησης τριπλάσια συγκέντρωση προγεστερόνης από ότι το μητρικό πλάσμα, κατά το τέλος όμως της κύησης έχουν περίπου την ίδια συγκέντρωση.

Η προγεστερόνη κατά την κύηση συμβάλλει στην:

- Διατήρηση του μυομητρίου σε κατάσταση εκκριτική (ανάλογη με αυτή του δευτέρου ημίσεως του καταμήνιου κύκλου)
- Ανάπτυξη του μυομητρίου και του κολλαγόνου της συνεχώς αυξανόμενης μήτρας.
- Μείωση του πολλαπλασιασμού και της δράσης των λεμφοκυττάρων
- Καταστολή του ανοσολογικού συστήματος, έτσι ώστε να αποτραπεί η απόρριψη του κυήματος.
- Αναστολή της δράσης του συστήματος «Ca-καλμοδουλίνη-κινάση της ελαφράς αλύσου της μυοσίνης» και της ενεργοποίησης της φωσφωδιεστεράσης του cAMP (Kofinas et al 1990), έτσι ώστε να επιτευχθεί η ηρεμία της μήτρας στη διάρκεια της κύησης.
- Παραγωγή γλυκοκορτικοειδών και αλατοκορτικοειδών του εμβρυικού επινεφριδιακού φλοιού, για τα οποία χρησιμεύει ως αρχικό υπόστρωμα βιοσύνθεσης.

Υπάρχουν δύο ενεργοί μεταβολίτες της προγεστερόνης που αυξάνουν στην κύηση. Ένας από αυτούς ο 5α – πρεγναν-3,20 διόνη είναι υπεύθυνος για την αντίσταση της εγκυμοσύνης στην αγγειοσυσπαστική δράση της αγγειοτενσίνης II.

Τα στεροειδή της ωοθήκης εμφανίζουν συνεργική δράση ώστε να επιτευχθεί η επιτυχής εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μείωση της διάρκειας της εκκριτικής

φάσης σε συνδυασμό με αυξημένη αναλογία οιστραδιόλης / προγεστερόνης και η καθυστέρηση της ανάπτυξης του ενδομητρίου αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες για την επιτυχή εμφύτευση κατά την εξωσωματική (Shapiro et al 1993, Csemiczky et al 1998).

Σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι η προγεστερόνη προάγει την παραγωγή λευκοκυττάρων στο ενδομήτριο κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση που ακολουθεί τη διείσδυση της τροφοβλάστης (Inoue et al 1994).

Στο πρώτο τρίμηνο της κύησης σε καλλιέργειες κυττάρων του στρώματος του ενδομητρίου, διαπιστώθηκε η θετική δράση της προγεστερόνης στη σύνθεση της «πρωτεΐνης του πλακούντα» (PP12), της προλακτίνης (Huang et al 1987), και της «πρωτεΐνης του πλάσματος που συνδυάζεται με την κύηση (PAPP-A) (Bischof and Tseng 1986, Rutanen et al 1987). Με την πρόοδο της κύησης και την αύξηση της μήτρας, η προγεστερόνη εμφανίζει πολλή σημαντική μυοχαλαρωτική δράση στις λείες μυϊκές ίνες του μυομητρίου. Σε πειράματα με καλλιέργειες κυττάρων βρέθηκε πως η προσθήκη προγεστερόνης προκαλεί διάσπαση της αίμης σε μπιλβερδίνη IX, μέσω της δράσης του ενζύμου ομοοξυγενάση και παραγωγή μονοξειδίου του άνθρακα. (CO) (Acevedo and Ahmed 1998). Επιπλέον η προγεστερόνη προκαλεί την παραγωγή από τα λεία μυϊκά κύτταρα της εγκύμονος μήτρας της «πρωτεΐνης συνδεόμενης με την παραθορμόνη» που εμφανίζει επίσης μυοχαλαρωτική δράση. (Shenberger et al 2001).

Πειραματικές μελέτες σε καλλιέργειες κυττάρων δείχνουν πως η προγεστερόνη μειώνει σημαντικά τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της ωκυτοκίνης, μειώνοντας την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου (Fuji et al 1995). Η δράση

αυτή ασκείται μέσω αλλοίωσης των υποδοχέων της ωκυτοκίνης (Fomin et al 1999). Έτσι προκαλούνται αλλαγές στις οδούς μεταφοράς των ιόντων ασβεστίου με τελικό αποτέλεσμα την διατήρηση ηρεμίας κατά την κύηση.

Καλλιέργειες λείων μυικών κυττάρων μυομητρίου και τραχήλου εγκύμονος μήτρας, δείχνουν κατασταλτική δράση της προγεστερόνης στην έκφραση της CX 43, επιφέροντας μείωση της τονικότητας της μήτρας. (Andersen et al 1993, Ambrus and Ambrus 1994, Ciray et al 1996).

ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ 1

BIOΧΗΜΕΙΑ.

Οι ενδοθηλίνες ET 1, ET 2, ET 3 είναι ορμονικά πεπτιδία που παρουσιάζουν δομική και λειτουργική συγγένεια με τα πεπτιδία της «οικογένειας των σαραφοτοξινών» που απομονώθηκαν από το δηλητήριο του φιδιού *Atractaspis Engaddensis*.

Πρόδρομες μορφές των ενδοθηλινών είναι οι πρεπροενδοθηλίνες (prepro ET1) όπου με τη δράση των ενζύμων «διβασική ενδοπεπτιδάση» και «καρβοξυπεπτιδάση» προκύπτουν οι μεγάλες ενδοθηλίνες (big ETs). Διάσπαση των τελευταίων από το «μετατρεπτικό ένζυμο των ενδοθηλινών» οδηγεί στις δραστικές μορφές των πεπτιδίων.

Ειδικότερα η ενδοθηλίνη 1 αποτελείται από 21 βάσεις αμινοξέων, δύο ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (Cys1-Cys15 και Cys3-Cys11), ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό άκρο.

Η ενδοθηλίνη 1 αποτελεί ισχυρό αγγειοσυσταλτικό πεπτιδίο. Ανιχνεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων μεγάλης ποικιλίας ιστών (εγκεφάλου, νεφρών, πνευμόνων) όπως και σε μη αγγειακά στοιχεία των ίδιων ιστών (Marciniak et al 1992, Sakai et al 1996, Takahashi et al 2001). Πειραματικές μελέτες αποδεικνύουν την ρυθμιστική δράση της ET 1 στο αγγειακό δίκτυο. Ενδοφλέβια εφάπαξ χορήγηση ET 1 σε in vivo πειράματα προκαλεί σύσπαση των αγγείων που διαρκεί για ώρες. (Yanagisawa et al 1988). Οι άλλοι υποτύποι της ομάδας των ενδοθηλινών ET 2, ET 3 δεν διαπιστώθηκε να έχουν δράση στο ενδοθήλιο των αγγείων.

Λόγω της δράσης της αυτής στα αγγεία, η ET1 εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία μιας σειράς παθήσεων όπως η αθηρωματική νόσος (Moreno

et al 1996, Porter et al 2002), την υπέρταση (Schiffrin et al 2002), την καρδιακή ανεπάρκεια (Stewart et al 1995), την οξεία νεφρική ανεπάρκεια (Andreoli et al 2002), τη στηθάγχη και διάφορες πνευμονικές παθήσεις (Stewart et al 1994, Gourgoulis et al 1999, Domali et al 2000).

Η δράση της ET 1 σε μια ποικιλία ιστών παρουσιάζει τόσο αγγειακές όσο και μη αγγειακές δράσεις. Προκαλεί βρογχοσπασμό στο αναπνευστικό σύστημα, επηρεάζει τη λειτουργικότητα του νεφρικού σπειράματος και των σωληναρίων, ενδοκρινικές μεταβολές, θετική ινότροπο και χρονότροπο δράση στο μυοκάρδιο, και ρύθμιση της λειτουργικότητας των νευροδιαβιβαστικών ουσιών στο νευρικό σύστημα όπως των νευροενδοκρινικών ορμονών.

Στη μήτρα έχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της συσταλτικότητας του μυομητρίου δρώντας ως τοπικά εκλυόμενος παράγοντας (Cameron et al 1995). Παρουσιάζει αυτοκρινή δράση, επηρεάζοντας τη συσταλτική συμπεριφορά των γειτονικών κυττάρων του ίδιου τύπου, αποκρινή δράση δρώντας σε κύτταρα γειτονικά ή απομακρυσμένα διαφορετικού τύπου από αυτά που την παράγουν ενώ ταυτόχρονα δρα ανατροφοδοτικά στην ίδια ομάδα κυττάρων που την παράγουν.

Στις βιοσυνθετικές οδούς που καταλήγουν στην παραγωγή ώριμης μορφής ενδοθηλίνης, συμμετέχουν δύο ένζυμα της ομάδας των «μεταλλοπρωτεασών που συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου και εξαρτώνται λειτουργικά από τα ιόντα ψευδαργύρου».

“Mammalian Zinc Metalloproteases”.

ECE - endothelin converting enzyme.

Το πρώτο από αυτά τα ένζυμα είναι το «μετατρεπτικό ένζυμο των ενδοθηλινών» (ECE- endothelin converting enzyme) το οποίο καταλύει τη

διάσπαση της μεγάλης ενδοθηλίνης σε ώριμη ενδοθηλίνη (Xu et al 1994, Turner and Murphy 1996, Prayer-Galetti et al 1997, Raharjo et al 2001, Bur et al 2001). Το ένζυμο ECE είτε παράγεται τοπικά ή μεταφέρεται στον ιστό στόχο από τη συστηματική κυκλοφορία και ρυθμίζει τα επίπεδα της ET 1 και κατ'επέκταση τη δράση της στα κύτταρα στόχους (Ahmad and Reznik 2000, Ergul et al 2001, Quaschnig et al 2001). Αυτό εξηγεί και το ότι η μεγάλη ενδοθηλίνη σε *in vitro* πειράματα έχει αγγειοσυσπαστική δράση η οποία φτάνει μόνο το 1% της ώριμης μορφής ενώ σε *in vivo* πειράματα έχει ανάλογη αγγειοσυσπαστική δράση λόγω της παρουσίας του ECE. Πιο συγκεκριμένα το ένζυμο αυτό προκαλεί την πρωτεολυτική διάσπαση μεγάλων ενδοθηλινών στις θέσεις Trp 21, Val 22/I 1e22 ώστε να παραχθούν οι ώριμες μορφές ενδοθηλινών. Υπάρχουν δύο ισομερείς μορφές οι ECE 1 και ECE 2.

Οι πρόδρομες μορφές των ενδοθηλινών, μεγάλη ET 1, μεγάλη ET 2 και μεγάλη ET 3, αποτελούν το βιολογικό υπόστρωμα των ECEs. Ο καθορισμός της πρόδρομης μορφής που θα επιλεγεί για να προκύψει η ώριμη μορφή δεν είναι ξεκάθαρος. Φαίνεται ότι η ενεργός ισομορφή ECE σε συνδυασμό με πρόδρομη μορφή που εντοπίζεται στη μεμβράνη των κυττάρων ή στο κυτταρόπλασμα ρυθμίζουν αυτή την επιλογή (Takahashi et al 1995, Matsumura et al 1993, Xu et al 1994). Συγκεκριμένες περιοχές των πρωτεϊνών φαίνεται ότι αναγνωρίζονται από το ένζυμο ECE και προωθούν τη διαδικασία διάσπασής τους (Schmidt et al 1994, Shimada et al 1994, Waxman et al 1994, Xu et al 1994). Αντικατάσταση συγκεκριμένων αμινοξέων, ειδικά κάποιων που είναι στο καρβοξυτελικό άκρο της μεγάλης ET 1, μπορεί να προκαλέσει μείωση του βαθμού μετατροπής της σε ώριμη ET 1. Τα αμινοξέα που βρίσκονται μεταξύ των θέσεων 21 και 53 καθορίζουν τη λειτουργική

σχέση μεταξύ ET1 / ECE και αντικατάστασή τους καθιστά τη μεγάλη ενδοθηλίνη ένα ασθενές υπόστρωμα για τη δράση του ενζύμου ECE.

Από πειράματα σε αρουραίους , φαίνεται ότι μεταλλάξεις στο επίπεδο των γονιδίων που κωδικοποιεί το ένζυμο ECE-1 οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις του νευρικού συστήματος του κυήματος (Yanagisawa et al 1998). Ρύθμιση της παραγωγής της ενδοθηλίνης μέσω ελέγχου της δραστηριότητας του ECE είναι σημαντική λοιπόν για την ανάπτυξη υγιούς κυήματος και αποφυγής γενετικών μεταλλάξεων.

Οι ενδοθηλίνες παράγονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων από τις ανενεργές πρόδρομες μορφές- προεπρεοενδοθηλίνες – με τη δράση των ενζύμων που παρουσιάζουν ανάλογη κατανομή με αυτή των ενδοθηλινών. Επηρεάζουν δε με διαφορετικό τρόπο τα ενδοθηλιακά και τα λεία μυϊκά κύτταρα των ιστών. Το mRNA των ECEs εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και λιγότερο στα επιθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα. Έχει εντοπιστεί το mRNA των ECEs σε κύτταρα των ενδοκρινών αδένων - επινεφρίδια, κοκκώδη κύτταρα της θήκης της ωοθήκης, κύτταρα Leyding στον όρχη - να υποστηρίζει την παρακρινή δράση των ενδοθηλινών στους ιστούς αυτούς.

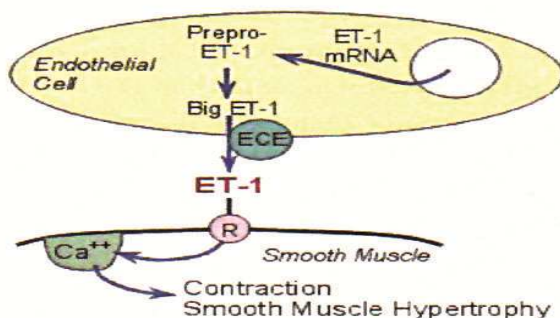
NEP - neutral endopeptidase

Το δεύτερο ένζυμο των “Mammalian Zinc Metalloproteases” που συμμετέχει στον μεταβολισμό της ώριμης ET1 είναι η «ουδέτερη ενδοπεπτιδάση» (NEP-neutral endopeptidase) (Aubert et al 1998). Το ένζυμο αυτό ρυθμίζει την τοπική συγκέντρωση της ET 1. Στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα έχει μελετηθεί εκτενώς η ρυθμιστική αυτή δράση

του ενζύμου NEP (Casey et al 1993, Pekonen et al 1995, Salamonsen et al 2001).

Η αναλογία ET1 / NEP έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αιματική ροή στο ενδομήτριο, στη συσταλτικότητα του μυομητρίου, την απόπτωση του ενδομητρίου κατά την εμμηνορρυσία και τη μείωση της συσταλτικότητας του μυομητρίου κατά το στάδιο της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο (Economos et al 1992, Marsh et al 1996, Kubota et al 1997, Salamonsen et al 1999).

Το βιολογικό υπόστρωμα του ενζύμου είναι η ώριμη μορφή της ET 1. Διασπά τους δεσμούς των αμινοξέων των υδροφοβικών βάσεων της ET 1 (Abassi et al 1993, Turner and Murphy 1996). Η δράση του ενζύμου αυτού αναστέλλεται από το φωσφοραμίδιο και την θριοφάνη. Σε πειράματα η δράση του ενζύμου προάγεται παρουσία προγεστερόνης.

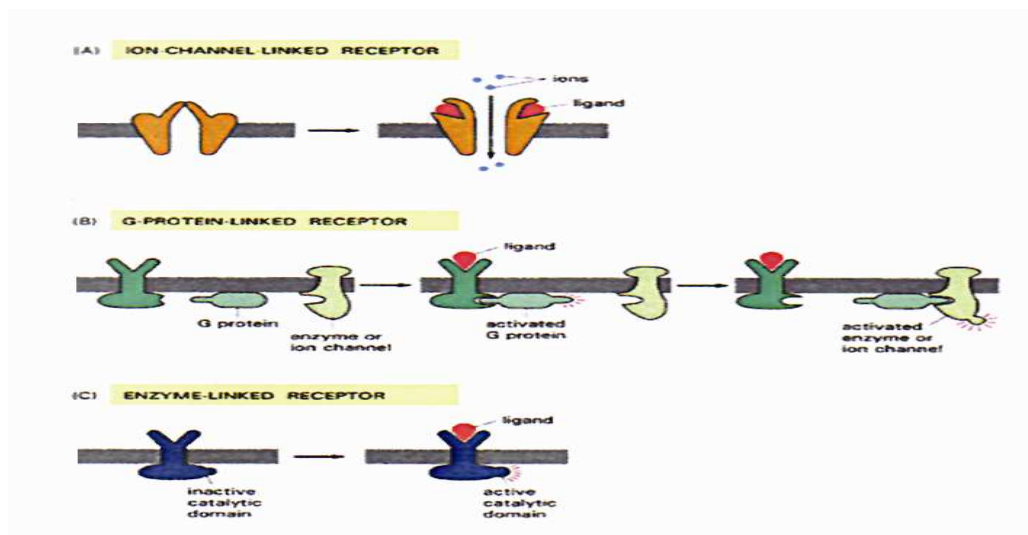


Σχήμα 5: Βιοσύνθεση της ενδοθηλίνης 1.

Η ώριμη μορφή παράγεται μετά από διάσπαση της προ-προενδοθηλίνης και της μεγάλης ενδοθηλίνης.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.

Οι υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης αποτελούν μόρια με μεγάλη χημική συγγένεια με την ουσία «διεγέρτη». Συνδέονται κυρίως με υδατοδιαλυτές μοριακές δομές, μερικές λιποδιαλυτές, και τοπικά παραγόμενους παράγοντες. Δημιουργείται ένα «σύμπλοκο υποδοχέα - διεγέρτη» το οποίο προκαλεί μεταβολές στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του κυττάρου ώστε να αλλάξει η συμπεριφορά του κυττάρου σε αυτό το σήμα. Με βάση αυτό το μηχανισμό μετάδοσης του σήματος έχουμε και διαφορετικούς τύπους υποδοχέων.



Σχήμα 6: Τύποι υποδοχέων κυτταροπλασματικής μεμβράνης

A. μεταφέρει σύντομα συναπτικά σήματα

B. συνδέεται λειτουργικά με τις G-πρωτείνες της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης

Γ. κατηγορία πρωτεϊνικών μορίων που μετά την ενεργοποίησή τους λειτουργούν μόνοι τους ή σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα.

Λειτουργικά συνδεδεμένοι υποδοχείς με κανάλια ιόντων.

Πρόκειται για πρωτεϊνικές δομές μεγάλου μοριακού βάρους που πολλές φορές διαπερνούν τη μεμβράνη του κυττάρου. Οι υποδοχείς αυτοί συμμετέχουν στη μεταφορά των ηλεκτρικών σημάτων μεταξύ των κυττάρων, μέσω της διέγερσής τους από νευροδιαβιβαστές οι οποίοι ανοίγουν και κλείνουν τα κανάλια που δημιουργούνται από τις πρωτεΐνες, και που προκαλούν έτσι μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης στα ιόντα και κατ' επέκταση την μετάδοση του ηλεκτρικού σήματος στο κύτταρο στόχος.

Λειτουργικά συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες υποδοχείς.

Ανήκουν στην ομάδα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που δρουν στο σύμπλεγμα «πλάσμα – μεμβράνη - συνδεδεμένη πρωτεΐνη - στόχος». Τελικός στόχος είναι είτε ένζυμο του οποίου η ενεργοποίηση μεταβάλλει τη συγκέντρωση ενδοκυττάρων μεσολαβητών που με τη σειρά τους τροποποιούν τη συμπεριφορά πρωτεϊνών του κυττάρου ή κανάλι ιόντων που τροποποιεί τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Στη σύνδεση μεταξύ υποδοχέα και πρωτεΐνης στόχου συμμετέχει και η πρωτεΐνη «τριμερής G_συνδεδεμένη ρυθμιστική πρωτεΐνη». Η πρωτεΐνη αυτή περιέχει 3 τύπων πολυπεπτιδικές αλυσούς τις α, β και γ. Η Gα αλυσός υδρολύει το GTP και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Οι β και γ αλυσοί δημιουργούν ένα σύμπλοκο που σταθεροποιεί τη G πρωτεΐνη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η σύνδεση του διεγέρτη με τον υποδοχέα της μεμβράνης που είναι συνδεδεμένος με τις G πρωτεΐνες προκαλεί πρωτεϊνική διαμόρφωση του υποδοχέα οδηγώντας τις G πρωτεΐνες να αντικαταστήσουν το GDP με GTP.

Οι πιο πολλές G πρωτεΐνες αλλάζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση «σηματοδοτών» - ενδοκυττάριοι αγγελιοφόροι ή δευτερογενείς αγγελιοφόροι. Το cAMP και τα ιόντα Ca είναι οι πιο συχνοί ενδοκυττάριοι αγγελιοφόροι.

Λειτουργικά συνδεδεμένοι με ένζυμα υποδοχείς

Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Το εξωκυττάριο τμήμα αποτελεί το τμήμα σύνδεσης με τον διεγέρτη και το ενδοκυττάριο τμήμα την καταλυτική ομάδα. Μετά την ενεργοποίησή τους λειτουργούν ως ένζυμα οι ίδιοι ή σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα.

ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ 1.

Η δράση της ενδοθηλίνης 1 ασκείται μέσω των υποδοχέων της, που είναι πρωτεϊνικά μόρια μεγάλου μοριακού βάρους. Έχει κωδικοποιηθεί η αλληλουχία των βάσεων δύο υποτύπων υποδοχέων για την ET 1, οι ETA και ETB. Ο υποτύπος ETA παρουσιάζει μεγαλύτερη χημική συγγένεια σύνδεσης με την ενδοθηλίνη 1 σε σύγκριση με τις ενδοθηλίνες 2 και 3, ενώ ο υποτύπος ETB έχει ισοδύναμη χημική συγγένεια και για τους 3 τύπους ενδοθηλίνης (Arai et al 1990, Sakurai et al 1990, 1991, 1992).

Η ενδοθηλίνη 1 δρα στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων μέσω των ETA υποδοχέων προκαλώντας αγγειοσύσπαση μακράς διάρκειας (Cramer et al 1997). Οι υποδοχείς ETB συμμετέχουν στην «από το NO επιφερόμενη αγγειοδιαστολή» με την επίδραση της ET 1. Ο ίδιος υποδοχέας συμμετέχει όμως και στην πρόκληση αγγειοσύσπασης (Clozel et al 1992, Morelond et al 1992).

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει την συμμετοχή του ETB στη διαδικασία κάθαρσης της ενδοθηλίνης από τη συστηματική κυκλοφορία σε φυσιολογικές συνθήκες (Fukuroda et al 1994), όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (Kobayshi et al 1993, 1999).

Κατανομή των υποδοχέων ενδοθηλίνης 1.

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα mRNA για τον υποτύπο ETA υποδοχέα ενδοθηλίνης συναντώνται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε ανθρώπινους ιστούς σε σχέση με το mRNA για τον υποτύπο ETB. Τα υψηλότερα επίπεδα mRNA του ETA εντοπίζονται στην αορτή, ενώ δεν εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα επίπεδα mRNA για τον ETB είναι υψηλά τόσο στην αορτή όσο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο επικρατέστερος υποτύπος είναι ο ETA στα λεία μυϊκά κύτταρα μέσω του οποίου η ET 1 ασκεί την αγγειοσυσπαστική του δράση. Ο ETB είναι πιο συχνός στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και συμμετέχει στην έκκριση προστακυκλίνης και EDRF-«παραγόμενου από το ενδοθήλιο των αγγείων παράγοντα χάλασης (endothelium derived relaxing factor).

Στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα ο ETA εκφράζεται πιο συχνά στο ενδομήτριο σε σχέση με το μυομήτριο και αυξάνει σημαντικά στα ινομύματα, ενώ δεν έχουμε τέτοιες διαφοροποιήσεις για τον ETB. (Wolff et al 1996).

Ενδομήτριο.

Κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου παρατηρούνται μεταβολές στην αναλογία ETA/ETB. Ειδικότερα το mRNA ETA είναι αυξημένο στην ωοθυλακική φάση και την ωοθυλακιορρηξία, ενώ το mRNA ETB αυξάνει στην

εκκριτική φάση και κατά την εμμηνορρυσία (O'Reilly et al 1992, Collet et al 1996).

Ο υποτύπος ETA εντοπίζεται κυρίως στο στρώμα του ενδομητρίου στην ωοθυλακική φάση και ο υποτύπος ETB στο αδενικό επιθήλιο της βασικής στιβάδας του ενδομητρίου στην εκκριτική φάση. Οι διαφορετικές αναλογίες του λόγου ETA/ETB στις διαφορετικές φάσεις του κύκλου δείχνουν την επίδραση του ορμονικού περιβάλλοντος στη δράση της ET 1.

Μυομήτριο.

Στο μυομήτριο της μήτρας ανιχνεύθηκε mRNA που κωδικοποιεί τους υποτύπους της ενδοθηλίνης. Μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρείται σε εγκύμονα μήτρα (Svane et al 1993), χωρίς διαφοροποιήσεις στη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου. Ο ETA εντοπίζεται πιο έντονα στο ανώτερο τμήμα του σώματος της μήτρας, ενώ ο ETB στο κατώτερο τμήμα και τον ισθμό της μήτρας (Wolff et al 1996). Επιπλέον ο ETB αυξάνει κατά το τέλος της κύησης γεγονός που ευνοεί τη μυϊκή χάλαση και τη διαστολή του τμήματος αυτού της μήτρας στο στάδιο αυτό μέσω της παραγωγής αγγειοδιασταλτικών παραγόντων όπως το NO (Yallampalli and Garfield 1994, Bacon et al 1995).

Πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν χημικές ενώσεις εκλεκτικές για τους δύο υποτύπους υποδοχέων επιβεβαιώνεται η επικράτηση του ETA στο μυομήτριο ακύμονος μήτρας σε σχέση με την σαφή έλλειψη ETB.

Στα ινομύματα μόνο ο υποτύπος ETA εντοπίζεται (Breuiller-Fouche et al 1997, 1999), υποδεικνύοντας τη ρυθμιστική του δράση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον διαπιστώθηκε πως ο ETA επηρεάζει τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα των λείων μυϊκών ινών στη δράση της ενδοθηλίνης 1,

ρυθμίζοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{++} (Maggi et al 1994, Heluy et al 1995).

Σε μήτρα εμμηνοπαυσιακών γυναικών δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις ETA-ETB σε σύγκριση με αυτές που παρατηρούνται στο τέλος της κύησης και τον τοκετό (Maggi et al 1994).

Κατά την κύηση παρατηρούνται 2-10 φορές μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποδοχέων ενδοθηλίνης σε σχέση με άλλα σημεία του αναπαραγωγικού συστήματος, με μια σημαντική υπεροχή της συγκέντρωσης του ETA συγκριτικά με το ETB με την πρόοδο της κύησης (Osada et al 1997, Honore et al 2000)

Ωοθήκη.

Το mRNA του ETA εντοπίζεται στα αγγεία του στρώματος που περιβάλλουν τα ωοθυλάκια, ενώ το mRNA του ETB εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του ωχρού σωματίου (Karam et al 1999). Η συγκέντρωση του ETA υποτύπου είναι σχεδόν 100 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με του ETB υποτύπου (Mancina et al 1997).

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ.

Η ET 1 εντοπίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και σε μη αγγειακά κύτταρα του εγκεφάλου, των νεφρών, των πνευμόνων, όπως και στο αναπαραγωγικό σύστημα. (Sunnergen et al 1990, Sakurai et al 1991, Horone et al 2000, Faxen et al 2000, Tieche et al 2001).

Πειράματα σε ακύμονα μήτρα, παρουσίασαν έντονη ανοσολογική αντίδραση στην ET 1 στο ενδομήτριο και ειδικότερα στους αδένες του ενδομητρίου και τα σημεία σύναψης του ενδομητρίου με το μυομήτριο (Maggi

et al 1991, Cameron et al 1993, Svane et al 1993). Σε πειράματα με ανοσοϊστοχημεία παρατηρείται έντονη χρώση για την ET 1 πριν και κατά την εμμηνορρυσία (Ohbuchi et al 1995). Στην ωοθηλακική φάση του γεννητικού κύκλου εντοπίστηκε έντονη ανοσολογική αντίδραση στην ET 1 στο επιθήλιο του αυλού, στο αδενικό επιθήλιο και το αγγειακό επιθήλιο, ενώ κατά το δεύτερο μισό του γεννητικού κύκλου παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα χρώσης. Στα κύτταρα του στρώματος της λειτουργικής στιβάδας είχαμε έντονη ανοσολογική αντίδραση πριν και κατά την εμμηνορρυσία (Salamonsen et al 1992, Cameron et al 1993, Ohbuchi et al 1995).

Στο μιομήτριο προεμμηνοπαυσιακών και εμμηνοπαυσιακών γυναικών παρατηρήθηκε ελάχιστη ανοσολογική αντίδραση (Maggi et al 1994, Ohbuchi et al 1995).

Στην ωοθήκη παρατηρήθηκε θετική χρώση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων της ωοθήκης, στα κοκκώδη κύτταρα των ώριμων ωοθυλακίων, και στο ωοθυλακικό υγρό (Kamada et al 1995, Magini et al 1996).

Στη διάρκεια της κύησης εντοπίστηκε θετική χρώση για την ET 1 στο αίμα του ομφαλίου λώρου και το αμνιακό υγρό (Wolff et al 1996). Η ET 1 που εντοπίζεται στο αμνιακό υγρό προέρχεται από τα κύτταρα του αμνιακού σάκου, από τους πνεύμονες και τα νεφρά του εμβρύου (Sunnergen et al 1990, Hemsén et al 1991, Wolff et al 1996). Στο πρώτο τρίμηνο της κύησης εντοπίζεται σε κύτταρα του φθαρού, κατά το δεύτερο τρίμηνο κυρίως στο αμνιακό υγρό, όπου και αυξάνει προοδευτικά ως το τέλος της κύησης, και στο τέλος της κύησης εντοπίζεται στο ενδοθήλιο των αγγείων και τη συγκυτιοτροφοβλάστη (Kubota et al 1992, Hasegawa et al 1991, Malassine et al 1993).

Στην περιφερική κυκλοφορία τα υψηλότερα επίπεδα ET 1 παρατηρούνται κατά την εμμηνορρυσία, ενώ χαμηλότερα επίπεδα κατά την παραγωγική και εκκριτική φάση του κύκλου (Poldermen et al 2000, Wang et al 2000).

Όσον αφορά τα επίπεδα της ET 1 κατά την κύηση υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία. Σε κάποιες μελέτες παρατηρείται διπλασιασμός της συγκέντρωσης της ET 1 κατά το τέλος της κύησης (Hakkinen et al 1992), ενώ σε άλλες μελέτες δεν διαπιστώθηκαν μεταβολές κατά τη διάρκεια της κύησης (Wolff et al 1996). Διαβητικές μητέρες παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ET 1 στο πλάσμα (Best et al 1999), όπως επίσης αυξημένα επίπεδα ET 1 παρατηρήθηκαν σε υπερτασικές μητέρες και στην προεκλαμψία μέσω της αύξησης μεταβολιτών NO που προκαλούν μεταβολές στο ενδοθήλιο των αγγείων – οξειδωτικό stress (Tsunoda et al 1992, Rath and Schrader 1993, Scalera et al 2001).

Σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η χορήγηση οιστραδιόλης για μικρό χρονικό διάστημα οδηγεί σε μείωση των επιπέδων ET 1 και αύξηση του λόγου NO / ET 1 και κατά συνέπεια αγγειοδιαστολή (Merki-Feld et al 2000). Δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα της ET 1 σε προεμμηνοπαυσιακές που λαμβάνουν αντισυλληπτικά δισκία (Van Kesteren et al 1998, Polderman et al 2000).

Σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ET1 (Wilcox et al 1997). Η αύξηση της ET 1 θεωρείται προδιαθεσικός παράγοντας καρδιακής νόσου. Στην ίδια αυτή κατηγορία γυναικών παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης που έχει θετική συσχέτιση με την αύξηση της ET 1 και υπέρταση, παράγοντες που επίσης ευνοούν την καρδιακή νόσο. Χορήγηση θεραπείας υποκατάστασης στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

προκαλεί μείωση των επιπέδων ET 1 και συνεπώς μείωση του κινδύνου ανάπτυξης καρδιακής νόσου (Mikkola et al 1998, Van Baal et al 1999, Anwaar et al 2000).

ΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ 1.

Μετά από πολυετείς μελέτες με τη μέθοδο της ανάστροφης τρανσκριπτάσης και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης RT-PCR (Reverse transcriptase- polymerase chain reaction) στο ανθρώπινο μυομήτριο και ενδομήτριο, ανιχνεύθηκε mRNA που κωδικοποιεί την ET 1 (Davenport et al 1991, Pekonen et al 1994). Τα επιθηλιακά κύτταρα των αδένων και τα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγή ET 1 στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Την παραγωγή της ET 1 ευνοεί η παρουσία του TGF (transforming growth factor) «μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα» (Ohbuchi et al 1995).

Η έκφραση του mRNA που κωδικοποιεί την ET 1 αυξάνει προοδευτικά από την ωοθυλακική στην εκκριτική φάση, φτάνοντας τα υψηλότερα επίπεδα πριν και κατά τη διάρκεια της εμμηνορρυσίας. Παράγεται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα των αγγείων και ευνοείται από την παρουσία κυτοκινών (Casey et al 1996, Marsh et al 1996).

Τα κύτταρα του στρώματος παράγουν ενδοθηλίνη σε μικρότερο βαθμό αλλά με σταθερό ρυθμό κατά τη διάρκεια του κύκλου. Τα στεροειδή της ωοθήκης μειώνουν σημαντικά την παραγωγή της ET 1, πιθανόν μέσω αυξημένης δράσης της μεταλλοενδοπεπτιδάσης η δράση της οποίας ευνοείται από την προγεστερόνη (Casey et al 1993, Kubota et al 1997).

Οι κυκλικές μεταβολές των επιπέδων της ET 1 κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου υποστηρίζεται ότι σχετίζονται με την θεωρία της

συμμετοχής της ενδοθηλίνης 1 στον έλεγχο της εμμηνορρυσίας. Στο τέλος της εκκριτικής φάσης και με τη δράση του ενζύμου «διαμεμβρανική μεταλλοενδοπεπτιδάση» γίνεται γρήγορη αποδόμηση της ET 1. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα προγεστερόνης (Head et al 1993, Casey et al 1996). Χαμηλό ποσοστό έκφρασης του ορμονικού πεπτιδίου, εκτός της εκκριτικής φάσης του κύκλου, θα μπορούσε να ερμηνεύσει την διάσταση μεταξύ της προενδοθηλίνης 1 και της ώριμης ET 1 (Kubota et al 1995). Η απόπτωση των κυττάρων της λειτουργικής στιβάδας του ενδομητρίου κατά την έμμηνο ρύση θα μπορούσε να δικαιολογήσει τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της ET 1 κατά την ωοθυλακική φάση του κύκλου (Ohbuchi et al 1995).

Κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του γεννητικού κύκλου, όπου τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι υψηλά, η συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου σε διάφορους μητροσυσπαστικούς παράγοντες ευοδώνεται, μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων των ουσιών αυτών (Janicek et al 2007). Στην ωχρινική φάση όπου η προγεστερόνη είναι αυξημένη, η συσταλτική δράση παραγόντων όπως η ET 1 μειώνεται.

Σε μυομήτριο εμμηνοπαυσιακών γυναικών δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην συσταλτική συμπεριφορά του μυομητρίου με τη δράση της προγεστερόνης ή των οιστρογόνων. Η προγεστερόνη έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί ανασταλτική δράση στην συσταλτική συμπεριφορά του μυομητρίου στην ET 1 (Domali et al 2005). Περαιτέρω έρευνες έχουν δείξει διαφορετική συσταλτική δράση της ET 1 σε μυομήτριο προ και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, όπως και στις δύο φάσεις του κύκλου όπου τα επίπεδα των ορμονών –προγεστερόνη, οιστρογόνα -είναι διαφορετικά (Domali et al 2001).

Με τη μέθοδο της ανάστροφης τρανσκριπτάσης και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης RT-PCR (Reverse transcriptase- polymerase chain reaction) mRNA της ET 1 ανιχνεύθηκε στο μυομήτριο ακύμονος μήτρας, στην ωοθήκη – ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, κοκκώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων- αλλά και σε παθολογικές εξεργασίες τόσο του μυομητρίου όσο και της ωοθήκης (ινομύματα, κακοήθεις εξεργασίες) (Danenport et al 1991, Pekonen et al 1994, Maggi et al 1994, Magini et al 1994).

Κύηση:

Κατά τη διάρκεια της κύησης διαπιστώθηκε ότι η ET 1 παράγεται τόσο από ενδοθηλιακά κύτταρα του ομφαλίου λώρου όσο και από κύτταρα του αμνιακού σάκου. Στον πλακούντα και ειδικότερα στα κύτταρα του αμνιακού σάκου και του φθαρού, εντοπίστηκε το mRNA της προενδοθηλίνης και της ενδοθηλίνης 1 (Benigni et al 1991, Kubota et al 1992). Έχουν ανιχνευθεί διάφοροι παράγοντες που ευνοούν την παραγωγή της ET 1 όπως ο «επιδερμικός αυξητικός παράγοντας» (EGF epidermal growth factor), TGF-beta, «ιντερλευκίνη 1» (Sunnergen et al 1990, Itoh et al 1994, Sagawa et al 1994).

Η ικανότητα του πλακούντα να παράγει ET 1 αυξάνει με την πρόοδο της κύησης (Fant et al 1993). Στα κύτταρα του πλακούντα παράγεται ET 1 με υδρόλυση της φωσφορικής ινοσιτόλης και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης τις πρώτες 14-17 εβδομάδες κύησης (Kubota et al 1992).

Σε κυήσεις υψηλού κινδύνου όπως υπέρταση της κύησης και προεκλαμψία παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του mRNA της ET 1 στον πλακούντα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων (McMahon et al 1993, Di

Iorio et al 1996). Ειδικότερα παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή ET 1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των ομφαλικών αρτηριών και διαταραχή του εξισορροπητικού μηχανισμού που ρυθμίζει την παραγωγή ET 1 και «μονοξειδίου του αζώτου» (Leszczunska-Gorzalak et al 1998, Lowe et al 2000). Μελέτες υποστηρίζουν ότι η μεταβολή στη συσταλτική συμπεριφορά του μυομητρίου ακύμονος και εγκύμονος μήτρας, πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης της «από το cGMP-εξαρτημένη βιοχημική οδό χάλασης» και των «εξαρτώμενα από το Ca^{++} κανάλια K^+ » (Bradley et al 1998).

Έγχυση ενδοθηλίνης σε χαμηλές δόσεις επιφέρει αγγειοδιαστολή και έκκριση αγγειοδιασταλτικών παραγόντων από το ενδοθήλιο των αγγείων (Cameron et al 1995). Σε μεγαλύτερες δόσεις προκαλεί αγγειοσύσπαση με ενεργοποίηση των καναλιών Ca^{++} (Kiowski et al 1991, Bodelsson et al 1992). Έχει σημαντικό ρόλο στη συσταλτική συμπεριφορά ακύμονος και εγκύμονος μήτρας και στα αγγεία του πλακούντα με συνέπεια να επηρεάζει την ροή του αίματος μεταξύ μητέρας και εμβρύου (Svane et al 1993, Fried et al 1994, Kubrickiene et al 2000). Μελέτες δείχνουν ότι πιθανά ενέχεται στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας (Kubrickiene et al 1994, Wolff et al 1996, Kaya et al 1999).

Η ET 1 δρα άμεσα στις λείες μυικές ίνες, σε αγγειακούς και μη ιστούς, και αυξάνει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{++} είτε με απελευθέρωση από ενδοκυττάριας πηγές είτε ενεργοποιώντας βιοχημικές οδούς που ευνοούν την είσοδο των ιόντων στο κύτταρο.

Σε καλλιέργειες κυττάρων του ενδομητρίου διαπιστώθηκε αύξηση της έκκρισης προσταγλανδίνης F2a (Cameron et al 1991), και της παραθορμόνης (Casey et al 1993) μετά από επίδραση ενδοθηλίνης.

Η ET 1 έχει ρυθμιστικό ρόλο στην ισορροπία των μηχανισμών που καθορίζουν τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων, έχοντας σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ινομυωμάτων (Tetrin Clary et al 1999).

Στην ωθήκη η ET 1 παράγεται από το ενδοθήλιο των ωθηκικών αγγείων και δρα σαν τοπικός μιτωτικός παράγοντας ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, ενώ εμποδίζει την έκκριση προγεστερόνης- τη βασική και την διεγερόμενη από την HCG-(Kamada et al 1995, Karam et al 1999, Ara et al 1998). Συμμετέχει επίσης στη διαδικασία καρκινογένεσης της ωθήκης είτε δρώντας σαν μιτωτικός παράγοντας που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών του καρκινώματος είτε αυξάνοντας τη νεοαγγειογένεση μέσω του «παράγοντα που παραγόμενος από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων ευνοεί τις διαδικασίες πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης αυτών-VEGF vascular endothelial growth factor (Bagnato et al 1999, Moraitis et al 1999, Salani et al 2000).

ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΥΟΜΗΤΡΙΟΥ

ANATOMIA

Η μήτρα είναι ένα κοίλο μυώδες όργανο, που βρίσκεται μέσα στην ελάσσονα πύελο, μεταξύ ουροδόχου κύστης και απευθυσμένου. Το τοίχωμα της μήτρας αποτελείται από τρεις χιτώνες, τον βλεννογόνο, τον μυϊκό, και τον ορογόνο οι οποίοι εμφανίζουν διαφορές ανάλογα με την ηλικία και τη λειτουργική κατάσταση του οργάνου. Ο μυϊκός χιτώνας που ονομάζεται και μυομήτριο, αποτελεί τον παχύτερο χιτώνα της μήτρας. Σχηματίζεται από δεσμίδες λείων μυϊκών ινών, οι οποίες χωρίζονται σε τρεις ασαφείς στιβάδες, την έσω τη μέση και την έξω. Από τις στιβάδες αυτές η έξω είναι λεπτή και αποτελείται από επιμήκεις και κυκλωτερείς μυϊκές ίνες. Η μέση στιβάδα αποτελείται κυρίως από κυκλωτερείς και ελικοειδώς φερόμενες ίνες. Η έσω στιβάδα, που βρίσκεται αμέσως κάτω από το βλεννογόνο, αποτελείται από επιμήκεις μυϊκές ίνες, παράλληλες προς τον επιμήκη άξονα της μήτρας. Από τις τρεις αυτές μυϊκές στιβάδες, η μέση είναι η ογκωδέστερη και περιλαμβάνει άφθονα αιμοφόρα αγγεία, για αυτό και ονομάζεται και αγγειώδης στιβάδα.

Στον τράχηλο το μυομήτριο περιλαμβάνει λείες μυϊκές ίνες, που προέρχονται κυρίως από τη μέση-αγγειώδη στιβάδα και άφθονο συνδετικό ιστό, όπου και οφείλεται η σκληρότητα του τμήματος αυτού της μήτρας.

Οι μυϊκές ίνες του μυομητρίου εμφανίζουν μεταβολές τόσο κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου όσο και κατά τη εγκυμοσύνη. Κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου, την πρώτη εβδομάδα παρατηρείται βράχυνση των μυϊκών ινών, στη συνέχεια το μήκος τους προοδευτικά αυξάνει, για να φτάσει στο μεγαλύτερο μέγεθος κατά τη διάρκεια της τέταρτης εβδομάδας.

Κάθε μυική ίνα αποτελείται από επιμηκυσμένα λεπτά σωμάτια κυττάρων «δίκην αδραχτιού» που το καθένα περικλείει ένα μοναδικό πυρήνα. Τα

κύτταρα περιέχουν νημάτια ακτίνης και μυοσίνης II. Παρατηρείται στις λείες μυϊκές ίνες μεγαλύτερου βαθμού βράχυνση κατά τη διάρκεια των συστολών, και δυνατότητα παραγωγής εκτενέστερων μετατοπίσεων.

Στην εγκυμοσύνη το μήκος των μυϊκών ινών αυξάνει πάρα πολύ, φτάνοντας περίπου στο δεκαπλάσιο του αρχικού τους μήκους. Οι ίνες αυξάνουν σε πάχος και σε αριθμό. Συγχρόνως αυξάνει σημαντικά και ο συνδετικός ιστός που βρίσκεται μεταξύ των μυϊκών δεσμίδων. Μετά τον τοκετό οι διαστάσεις των μυϊκών ινών ελαττώνονται γρήγορα και η μήτρα αποκτά το μέγεθος που είχε πριν την εγκυμοσύνη.

Η ανθρώπινη μήτρα έχει ινίδια κολλαγόνου τύπου I, III, IV, VI, που φέρουν τα παρακείμενα μυϊκά ινίδια σε ισχυρή σύνδεση, δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ τους για τη μεταφορά ερεθισμάτων και την επέκταση της συστολής.

Κυτταροπλασματικός σκελετός των λείων μυϊκών ινών της μήτρας

Ο κυτταροπλασματικός σκελετός των λείων μυϊκών ινών της μήτρας, αποτελεί μια δυναμική δομή από μικροϊνίδια ακτίνης, ενδιάμεσα ινίδια, και μικροσωληνάρια που επιτρέπουν στο κύτταρο να παίρνει διάφορα σχήματα και να κάνει κινήσεις. Η δομή αυτή του κυτταροπλασματικού σκελετού έχει μελετηθεί με καλλιέργειες κυττάρων μυομητρίου και ανοσοϊστοχημεία, χρησιμοποιώντας αντισώματα κατά της βινκουλίνης, κυττοκερατίνης, βιμεντίνης, τουμπουλίνης, και RhoA (J.T.H.T.Yu and Bernal 1998).

Τα κύτταρα του μυομητρίου είναι πολύ πλούσια σε ινίδια ακτίνης, που φαίνεται να διατάσσονται σε παράλληλες δεσμίδες ως προς τον επιμήκη άξονα των κυττάρων. Τα ινίδια ακτίνης δημιουργούν γέφυρες με τοπικά σημεία συνδέσεων – πυκνά σωμάτια- , στα οποία η βινκουλίνη είναι σε

μεγάλα ποσά. Αυτές οι συνδέσεις ακτίνης – βινκουλίνης είναι πολύ σημαντικές για τη αποτελεσματική δραστηριότητα των μυϊκών ινών της μήτρας.

Τα ενδιάμεσα ινίδια (βιμεντίνη, κυττοκερατίνη) δημιουργούν ένα ισχυρό ιστό που απλώνεται σε όλο το κυτταρόπλασμα εκτός από τον πυρήνα. Παρόμοια διάταξη έχουν και τα μικροσωληνάρια. Η μεταφορά συγκεκριμένων μορίων μέσα στο κύτταρο, απαιτεί τη σύνδεσή τους με πρωτεΐνες της μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος, όπως το Rho, που ανήκει στην οικογένεια των GTP-binding proteins. Αυτή η σύνδεση ενεργοποιεί τα ινίδια ακτίνης και προκαλεί την συστολή.

Η συστολή αυτή δεν αφορά μόνο τη συστολή ενός μεμονωμένου κυττάρου, αλλά και τη μεταφορά της συστολής σε παρακείμενα κύτταρα, μέσω συνδέσεων που υπάρχουν ανάμεσα σε συγκεκριμένες ομάδες. Σε αυτές τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, σημαντικό ρόλο έχει η *κονεξίνη 43* (Miyoshi et al 1998). Δημιουργούν ένα δίκτυο γεφυρών και συνδέσεων που βοηθά στη σύγχρονη συστολή των μυϊκών ινιδίων. Όπως έδειξαν σε πειράματά τους οι Garfield et al 1995 στο τέλος της κύησης και κατά τη διάρκεια του τοκετού παρατηρείται μια αύξηση των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων, όπως και του ποσού της κονεξίνης. Η διάταση της μεμβράνης των μυϊκών κυττάρων προκαλεί επίσης αύξηση των συνδέσεων και της κονεξίνης. Οι διαφορές που παρατηρούνται στην ένταση της συστολής, τη διάρκεια, τον τρόπο εξαρτάται από τη σύσταση και διάταξη των μικροϊνιδίων του κυτταροπλάσματος.

Η βινκουλίνη είναι μια σημαντική πρωτεΐνη σύνδεσης των ινιδίων ακτίνης με το εξωκυττάριο περιβάλλον, μέσω πλακών σύνδεσης που δημιουργεί. Ενδιάμεσα ινίδια, όπως κυττοκερατίνες (29 διαφορετικά είδη), βιμεντίνες, είναι πρωτεΐνες που εμφανίζονται σε επιθηλιακά κύτταρα, ο ρόλος τους όμως δεν

έχει πλήρως διερευνηθεί. Τα μικροσωληνάρια συμμετέχουν στη μίτωση των κυττάρων, βοηθούν την κίνηση, και σε άλλες σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΛΕΙΩΝ ΜΥΪΚΩΝ ΙΝΩΝ ΜΗΤΡΑΣ.

Η πρωταρχική λειτουργία των μυϊκών ινών είναι η παραγωγή κίνησης, σαν απάντηση σε κάποιο ερέθισμα. Μετατρέπουν ένα χημικό ή ηλεκτρικό ερέθισμα σε μηχανική απάντηση. Η ένταση της συστολής όπως και ο ρυθμός επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες με θετική ή αρνητική ινότροπο δράση. Η ανατομία, η διάταξη των μυϊκών ινών, η απάντηση σε ερεθίσματα, το δυναμικό της έντασης συστολής, οι ικανότητες διάταξης, η ουδός διέγερσης για την έναρξη συστολής, και η δυνατότητα παραμονής σε συστολή για μεγάλες περιόδους παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Το έναυσμα όμως πάντα της συστολής είναι η αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{++} .

Η μεμβράνη του κάθε μυϊκού κυττάρου έχει υποδοχείς που παρουσιάζουν ειδικότητα σύνδεσης με συγκεκριμένα ουσίες- μόρια. Δημιουργούνται έτσι συνάψεις οι οποίες είναι ικανές να προκαλέσουν ή να ρυθμίσουν συστολή. Πιο αναλυτικά η σύνδεση του διεγέρτη με τον υποδοχέα της μεμβράνης, ο οποίος συνδέεται με G πρωτεΐνες, ενεργοποιεί τον υποδοχέα, ο οποίος διεγείρει την G πρωτεΐνη και προκαλεί το διαχωρισμό του δραστικού «alpha» - τμήματος της.

Το δραστικό υποτομήμα «alpha» της G πρωτεΐνης συνδεόμενο με την αδενυλική κυκλάση οδηγεί στην αύξηση του cAMP το οποίο φωσφορυλιώνει

εξειδικευμένα υποστρώματα πρωτεϊνικών δομών, ενεργοποιώντας το «εξαρτημένο από το cAMP ένζυμο της πρωτεϊνικής κινάσης A»(PKA) Για να δράσει το cAMP ως ενδοκυττάριος μεταβιβαστής του εξωκυττάριου σήματος απαιτείται η δυνατότητα γρήγορης αυξομείωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ως απάντηση στα εξωκυττάρια σήματα. Αυτό παρατηρείται σε ενεργοποίηση του υποδοχέα με ορμόνες, όπου η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του cAMP μπορεί να αλλάξει ως και 5 φορές σε διάστημα δευτερολέπτων.

Το δραστικό «alpha» τμήμα της G πρωτεΐνης ενεργοποιεί και την PLC, η οποία άμεσα διασπά την PIP2 σε IP3 και διασυλγλυκερόλη (DAG). Η IP3 αποτελεί ένα υδατοδιαλυτό μόριο που διαχέεται γρήγορα στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος. Προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca^{++} μέσω απελευθέρωσης του από κανάλια της ενδοπλασματικής μεμβράνης είτε από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η διασυλγλυκερόλη (DAG) με τη σειρά της διασπάται σε αραχιδονικό οξύ, το οποίο δρα είτε ως ενδοκυττάριος μεταβιβαστής είτε ως μέσο παραγωγής προσταγλανδινών, προστακυκλινών και θρομβεξανών. Η διασυλγλυκερόλη (DAG) μέσω άλλης οδού ενεργοποιεί την PKC-«σερίνη/θρεονίνη- πρωτεϊνική κινάση» η οποία με την αρχική αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{++} μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη και φωσφοριλιώνει επιλεγμένες πρωτεΐνες στο κύτταρο στόχο.

Τα ιόντα Ca^{++} μέσα στο κύτταρο συνδέονται με πρωτεΐνες στόχους και μεταβάλλουν τη δραστικότητά τους. Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι η «καλμοδουλίνη», η οποία αποτελεί το 1% της πρωτεΐνης του κυττάρου. Αποτελείται από 150 αμινοξέα με 4 θέσεις μεγάλης χημικής συγγένειας με το Ca^{++} . Το σύμπλοκο Ca^{++} ενεργοποιεί τις «από το σύμπλοκο Ca^{++}

/καλμοδουλίνης εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες» που με της σειρά τους φωσφοριλιώνουν άλλες πρωτεΐνες στόχους.

Οι G πρωτεΐνες αυτό-απενεργοποιούνται με υδρόλυση του συνδεδεμένου με αυτές GTP. Το cAMP καταστρέφεται από μία ή περισσότερες cAMP φωσφοδιεστεράσες που το υδρολύουν σε 5-μονοφωσφορική αδενοσίνη.

Οι λείες μυϊκές ίνες δέχονται ερεθίσματα από το νευρικό σύστημα. Οι νευρώνες ανήκουν στο αυτόνομο νευρικό σύστημα και δημιουργούν πολλαπλές συνδέσεις με τις μυϊκές ίνες. Σε κάθε σημείο σύνδεσης ο επιμήκης άξονας της ίνας διατείνεται κίρσοειδώς ώστε να περιλάβει τον προσυναπτικό μηχανισμό, και έτσι οι υποδοχείς έχουν ευρεία διασπορά γύρω από την προσυναπτική μεμβράνη. Τα ερεθίσματα που φτάνουν στη μυϊκή ίνα μπορούν να είναι από περισσότερους από έναν νευρώνες και να παρατηρείται είτε ανεξάρτητη συστολή μιας μυϊκής ίνας με τη γειτονική της είτε συστολή των μυϊκών ινών σαν ομάδα. Ειδικά στη μήτρα τα μυϊκά κύτταρα έχουν συνδέσεις μεταξύ τους με αποτέλεσμα να κάνουν συστολή ταυτόχρονα και με την ίδια κατεύθυνση, για την επίτευξη μεγαλύτερης έντασης. Λειτουργούν έτσι σαν ενιαία μυϊκή ομάδα.

Οι μυϊκές ίνες αποτελούν στρώματα, χιτώνες ή δέσμες και οι κυτταρικές τους μεμβράνες έρχονται σε επαφή μεταξύ τους σε πολλαπλά σημεία ώστε η δύναμη που αναπτύσσεται σε μια ίνα να μεταδίδεται και στην επόμενη. Οι κυτταρικές μεμβράνες συνδέονται επίσης μεταξύ τους και με χασματικές συνδέσεις, μέσα από τις οποίες μπορούν να μετακινηθούν ελεύθερα ιόντα από το ένα κύτταρο στο άλλο, με αποτέλεσμα τη μεταφορά του δυναμικού ενεργείας στην επόμενη και ταυτόχρονα τη σύγχρονη συστολή όλων των μυϊκών ινών.

Στους λείους μύες περιέχονται μικκύλια ακτίνης και μυοσίνης. Η διεργασία της συστολής ενεργοποιείται από ιόντα ασβεστίου, πραγματοποιείται δε διάσπαση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) για την παροχή ενέργειας για τη συστολή. Μεγάλος αριθμός μικκυλίων ακτίνης συνδέονται με τα πυκνά σωμάτια τα οποία είναι είτε προσκολλημένα στην κυτταρική μεμβράνη είτε διάσπαρτα στο εσωτερικό του κυττάρου και συγκρατούνται με ένα ιστό από πρωτεΐνες. Ορισμένα από τα πυκνά σωμάτια της μεμβράνης συνδέονται και με γειτονικού κυττάρου με διακυτταρικές πρωτεϊνικές γέφυρες. Η δύναμη που αναπτύσσεται με τη συστολή μεταδίδεται κυρίως με αυτές τις συνδέσεις.

Διάσπαρτα μεταξύ των μικκυλίων ακτίνης είναι τα μικκύλια μυοσίνης, τα οποία έχουν διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από το διπλάσιο των μικκυλίων ακτίνης. Σε μελέτες που έγιναν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι τα μικκύλια ακτίνης είναι 15 φορές περισσότερα από τα μικκύλια μυοσίνης.

Νευρομυϊκές συνδέσεις.

Νευρικές ίνες του αυτόνομου νευρικού συστήματος διακλαδίζονται στην επιφάνεια ενός στρώματος από λείες μυϊκές ίνες, χωρίς να έχουν άμεση επαφή αλλά σχηματίζοντας διάσπαρτες συνδέσεις όπου εκκρίνεται η διαβιβαστική τους ουσία προς το μεσοκυττάριο υγρό. Εκεί όπου υπάρχουν πολλά στρώματα από μυϊκές ίνες οι νευρικές ίνες νευρώνουν μόνο το εξωτερικό στρώμα και από αυτό η διέγερση μεταφέρεται προς τα εσωτερικά στρώματα, με αγωγή δυναμικών ενεργείας μέσα από τη μυϊκή μάζα ή με επακόλουθη διάχυση της διαβιβαστικής ουσίας. Στα κυστίδια των νευρικών απολήξεων του αυτόνομου νευρικού συστήματος περιέχεται ακετυλοχολίνη ή νορεπινεφρίνη που αποτελούν τις διαβιβαστικές ουσίες. Οι δύο αυτές ουσίες

έχουν αντίθετη δράση στις λείες μυϊκές ίνες, εκεί που η μία είναι διεγερτική η άλλη αναστέλλει και το αντίθετο. Η δράση τους ενεργοποιείται με σύνδεση με υποδοχείς της μεμβράνης της μυϊκής ίνας. Οι υποδοχείς αυτοί ρυθμίζουν τη διάνοιξη ή όχι διαύλων ιόντων, παίζοντας έτσι ρυθμιστικό ρόλο στη συστολή.

Σε φυσιολογική κατάσταση ηρεμίας το δυναμικό της μεμβράνης είναι 50-60 mV περίπου. Τα δυναμικά ενεργείας είναι δύο τύπων, οξυκόρυφα δυναμικά και δυναμικά ενεργείας με οροπέδιο. Τα οξυκόρυφα δυναμικά διαρκούν 10-50 msec, και εκλύονται από ηλεκτρικό ερέθισμα, επίδραση ορμονών, επίδραση διαβιβαστικών ουσιών από νευρικές ίνες, ή και αυτόματα. Στα δυναμικά ενεργείας τύπου οροπέδιο η έναρξη της συστολής είναι τυπική, όμως αντί ταχείας επαναπόλωσης της μεμβράνης, υπάρχει καθυστέρηση της επαναπόλωσης εκατοντάδες έως χιλιάδες msec. Με το φαινόμενο αυτό εξηγούνται οι μεγάλες χρονικές περίοδοι συστολής σε μυϊκές ίνες της μήτρας.

Βιοχημεία της συστολής.

Το έναυσμα για τη συστολή των λείων μυϊκών ινών είναι μια αύξηση των ενδοκυττάρων ιόντων Ca^{++} . Αυτή η αύξηση μπορεί να προκαλείται από νευρικά ερεθίσματα, ορμονικά ερεθίσματα, διάταση της ίνας, και από χημικές μεταβολές στο άμεσο περιβάλλον της ίνας. Τα στάδια που ακολουθούνται από την αύξηση των ιόντων Ca^{++} μέχρι τη συστολή είναι τα ακόλουθα

(Word et al) :

- 1) σύνδεση της ρυθμιστικής ορμόνης καλμοδουλίνης με 4 ιόντα Ca^{++} .
- 2) Ενεργοποίηση της κινάσης της μυοσίνης (MLCK –myosin light chain kinase)
- 3) Το σύμπλεγμα καλμοδουλίνης – ασβεστίου συνδέεται με την κινάση της μυοσίνης, ένζυμο που προκαλεί φωσφοριλίωση και την ενεργοποιεί.

4) Αλληλεπίδραση με την ακτίνη και υδρόλυση του ATP.

Η ρυθμιστική ορμόνη που έχει σημαντικό ρόλο στη συστολή των λείων μυϊκών ινών είναι η *καλμοδουλίνη*. Η ενεργοποίηση της γίνεται με τη σύνδεση της με 4 ιόντα ασβεστίου. Μια από τις ελαφρές αλυσίδες εκάστης κεφαλής μυοσίνης, που λέγεται *ρυθμιστική αλυσίδα*, φωσφορυλιώνεται με την επίδραση κινάσης της μυοσίνης. Όταν η αλυσίδα αυτή δε φωσφορυλιώνεται ο κύκλος σύνδεσης – αποσύνδεσης της κεφαλής δεν επιτελείται. Όταν όμως φωσφορυλιώνεται η κεφαλή αποκτά την ικανότητα να συνδεθεί με το μικκύλιο ακτίνης να προχωρεί σε όλη τη διεργασία της ανακύκλησης, με αποτέλεσμα την πρόκληση της συστολής.

Όταν η συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} ελαττώνεται κάτω από ένα καθορισμένο επίπεδο όλες οι παραπάνω διεργασίες αναστρέφονται, εκτός από τη φωσφορυλίωση της κεφαλής της μυοσίνης. Για την αναστροφή αυτής απαιτείται το ένζυμο *φωσφατάση της μυοσίνης*, που αποσπά τη φωσφορική ρίζα από τη ρυθμιστική ελαφρά αλυσίδα. Η ανακύκληση τότε σταματά και επέρχεται η λήξη της συστολής. Ο χρόνος που απαιτείται για τη χάλαση της συστολής εξαρτάται από το ποσό της δραστηρικής φωσφατάση της μυοσίνης.

Στις λείες μυϊκές ίνες παρατηρείται το *φαινόμενο μάνταλο*. Όταν ο μυς έχει αναπτύξει την πλήρη του συστολή ο βαθμός της ενεργοποίησής του, ελαττώνεται πολύ κάτω από το αρχικό του επίπεδο, παρόλο που ο μυς εξακολουθεί να διατηρεί το την ολική δύναμη συστολής του. Η ενέργεια που καταναλώνεται για τη διατήρηση της συστολής είναι μηδαμινή. Η σημασία του μηχανισμού μάνταλο συνίσταται στο ότι με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή

η παρατεταμένη τονική σύσπαση μυός για πολλές ώρες με μικρή κατανάλωση ενέργειας.

Ερέθισμα για τη έναρξη συστολής-ο ρόλος του Ca^{++}

Δεν είναι ξεκάθαρο αν υπάρχουν στο μυομήτριο ειδικά κύτταρα βηματοδότες ή έχουν όλα τα κύτταρα τέτοια δράση. Η ακριβής ροή των ιόντων που δίνει το έναυσμα για συστολή, θέλει επίσης περαιτέρω διερεύνηση. Στο ανθρώπινο μυομήτριο ο αριθμός των διαύλων Ca^{++} δεν αλλάζει κατά τη διάρκεια της κύησης (Thornton et al 2000) όπως παρατηρήθηκε σε κουνέλια, ενώ στους διαύλους καλίου παρουσιάζεται μείωση κατά τη διάρκεια της κύησης (Song et al 1999).

Η εκπόλωση της μεμβράνης των μυϊκών κυττάρων, οδηγεί σε άνοιγμα των τασεο-ευαίσθητων διαύλων Ca^{++} . Παρατηρείται έτσι ροή ιόντων Ca^{++} μέσα στο κύτταρο και αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} . Αυτή η μεταφορά γίνεται μέσω L-type διαύλων Ca^{++} . Η παρουσία νιφεδιπίνης, ενός αναστολέα των διαύλων Ca^{++} εμποδίζει την είσοδο των ιόντων Ca^{++} ενδοκυττάρια. Στο ανθρώπινο μυομήτριο πιθανολογείται και η παρουσία T-type διαύλων Ca^{++} , οι οποίοι είναι αντιπροσωπευτικοί για το μυομήτριο και η απόδειξη της παρουσίας τους θα επιτρέψει τη χρήση πιο εκλεκτικών μυοχαλαρωτικών για τη μήτρα. Είναι σημαντική η παρουσία Ca^{++} στο εξωκυττάριο περιβάλλον, χωρίς αυτό δεν γίνεται συστολή.

Αποθήκες Ca^{++} υπάρχουν και ενδοκυττάρια, μέσα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο του μυϊκού κυττάρου. Το σαρκοπλασματικό δίκτυο είναι κοντά στην κυτταρική μεμβράνη, όπου εμφανίζει συνδέσεις με τμήματα του εξωκυττάρου χώρου, μέσω ειδικών υποδοχέων. Όταν υπάρχει ένδεια ιόντων Ca^{++} στο εξωκυττάριο περιβάλλον, Ca^{++} εκλύεται από το σαρκοπλασματικό δίκτυο με

δύο μηχανισμούς. Ο ένας είναι μέσω σύνδεσης με υποδοχείς της μεμβράνης IP_3 - Ca^{++} release (υπάρχουν 3 τύποι), ο αριθμός των οποίων αυξάνει με την έλλειψη Ca^{++} . Ο δεύτερος μηχανισμός είναι μέσω του ίδιου του Ca^{++} , CICR- Ca^{++} induced Ca^{++} release, γνωστοί και ως υποδοχείς ριανοδίνης. Η καφεΐνη και το Ca^{++} δρουν αγωνιστικά προς αυτά τα κανάλια και ευνοούν τη μεταφορά ιόντων Ca^{++} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου.

Η δράση της οξυτοκίνης στο μυομήτριο, προκαλεί αύξηση του Ca^{++} και συστολή. Ακόμη και σε εξωκυττάριο περιβάλλον με έλλειψη Ca^{++} προκαλεί μια μικρή αύξηση στο ενδοκυττάριο Ca^{++} και συστολή.

Παρόμοια δράση έχουν και άλλες ουσίες όπως η καρβαχόλη και η πρостаγλανδίνη F_{2a} . Οι Luckas et al (1999) έδειξε ότι η οξυτοκίνη μπορεί να προκαλέσει συστολές στη μήτρα, σε περιβάλλον χωρίς Ca^{++} , κάνοντας όμως ερεθισμό της μυϊκής ίνας με διάλυμα KCL 80mM. Χωρίς την επίδραση χλωριούχου καλίου, δεν προκλήθηκε συστολή (Tribe et al 1999).

Η χάλαση των μυϊκών ινών επέρχεται με την απομάκρυνση του αυξημένου Ca^{++} από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου στον εξωκυττάριο χώρο, ή στο σαρκοπλασματικό δίκτυο. Και οι δύο αυτές μεταφορές γίνονται με ενεργητική μεταφορά. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή τη μεταφορά είναι οι PMCA-plasma membrane calcium ATPase, SERCA, και η αντλία Na^+ - Ca^{++} . Η μεταφορά Ca^{++} προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο είναι μέχρι ένα όριο, και δεν μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά την αυξημένη ποσότητα Ca^{++} ενδοκυττάρια, αν δεν λειτουργεί η αντλία στη μεμβράνη του κυττάρου.

Συστολή.

Η αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{++} οδηγεί σε διασταύρωση των ινιδίων ακτίνης- μιοσίνης, υδρόλυση του ATP, και συστολή. Κατά τη διάρκεια της κύησης, οι συγκεντρώσεις ακτίνης- μιοσίνης αυξάνουν και η μήτρα υπερτρέφεται. Αυξάνουν τα αποθέματα γλυκαγόνου και λιπαρών οξέων, όπως επίσης και η αιμάτωση της μήτρας. Όλα αυτά συμβαίνουν για την προετοιμασία του μιομητρίου για τον τοκετό, όπου απαιτούνται ισχυρές συσπάσεις για την έξοδο του εμβρύου και του πλακούντα. Κατά τη διάρκεια των συστολών αυτών υπάρχει ο κίνδυνος ισχαιμίας της μήτρας και υποξίας του εμβρύου. Αναπτύσσεται λοιπόν ένας μηχανισμός προστασίας, που δρα μέσω μείωσης του ενδοκυττάριου pH, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί τη μετακίνηση Ca^{++} από το εσωτερικό του κυττάρου προς το εξωκυττάριο περιβάλλον, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση των συστολών.

Άνοιγμα των διαύλων Ca^{++}

Είσοδος ιόντων Ca^{++} και αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης , άνοιγμα των διαύλων K^+ -των εξαρτημένων από το Ca^{++} , υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης , κλείνουν οι διάυλοι Ca^{++} και αρχίζει να μειώνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{++} , κλείνουν και οι διάυλοι K^+ εξαρτημένοι από το Ca^{++} .

Χάλαση της συστολής.

Για να γίνει χάλαση πρέπει να σταματήσει η είσοδος ιόντων Ca^{++} και αποφωσφορυλίωση των ελαφρών αλύσων της μιοσίνης. Οι αλλαγές στο δυναμικό της μεμβράνης οδηγούν στο άνοιγμα των L-type διαύλων Ca^{++} , και είσοδό του στο κύτταρο για τη συστολή. Αυτή η είσοδος εμποδίζεται με δύο

μηχανισμούς, την απενεργοποίηση των διαύλων Ca^{++} και την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης.

Όταν το Ca^{++} αρχίζει να μειώνεται, σταματά και η ενεργοποίηση της MKCL – κινάση της μυοσίνης, από το σύμπλεγμα καλμοδουλίνης - Ca^{++} . Οι φωσφολυλιωμένες ελαφρές αλυσοί, αποφωσφορυλιώνονται με τη δράση της φωσφατάσης της μυοσίνης (MLCP – myosin light chain phosphatase). Οι Haeberle et al ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν ότι οι αποφωσφορυλίωση των ελαφρών αλυσών της μυοσίνης από την MLCP προκαλεί χάλαση.

Η σημασία των διαύλων Ca^{++}

Η κυτταρική μεμβράνη των λείων μυϊκών ινών έχει πολλούς διαύλους ασβεστίου που εξαρτώνται από το δυναμικό, και λιγότερους διαύλους νατρίου. Για αυτό το λόγο το νάτριο συμμετέχει ελάχιστα ως καθόλου στη γένεση του δυναμικού ενεργείας στις λείες μυϊκές ίνες. Από την άλλη η εισροή ιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό της ίνας είναι υπεύθυνη για το δυναμικό ενεργείας. Οι διάυλοι Ca^{++} διανοίγονται πολύ βραδέως, σε σύγκριση με τους διαύλους νατρίου. Αυτό εξηγεί και τη βραδύτητα των δυναμικών ενεργείας των λείων μυϊκών ινών. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της εισροής Ca^{++} μέσα στα κύτταρα είναι ότι το ίδιο το Ca^{++} δρα απευθείας πάνω στο συστατικό μηχανισμό του μυός για να προκαλέσει συστολή.

Στους περισσότερους τύπους λείων μυών, όλα σχεδόν τα ιόντα Ca^{++} που προκαλούν τη συστολή, εισέρχονται στο κύτταρο από το εξωκυττάριο υγρό κατά τη διάρκεια του δυναμικού ενεργείας. Όταν όμως το εξωκυττάριο Ca^{++} είναι ελαττωμένο, μπορεί να εκλυθεί Ca^{++} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου. Η συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} στο εξωκυττάριο υγρό είναι μεγάλη και κατά τη διάρκεια του δυναμικού ενεργείας εισέρχονται στο εσωτερικό της

μυϊκής ίνας, όπου διαχέονται σε όλα τα τμήματα και προκαλούν συστολή. Ο χρόνος που απαιτείται για αυτή τη διάχυση είναι 200-300 msec, ονομάζεται λανθάνων χρόνος και προηγείται της έναρξης της συστολής.

Οι δίαυλοι Ca^{++} ενεργοποιούνται και από ορμόνες. Η διάνοιξη αυτών των διαύλων δεν προκαλεί τη γένεση δυναμικού ενεργείας, ούτε και σημαντική μεταβολή στο δυναμικό ηρεμίας λόγω της ταυτόχρονης μεταφοράς ιόντων νατρίου προς το εξωτερικό του κυττάρου. Ωστόσο η συστολή συνεχίζεται όσο οι δίαυλοι παραμένουν ανοιχτοί. Όσο πιο ανεπτυγμένο είναι το σαρκοπλασματικό δίκτυο της μυϊκής ίνας, τόσο ταχύτερα συστέλλεται, γιατί η εισροή Ca^{++} μέσα από την κυτταρική μεμβράνη είναι πολύ πιο βραδεία σε σύγκριση με την απελευθέρωση ιόντων Ca^{++} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο.

Όταν η εξωκυττάρια συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} ελαττώνεται σε χαμηλό επίπεδο, οι συστολές των μυϊκών ινών αναστέλλονται σχεδόν πλήρως. Ακόμη και το σαρκοπλασματικό δίκτυο μετά από λίγο χάνει τα αποθέματά του σε Ca^{++} . Έτσι η δύναμη της συστολής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση Ca^{++} στο εξωκυττάριο υγρό.

Για τη χάλαση των μυϊκών ινών απαιτείται η απομάκρυνση των ιόντων Ca^{++} . Αυτή επιτελείται με τις αντλίες ασβεστίου, που αντλούν ιόντα Ca^{++} προς το εξωκυττάριο περιβάλλον ή προς το σαρκοπλασματικό δίκτυο.

Η αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{++} περιορίζεται με την αποφωσφορίλωση του IP_3 σε IP_4 που προκαλεί επαναπροώθηση των ιόντων Ca^{++} προς τις ενδοκυττάρια αποθήκες (αρνητικό feedback) και ενεργός άντληση του Ca^{++} εκτός του κυττάρου μέσω της αντλίας Ca^{++} -ATPασης στην κυτταρική μεμβράνη, αντλίας Na-Ca ανταλλαγής ιόντων, και του μηχανισμού άντλησης

των ιόντων Ca^{++} στο εσωτερικό του ενδοπλασματικού δικτύου. Η εκπόλωση της μεμβράνης και η δίοδος του Ca^{++} μέσω των τασεοεξαρτώμενων καναλιών ακολουθείται από ενεργοποίηση των καναλιών K^+ , υπερπόλωση της μεμβράνης, μειωμένη δραστηριότητα των καναλιών Ca^{++} , που σε συνδυασμό με τις αντλίες Ca^{++} οδηγεί σε μείωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{++} και τερματισμό της συστολής. Τερματισμός της συστολής μπορεί να παρατηρηθεί και σε παρατεταμένη επίδραση του ερεθίσματος διεγέρτη στον υποδοχέα. Αυτό οδηγεί είτε σε μείωση του mRNA που κωδικοποιεί τον υποδοχέα είτε σε απευαισθητοποίηση του υποδοχέα, που επιτυγχάνεται με φωσφοριλίωση του υποδοχέα από την PKC και από τις GRK (Lefkowitz et al 1998, Hosey et al 1995, Premont et al 1998). Προκαλείται έτσι ο διαχωρισμός του υποδοχέα και γίνεται δυνατή η μετέπειτα επανευαισθητοποίησή του.

Μηχανικά ερεθίσματα από διάταση των μυϊκών ινιδίων, μπορούν να προκαλέσουν συστολή. Όταν οι σπλαχνικές μυϊκές ίνες διατείνονται σε ικανό βαθμό, συνήθως προκαλείται η εμφάνιση αυτόματων δυναμικών ενεργείας. Αυτό επιτρέπει στο όργανο που υφίσταται υπέρμετρη διάταση να συστέλλεται αυτόματα, με αποτέλεσμα να προβάλλει αντίσταση στη διάταση.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΥΟΜΗΤΡΙΟΥ.

Η προγεστερόνη μόνη της ή σε συνδυασμό με οιστραδιόλη μειώνει σημαντικά τον τόνο της συσταλτικής δραστηριότητας του μυομητρίου, χωρίς όμως να επηρεάζει τη συχνότητα των αυτόματων συστολών (Fu et al 1996, Kilarski et al 1996). Αναστέλλει in vitro την ενδοκυττάρια αύξηση των επιπέδων του Ca^{++} , που προκαλείται με την επίδραση της PGF2a και καταστέλλει τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στην προσταγλανδίνη (Fu et al 2000, Gordan et al 1997).

Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της συσταλτικής συμπεριφοράς του μυομητρίου, μελετήθηκε εκτεταμένα σε πειράματα με πειραματόζωα. Η οιστραδιόλη σε αρουραίους αναχαιτίζει τη δράση των L τύπου καναλιών ασβεστίου, ενώ σε συνδυασμό με προγεστερόνη επιφέρει αναστολή της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση του KCL (Zeitune et al 1996). Σε άλλα πειράματα με ωκύτταρα βατράχου και μυομήτριο αρουραίου παρατηρήθηκε αύξηση της εισροής Ca^{++} μετά την εφαρμογή προγεστερόνης, που φαίνεται να γίνεται μέσω των L τύπου καναλιών Ca^{++} (Tasaka et al 1991).

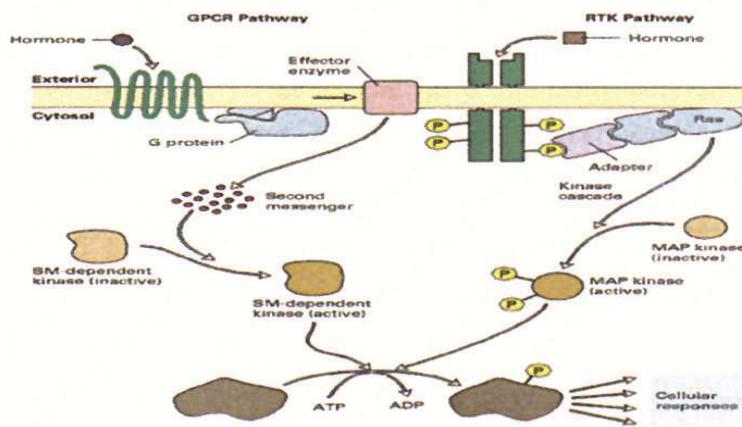
Οι επιδράσεις της προγεστερόνης στις λείες μυϊκές ίνες είναι πολλαπλές. Η προγεστερόνη μπορεί να προκαλέσει μείωση της συσταλτικής δραστηριότητας του μυομητρίου μέσω γενομικών ή μη οδών. Μια από τις μη γενομικές δράσεις της προγεστερόνης στη συσταλτικότητα είναι η αναστολή της εισόδου ιόντων ασβεστίου διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, και κινητοποίηση ασβεστίου από ενδοκυττάρια αποθήκες (Kosterin et al 1994). Ωστόσο οι περισσότερες δράσεις της προγεστερόνης

πραγματοποιούνται μέσω ειδικής σύνδεσης με ορμονικούς υποδοχείς του πυρήνα με συγκεκριμένες αλλαγές στη έκφραση των γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα η προγεστερόνη μειώνει την έκφραση της «κονεξίνης 43»(Garfield et al 1980, Lye et al 1993), επηρεάζει την δεσμευτική ικανότητα των υποδοχέων οξυτοκίνης(Jacobson et al 1987, Soloff et al 1983), μειώνει την από την οισραδιόλη προκαλούμενη αύξηση της «cGMP-dependent protein kinase» (Word et al 1998), και μειώνει την έκφραση της ιντερλευκίνης - 8 στα κύτταρα του στρώματος του μυομητρίου και του τραχήλου(Ito et al 1994).

Πειραματικές μελέτες στις οποίες έγινε καλλιέργεια κυτάρων λείων μυϊκών ινών σε διάλυμα με ανάλογο προγεστερόνης – MPA (medroxyprogesterone acetate) έδειξαν σημαντική μείωση στην από την ενδοθηλίνη 1 και την οξυτοκίνη αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου (Fomin et al 1999). Έδειξαν ακόμη και μια σημαντική μείωση της σύνδεσης της ET 1 με τους υποδοχείς της. Από την άλλη η καλλιέργεια των κυτάρων στην προγεστερόνη δεν είχε επίδραση στην έκλυση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Fomin et al 1999). Η ομοιοστασία του ενδοκυττάρου ασβεστίου εξαρτάται από την προγεστερόνη και κατ'επέκταση η συστατικότητα του μυομητρίου είναι απόλυτα συνδεδεμένη με τα επίπεδα προγεστερόνης στη συστηματική κυκλοφορία.

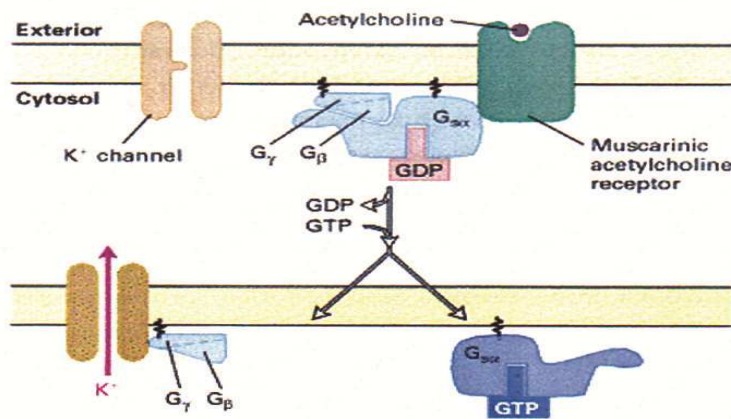
Η βιοχημική οδός μέσω της οποίας προκαλείται η δράση της προγεστερόνης στο μυομήτριο, είναι μέσω της μεταβολής της διαπερατότητας της μεμβράνης-απενεργοποίηση των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου (VOCs)- που καταλήγει σε ανάλογη μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{++} (Perusquia et al 1990), και σε μεταβολή των καναλιών Ca^{++}

των εξαρτώμενους από τους εκάστοτε υποδοχείς (ROCs- receptor operated calcium channels) (Carsten et al 1987).



Σχήμα 7: Κυτταρική ανταπόκριση στη επίδραση ορμονών.

Σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα της μεμβράνης μέσω ενεργοποίησης της G πρωτεΐνης και του RAS ογκογονιδίου, οδηγεί στη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών κινασών και την κυτταρική απάντηση.



Σχήμα 8: Διέγερση των K^+ καναλιών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στα λεία μυϊκά κύτταρα .Σύνδεση της ακετυλοχολίνης (διεγέρτης) με τον υποδοχέα επιφέρει ενεργοποίηση της G πρωτεΐνης. Αυτό γίνεται με κατανάλωση ενέργειας και μετατροπή του GTP σε GTP. Τα εκλυόμενα β και γ σύμπλοκα συνδέονται με ενεργοποιούν τα κανάλια K^+ .Η αύξηση της διαπερατότητας των καναλιών K^+ προκαλεί υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και άμβλυνση της συσταλτικής δραστηριότητας.

Σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα της μεμβράνης προκαλεί μια σειρά από βιοχημικές μεταβολές που καταλήγουν σε φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, με τελικό αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της κυτταρικής απάντησης στα εξωκυτάρια σήματα. Ειδικότερα τροποποιείται η έκφραση των G πρωτεϊνών, που συνδέονται λειτουργικά με τους υποδοχείς της μεμβράνης και προκαλούν τη μεταβολή της λειτουργίας του υποδοχέα. Αυτό προκαλεί την αλλαγή του ενδοκυττάριου σήματος και το βαθμό ενεργοποίησης των από τον υποδοχέα εξαρτώμενου καναλιού Ca^{++} . Προκαλείται τελικά αναστολή της συστολής στο επίπεδο της PLC, ή της PKC, ή της καλμοδουλίνης και της από την καλμοδουλίνη εξαρτώμενη κινάση της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης-MLCK (Myosin Light Chain Kinase) (Kostrzewska et al 1993, Tetrin-Clary et al 1999).

Ένας άλλος τρόπος δράσης της προγεστερόνης είναι μέσω της προώθησης εισροής των ιόντων Ca^{++} μετά από εκπόλωση των κυττάρων, όπως για παράδειγμα στο ανθρώπινο σπέρμα που παρατηρείται ένα εκπολωτικό ρεύμα Na (Foresta et al 1995). Άλλος τρόπος δράσης της προγεστερόνης είναι μέσω παρεμπόδισης της εξώθησης των ιόντων Ca^{++} τόσο από την Ca^{++} -ATPase της μεμβράνης, όσο και από το μηχανισμό διαμεμβρανικής μεταφοράς ιόντων Na^+/Ca^{++} . Επιπλέον η προγεστερόνη προκαλεί υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης και ενεργοποίηση των «καναλιών K^+ των εξαρτώμενων από τα ιόντα Ca^{++} » (Anwer et al 1993).

Στις λείες μυϊκές ίνες παρατηρούνται κανάλια K^+ που διακρίνονται σε βραδείας δράσης –επιβραδυνόμενης απάντησης, άμεσης απάντησης, και από το Ca^{++} ενεργοποιούμενα. Η λειτουργία τους ρυθμίζεται τόσο από

νευροδιαβιβαστές όσο και από ορμόνες (Kihira et al 1990, Tritthart et al 1991, Yamaki et al 2001).

Με την επίδραση του ερεθίσματος αναπτύσσεται ένα δυναμικό ενεργείας, το οποίο τερματίζει με την απενεργοποίηση των καναλιών Na^+ . Για τη δυνατότητα ανταπόκρισης σε επόμενο ερέθισμα απαιτείται επαναπόλωση της μεμβράνης που πραγματοποιείται από τα βραδείας δράσης – επιβραδυνόμενης απάντησης κανάλια K^+ . Η επαναπόλωση της μεμβράνης προκαλεί απενεργοποίηση των καναλιών K^+ . Υπάρχει μια συγκεκριμένη ουδός πάνω από την οποία το κύτταρο ανταποκρίνεται στο ερέθισμα, μέσω των καναλιών K^+ άμεσης απάντησης. Τα από το Ca^{++} ενεργοποιούμενα κανάλια K^+ μειώνουν την ανταπόκριση του κυττάρου σε σταθερή και προοδευτικά αυξανόμενη διέγερση.

Στο ανθρώπινο μυομήτριο διακρίνουμε τα κανάλια K^+ μεγάλης αγωγιμότητας (260 picosiemens) – που ενεργοποιούνται από ιόντα Ca^{++} - και μικρής αγωγιμότητας (142 picosiemens) που δεν επηρεάζονται από τις μεταβολές των ιόντων Ca^{++} . Τα μεγάλης αγωγιμότητας κανάλια K^+ είναι ευαίσθητα στις μεταβολές Ca^{++} , στις μεταβολές της μεμβράνης, στην εξωκυττάρια παρουσία τετρααιθυλαμμωνίου και είναι εξαιρετικά υψηλής εκλεκτικότητας για τα ιόντα K^+ (Perez et al 1993).

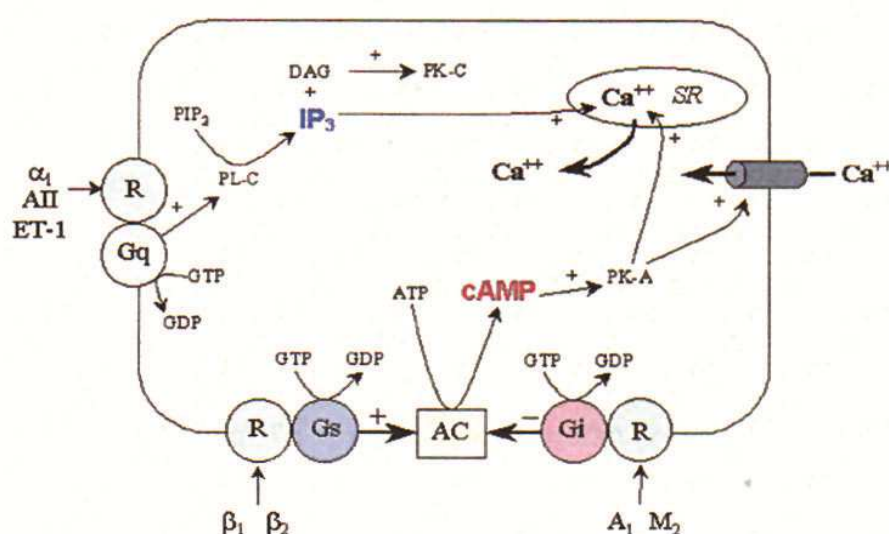
Η προσθήκη του διεγέρτη, προκαλεί το άνοιγμα των καναλιών K^+ , αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης στα ιόντα K^+ , που οδηγεί τελικά σε δυναμικό ενεργείας του κυττάρου στο επίπεδο του δυναμικού ηρεμίας για το επίπεδο του K^+ και στην υπερπόλωση του κυττάρου που δέχτηκε το ερέθισμα.

Πειραματικές μελέτες με *in vitro* επίδραση προγεστερόνης -17P σε μυϊκές ίνες ανθρώπινου μυομητρίου δεν δείχνουν άμεση καταστολή των συστολών. Πιθανολογείται λοιπόν ότι η κατασταλτική δράση της 17P στη συσταλτικότητα του μυομητρίου που παρατηρείται σε *in vivo* μελέτες, γίνεται μέσω γενομικών οδών που καταλήγουν σε μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων που ευοδώνουν την μυοχάλαση (Sexton et al 2004). Προηγούμενες *in vitro* μελέτες έδειχναν καταστολή των συστολών των λείων μυϊκών ινών με τη δράση της προγεστερόνης ή μεταβολιτών της (Barnafi et al 1974, Thornton et al 1999, Fu et al 1993).

Παρατηρούνται στο επίπεδο της επίδρασης των ορμονών στη συσταλτική συμπεριφορά του μυομητρίου αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων ορμονών. Έτσι παρατηρείται μείωση της ανταπόκρισης του μυομητρίου στην ωκυτοκίνη παρουσία οιστραδιόλης, όπως και μείωση της έντασης της ανταπόκρισης στη δράση της ET 1 παρουσία προγεστερόνης ωστόσο δεν έχουν διευκρινιστεί ακριβώς οι βιοχημικές οδοί μέσω των οποίων πραγματοποιούνται αυτές οι αλλαγές (Fu et al 1996, Phaneuf et al 1997, Fomin et al 1999, Domali et al 2001).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ET 1 ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΛΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΜΥΟΜΗΤΡΙΟΥ.

Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{++} είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη συστολή της λείας μυϊκής ίνας. Η ενδοθηλίνη σε χαμηλές δόσεις, όπως και στην αρχή της συστολής μειώνει την ευαισθησία των μυϊκών ινών στην αύξηση της ενδοκυττάρια συγκέντρωση Ca^{++} , ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις προκαλεί αύξηση αυτής της ευαισθησίας (Sakata et al 1989,1992).



Σχήμα 9: Απεικόνιση της πρόκλησης συστολής των λείων μυϊκών κυττάρων από την ET1. Σύνδεση της ET 1 με τον υποδοχέα της μεμβράνης οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάρια Ca^{++} είτε με αύξηση της εισόδου τους από τον εξωκυττάριο χώρο είτε με απελευθέρωσή τους από ενδοκυττάρια αποθήκες. Η μεταφορά από τον εξωκυττάριο χώρο γίνεται μέσω του φωσφοinosιτιδικού κύκλου και με κατανάλωση ενέργειας ATP και ενεργοποίηση της PKA.

Επίδραση της ενδοθηλίνης στις λείες μυϊκές ίνες οδηγεί σε αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων Ca^{++} ως και 31%, όταν από τον περιβάλλοντα χώρο λείπει ασβέστιο, ενώ σε περιβάλλον με ασβέστιο

παρατηρείται αύξηση ως και 143% του ενδοκυττάρου Ca^{++} (Fomin et al 1999). Η αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου γίνεται μέσω σύνδεσης με υποδοχείς της μεμβράνης του πλάσματος που ευνοούν την είσοδο ιόντων ασβεστίου, και έκλυση ασβεστίου από ενδοκυττάρια αποθέματα μέσω της ενεργοποίησης του παράγοντα $-IP_3$ (inositol trisphosphate) (Word et al 1990). Η επίδραση προγεστερόνης στις λείες μυϊκές ίνες μειώνει την αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου που παρατηρείται από την επίδραση της ενδοθηλίνης 1 (Fomin et al 1999).

Ταυτόχρονη παρουσία ασβεστίου και νιφεδιπίνης στον εξωκυττάριο χώρο προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{++} 95%, γεγονός που υποδηλώνει τη συμμετοχή των υποδοχέων που συνδέονται με τους διεγέρτες (Word et al 1990, Fried et al 1994).

Σε πειράματα σε μυομήτριο ακύμονος μήτρας παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης, της συχνότητας και του βασικού τόνου των αυτόματων συστολών με τη δράση της ET 1 (Maggi et al 1991, Word et al 1992, Sakata et al 1992, Kaya et al 1999). Στο αρχικό στάδιο της συστολής η ET 1 προκαλεί παραγωγή IP_3 μέσω της PLC, και απελευθέρωση των ιόντων Ca^{++} από τις ενδοκυττάρια αποθήκες. Σε ένα δεύτερο στάδιο η ET 1, μέσω της PLD προκαλεί ενεργοποίηση της PKC (protein kinase C) και παρατεινόμενη είσοδο ιόντων Ca^{++} από τον εξωκυττάριο χώρο (Xuan et al 1994, Breuiller-Fouche et al 1998).

Πειραματικές μελέτες σε μυομήτριο προ και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενδοθηλίνης 1 έδειξαν ότι το ορμονικό προφίλ (ωοθυλακική, ωχρινική φάση του κύκλου και εμμηνόπαυση) τροποποιεί την συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της ET1 (Domali et

al 2001). Στην ομάδα της εμμηνόπαυσης οι δράση της ET 1 είναι πιο μεγάλης διάρκειας, και αυτό δικαιολογείται λόγω της έλλειψης οιστρογόνων. Στην ίδια ομάδα η προγεστερόνη έχει ανασταλτική δράση στην από την ET 1 προκαλούμενη συστολή που παρατηρείται (Domali et al 2005). Στην ομάδα της ωχρινικής φάσης του κύκλου τα αποτελέσματα της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου είναι παρόμοια με αυτά των εμμηνοπαυσιακών γυναικών και αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τα υψηλά επίπεδα προγεστερόνης στη φάση αυτή που δρα ανταγωνιστικά προς τα οιστρογόνα και δημιουργεί ένα περιβάλλον παρόμοιο με αυτό των εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Η ET 1 φαίνεται να δρα συνεργικά με μητροσυσπαστικούς παράγοντες όπως η ωκυτοκίνη σε μυομήτριο εγκύμονος μήτρας, μεταβάλλοντας την αυτόματη συσταλτικότητα, όχι όμως και σε ακύμονα μήτρα (Valenzuela et al 1995). Σε εγκύμονα μήτρα αύξηση της συσταλτικότητας ως και 20-30% μετά τη δράση της ET 1 μέσω της ενεργοποίησης της PKC (Word et al 1992, Sakata- Karaki 1992, Osada et al 1997, Eude et al 2001). Η αύξηση της συσταλτικότητας με τη δράση της ET1 σε εγκύμονα μήτρα οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των υποδοχέων ET της μεμβράνης και των υποδοχέων που ευνοούν την είσοδο ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο. Η ενδοθηλίνη έχει έντονη μητροσυσπαστική δράση στην εγκύμονο μήτρα, δρα συνεργικά με την ωκυτοκίνη αλλά παρόλα αυτά δεν έχει αποδειχθεί ο ρόλος της στην έναρξη του τοκετού. Μετά το τέλος του τοκετού και με την πτώση των επιπέδων της ωκυτοκίνης, η ET 1 αναλαμβάνει ρόλο μητροσύσπασης (Neulen et al 1994). Σε κυήσεις υψηλού κινδύνου παρατηρείται πιο έντονη ανταπόκριση του μυομητρίου στην ET 1 (Kaya et al 1999).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Πειραματικές μελέτες τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπινο μυομήτριο έχουν δείξει τη μείωση της συσταλτικής δραστηριότητας του μυομητρίου μετά την επίδραση προγεστερόνης, μέσω της μείωσης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης Ca^{++} .

Η ET 1 αποτελεί ισχυρό αγγειοσυσπαστικό πεπτιδίο που μέσω των ETA υποδοχέων προκαλεί αύξηση της συσταλτικής δραστηριότητας του ανθρώπινου μυομητρίου. Παλαιότερες μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία προγεστερόνης μειώνεται σημαντικά τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της ET 1.

Η παρουσία εξωκυτταρίου Ca^{++} είναι σημαντική για την έναρξη και διατήρηση της συστολής. Σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο η ET 1 προκαλεί αύξηση του ενδοκυτταρίου ασβεστίου ως και 31%, ενώ σε περιβάλλον με ασβέστιο η αύξηση αυτή είναι της τάξης του 143%.

Οι βιοχημικές οδοί μέσω των οποίων πραγματοποιούνται οι μεταβολές της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Ο ρόλος του ασβεστίου και αποδεδειγμένος για την έναρξη και τη διατήρηση της συστολής. Ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκείς μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που να μελετούν το ρόλο του ασβεστίου στο μηχανισμό της συσταλτικής ανταπόκρισης του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης, και την μεταβολή της συσταλτικής απάντησης στην ET 1, μετά από επίδραση προγεστερόνης στο προεμμηνοπαυσιακό μυομήτριο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν :

- A. Μελέτη της συσταλτικής συμπεριφοράς του μυομητρίου προεμμηνοπαυσιακών γυναικών στη δράση της προγεστερόνης.
- B. Μελέτη της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του ανθρώπινου προεμμηνοπαυσιακού μυομητρίου στη δράση της ET 1 και μετά από την επίδραση προγεστρόνης.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Το πειραματικό πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης περιλαμβάνει δύο κύριες ομάδες πειραμάτων.

A. Μελέτη της συσταλτικής ανταπακρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης.

B. Μελέτη της συσταλτικής ανταπακρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της ενδοθελίνης 1, και η μεταβολή αυτής της δράσης όταν έχει επιδράσει προγεστερόνη στον ιστό.

Τα τεμάχια μήτρας τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, λαμβάνονταν από γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, που υποβάλλονταν σε υστερεκτομία για καλοήθεις παθήσεις της μήτρας και των ωοθηκών. Πρόκειται για γυναίκες που είχαν εισαχθεί στη Μαιευτική – Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Για την παρούσα μελέτη δόθηκε έγκριση από την Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλες οι γυναίκες των οποίων οι ιστοί λαμβάνονταν για τα πειράματα ενημερωνόταν και έδιναν γραπτή συγκατάθεση.

Τα κριτήρια επιλογής των γυναικών για να συμπεριληφθούν στο πειραματικό πρωτόκολλο ήταν:

- Η ένδειξη για την υστερεκτομία ήταν για καλοήθεις παθήσεις της μήτρας και των εξαρτημάτων.
- Γυναίκες προεμμηνοπαυσιακές, στην εκκρινική ή την παραγωγική φάση του κύκλου, δεν είχαν σοβαρά προβλήματα υγείας

και δεν λάμβαναν ορμονικά σκευάσματα τουλάχιστον κατά του τελευταίους 3 μήνες.

- Κατά τη διάρκεια του χειρουργείου επικρατούσαν οι ίδιες συνθήκες χειρουργικής τεχνικής και ακολουθούσαν παρόμοιες συνθήκες αναισθησίας και φαρμακευτικής αγωγής.

Αμέσως μετά την αφαίρεση της μήτρας λαμβάνονταν ιστοτεμάχιο από μακροσκοπικά υγιή λείο μυικό ιστό από τον πυθμένα της μήτρας(Luchas et al 1978). Τα τεμάχια κοβόταν ελλειψοειδώς έτσι ώστε να διατηρούνται οι μυικές ίνες όσον το δυνατόν ακέραιες. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε διάλυμα Krebs's, που διατηρούνταν στους 4° C. Μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και η πειραματική διαδικασία άρχιζε αμέσως και περατωνόταν μέσα στις επόμενες 12 ώρες .

Πειραματική διάταξη.

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αποτελείται από:

- Περισταλτική αντλία.
- Υδατόλουτρο δύο θέσεων σταθερής θερμοκρασίας για διαπότιση των ιστών με σωλήνες Tygon διαφόρων διαστάσεων.
- Θερμαντήρα και κυκλοφορητή νερού.
- Θερμόμετρο.
- Μηχανομετατροπείς.
- Καταγραφικό δύο καναλιών με δύο προενισχυτές.
- Φιάλη με μίγμα αερίων 95% O₂ και 5% CO₂.

Περισταλτική αντλία.

Αντλία ρυθμιζόμενης ροής (minipulse 3, Gilson) με κεφαλή τεσσάρων καναλιών, 8 κυλίνδρων.

Ταχύτητα ροής: 0.05 ml/min έως 40 ml/min(72 psi / 5 bar max)

Ταχύτητα κεφαλής: 0-48 στροφές /λεπτό.

Υδατόλουτρο δύο θέσεων για διαπύση των ιστών

σταθερής θερμοκρασίας .

Κυλινδρική συσκευή (15X5 cm) όπου περιλαμβάνονται:

Δύο επιμήκεις σκαφοειδείς χώροι (3X 0.8X0.5 cm), σε παράλληλη διάταξη με έδαφος ελαστικής σιλικόνης.

Σπειράματα ελαστικών σωλήνων Tygon με εσωτερική διάμετρο 1/32'' και εξωτερική διάμετρο 3/32''(Cole-Palmer Instrument Company) στο εσωτερικό της κυλινδρικής συσκευής.

Θερμαντήρα και κυκλοφορητή νερού

Ο τύπος της συσκευής είναι Ultratherm 200, της εταιρείας κατασκευής Selecta.

Μέγιστη θέρμανση νερού 100°C. Πίεση νερού 150 mbar.

Ροή νερού 12L / min.

Χρησιμοποιούνταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για την κυκλοφορία νερού, θρεπτικού διαλύματος Kreb's και όλων των ουσιών που μελετώνταν στο πείραμα, στο υδατόλουτρο που περιείχε τους ιστούς, ενώ ταυτόχρονα απομάκρυνε τα υγρά στοιχεία που είχαν δράσει στον ιστό για κάποια περίοδο.

Θερμόμετρο.

Εταιρεία κατασκευής Digi-Sense, τύπος συσκευής 8525-00. Τύπος αισθητήρα θερμοκρασίας Thermistol 400, με ακρίβεια μέτρησης θερμοκρασίας 0.01 °C.

Μηχανομετατροπείς.

Εταιρεία κατασκευής Grass. Τύπος συσκευής FT 03, ισομετρικής και ιστονικής μέτρησης δύναμης. Υψηλής σταθεροποίησης και ακρίβειας (+/- 1%).

Υψηλής ανάλυσης (25000/1), με μέγιστη μεταβολή τιμής 50 mg/h στη μέγιστη καταγραφή (50 g).

Μέγιστη περιοχή καταγραφής 50 g χωρίς ελατήριο.

Ελάχιστη δύναμη καταγραφής 2 mg.

Μέγιστη μετατόπιση 1.1 mm.

Μέγιστη τάση τροφοδοσίας 8 Vdc.

Αντίσταση γέφυρας Winston 350 Ohm.

Μήκος άγκιστρου ανάρτηση ιστού 2 cm.

Χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για τη μετατροπή της μηχανικής ενέργειας από τη συστολή και τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών σε μεταβολή ηλεκτρικής τάσης.

Η λειτουργία του στηρίζεται στη θεωρία της γέφυρας Winston

$$e = [R_3 / R_3 + R_4 - R (+/-) \Delta R / R(+/-) \Delta R + R_2].$$

Καταγραφικό δύο διαύλων με δύο προενισχυτές.

Συσκευή τύπου 60-0694 της εταιρεία Harvard.

Είδος καταγραφής χαρτί βαθμονομημένο σε mm.

Ταχύτητα καταγραφής από 0.1 – 100 mm/sec.

Μεταβολή γραμμικότητας < 5% της μέγιστης ενίσχυσης.

Απόκριση συχνότητας 70 Hz.

Ευαισθησία εισόδου 30 mV/cm.

Μέγιστη είσοδο 10 V.

Αντίσταση εισόδου 100 Kohms.

Μέγιστη ενίσχυση ενισχυτή από χ1-χ10.

Προενισχυτής εταιρείας Harvard.

Επιλογή λειτουργιών: ποτενσιομετρική, ισομετρική, ισοτονική, πίεσης, πνευμογραφική, πληθυσμογραφική.

Αντίσταση εισόδου 200-1 Kohms.

Τροφοδοσία μηχανομετατροπών 8 Vdc.

Κατά τα πειράματα επιλέχθηκε η ισομετρική λειτουργία του προενισχυτή λόγω του τρόπου λειτουργίας της γέφυρας Winston.

Παλμογράφος δύο διαύλων 20 MHz, ψηφιακής αποθήκευσης.

Εταιρεία κατασκευής HAMEG, συσκευή τύπου HM 205-3.

Τρόποι λειτουργίας : εναλλασσόμενη ή διακεκομμένη απεικόνιση

αλγεβρικό άθροισμα ή διαφορά των δύο
καναλιών

λειτουργία χ-ψ

Εύρος συχνότητας 20 MHz.

Συντελεστής απόκλισης 10 mV-5V/cm σε δέκα βαθμονομημένα βήματα.

Σύνθετη αντίσταση εισόδου 1 Mohm/ 25 pf.

Μέγιστη τάση εισόδου 400 V maximum.

Μνήμη 2048x8 bits /κανάλι.

Αποστακτήρας .

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε σαν διαλύτης κατά την πειραματική διαδικασία υποβάλλονταν σε διαδικασία απιονισμού μέσω στήλης «ZALION 2004»(Ionel), καθώς και διπλής απόσταξης μέσω συσκευής « AUTOSTILL

4000X» (Jencons). Η αγωγιμότητα του τελικού προϊόντος καθοριζόταν αυστηρά σε 18 Megohm.cm.

Αντιδραστήρια.

Το διάλυμα Kreb's που χρησιμοποιούνταν αποτελούνταν από:

NaCl	110.9 mM
KCl	5.9 mM
MgCl ₂	1.1 mM
CaCl ₂	2mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1.2 mM
Glucose	9.6 mM
NaHCO ₃	25mM

Διάλυμα KCl 80mM. Για την παρασκευή ενός λίτρου:

NaCl	37ml
KCl	80ml
MgCl ₂	11ml
CaCl ₂	20ml
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.144gr
Glucose	1.730gr
NaHCO ₃	2.1 gr

Η ενδοθελίνη ET 1 (0.1 mg), και η προγεστερόνη (4 – Pregnene-3, 20 – dione) αγοράστηκαν από την εταιρεία SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Γερμανίας.

Η προγεστερόνη διαλύονταν σε αιθανόλη. Η συγκέντρωση της αιθανόλης που χρησιμοποιήθηκε, περιορίστηκε αυστηρά σε επίπεδο αραιότερο της 0.2 % v/v, ώστε να μην επηρεάζει τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα των λείων μυικών ινών στη δράση των ορμονών που μελετούνταν.

Η ET 1 διαλύονταν σε 4 ml απεσταγμένου νερού για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος (stock solution), συγκέντρωσης 10^{-5} M. Οι συγκεντρώσεις της ET 1 που χρησιμοποιούνταν σε κάθε πείραμα παρασκευάζονταν την ίδια μέρα, με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων χωρίς ασβέστιο ακολουθήθηκε ο ίδιος τρόπος παρασκευής των διαλυμάτων μόνο που δεν χρησιμοποιήθηκε ασβέστιο CaCl_2 σε καμία φάση της διαδικασίας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.

Αμέσως μετά την αφαίρεση του ιστοτεμαχίου της μήτρας από το χειρουργείο άρχιζε η πειραματική διαδικασία στο εργαστήριο Φυσιολογίας. Το κάθε πείραμα διεκπεραιωνόταν μέσα σε 10-12 ώρες από την αφαίρεση της μήτρας. Τα τμήματα του μυομητρίου τεμαχιζόταν με τη βοήθεια μικροσκοπίου σε επιμήκη τεμάχια, διαστάσεων $2 \times 5 \times 1$ mm. Ο τεμαχισμός γινόταν με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρηθούν κατά το δυνατόν ακέραιες οι μυικές ίνες. Τα τεμάχια που δεν χρησιμοποιούνταν άμεσα διατηρούνταν σε διάλυμα Krebs's (pH: 7.4) και συνεχώς αεριζόμενα με μίγμα 95% O_2 και 5% CO_2 .

Τα ιστοτεμάχια λείου μυικού ιστού που εξετάζονταν άμεσα τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο συνεχούς ροής. Το ένα άκρο του ιστού αγκιστρωνόταν σε ισομετρικό μηχανομετατροπέα και το άλλο άκρο σε λεπτές ασημένιες καρφίδες σε έδαφος σιλικόνης.

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ο ιστός συνεχώς τροφοδοτούνταν με ανακυκλούμενο διάλυμα Kreb's με ή χωρίς ασβέστιο, το οποίο συνεχώς αεριζόταν με μίγμα 95% O₂ και 5% CO₂. Η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 37° C σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Η μηχανική ενέργεια που παραγόταν από τη συστολή και τη χάλαση των λείων μυικών ινών καταμετρούνταν από ένα GRASS FTO3C ισομετρικό μηχανομετατροπέα και καταγράφονταν σε ένα Harvard καταγραφέα συχνότητας.

Στην αρχή κάθε πειράματος εφαρμοζόταν μια αρχική τάση 1 g στο κάθε ιστοτεμάχιο. Μετά την εφαρμογή αυτής της αρχικής τάσης, οι λείες μυικές ίνες άρχιζαν να συστέλλονται αυτόματα. Αυτή η αυτόματη συσταλτικότητα παρακολουθούνταν για τουλάχιστον δύο ώρες και έπειτα άρχιζε η εφαρμογή ορμονών και διαφόρων ουσιών διεγερτών στο ιστοτεμάχιο της μήτρας.

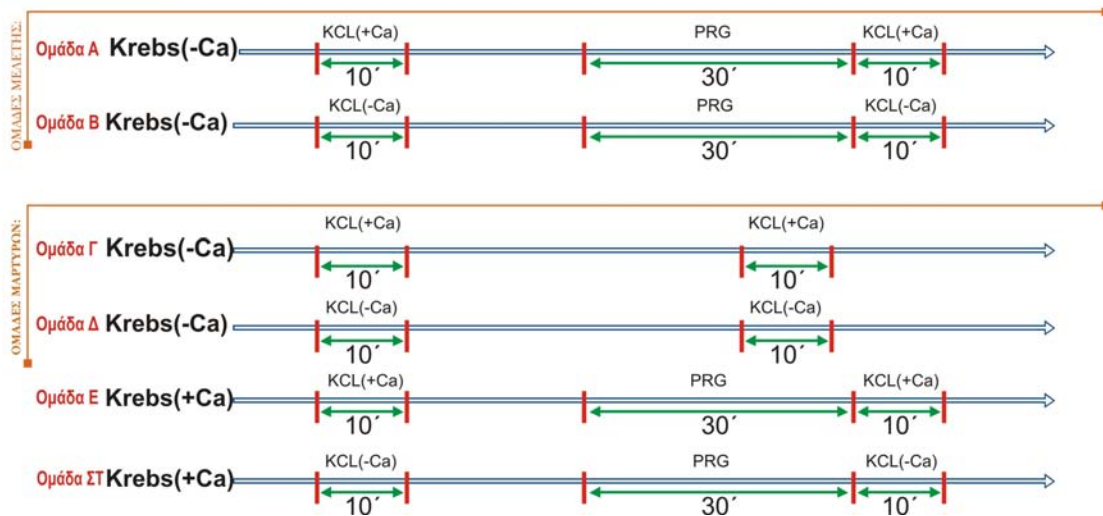
Α.Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης .

Συνολικά στο πρωτόκολλο αυτό μελετήθηκε η συσταλτικότητα του μυομητρίου 22 συνολικά γυναικών. Οι ηλικίες των γυναικών ήταν από 38 έως 53 έτη, με μέσο όρο τα 45 έτη. Η ένδειξη της υστερεκτομίας ήταν στις 14 από αυτές η ινομύωμα μήτρας, σε 5 καλοήθεις κύστεις ωοθηκών, σε 2 η πρόπτωση μήτρας και σε μία από αυτές ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου CIN III. Τα ιστολογικά αποτελέσματα των παρασκευασμάτων ήταν αρνητικά για κακοήθεια .

Ένδειξη υστερεκτομίας	1^οπειραματικό πρωτόκολλο	2^οπειραματικό πρωτόκολλο
Ινομύωμα μήτρας	14	9
Ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου	1	2
Αδενοματώδης υπερπλασία ενδομητρίου	–	2
Κύστη ωοθήκης	5	1
Πρόπτωση μήτρας	2	–
Ηλικία γυναικών (μέσος όρος)	38-53 έτη (45 έτη)	35-52 έτη (45 έτη)

Πίνακας 1 : Ένδειξη υστερεκτομίας των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη

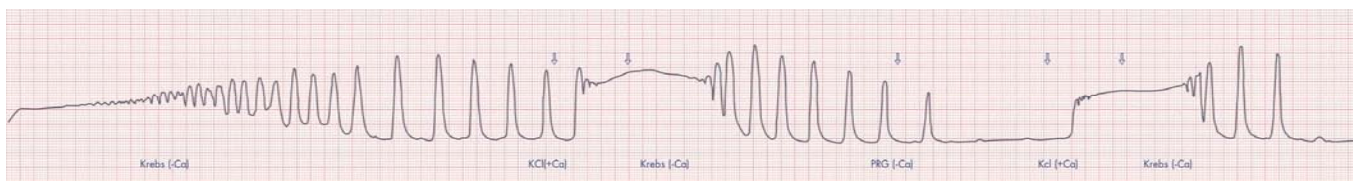
ΜΕΘΟΔΟΣ:



Σχήμα 10: Μεθοδολογία του 1^{ου} πειραματικού πρωτοκόλλου.

Οι ομάδες μελέτης του πειραματικού πρωτοκόλλου είναι οι ομάδες Α και Β. Οι ομάδες μαρτύρων για την ομάδα Α είναι οι Γ και Ε και για την ομάδα Β, οι Δ και ΣΤ. Στο τέλος κάθε πειράματος στον ιστό εφαρμοζόταν διάλυμα Krebs με ασβέστιο για να διαπιστωθεί η ζωτικότητα του ιστού, γεγονός που επιβεβαιώθηκε σε κάθε πείραμα. Η πειραματική διαδικασία είχε ως εξής:

Ομάδα μελέτης Α.



Διάγραμμα 1: Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής: Krebs (-Ca) → KCL(+Ca) για 10 min. → Krebs(-Ca) → progesterone 10^{-6} για 30 min → KCL(+Ca) για 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

Οι ίνες μυϊκού ιστού τοποθετούνταν στα υδατόλουτρα συνεχούς ροής και εφαρμοζόταν μία αρχική τάση 1 g. Οι ιστοί αφήνονταν να αναπτύξουν αυτόματη συσταλτικότητα σε διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο. Μέσα σε μία

ώρα από την έναρξη του πειράματος οι λείες μυϊκές ίνες ανέπτυσαν αυτόματη συσταλτικότητα, η οποία παρουσίαζε σταδιακή ελάττωση της έντασης, διάρκειας και ρυθμού των αυτόματων συστολών. Σε μερικές περιπτώσεις αυτή η σταδιακή ελάττωση οδηγούσε σε πλήρη αναστολή των συστολών. Στη συνέχεια εφαρμοζόταν στον ιστό διάλυμα KCl (80 mM) με Ca^{++} για 10 λεπτά. Η επίδραση του KCl στον ιστό ακολουθούσαν από συστολή της λείας μυϊκής ίνας, της οποίας η ένταση, η διάρκεια και το εμβαδό της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη μετρούνταν. Η συστολή που προκαλούνταν από το διάλυμα KCl είχε χαρακτηριστική μορφή με μια αρχικά απότομη αύξηση που ακολουθούσαν με αργή κάθοδο ως το αρχικό επίπεδο ηρεμίας.

Η εκπόλωση της μεμβράνης που προκαλούνταν από το διάλυμα KCl οφείλονταν στην αθρόα συλλογή ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο. Αυτή η απάντηση μπορεί να ανασταλεί αν αφαιρεθεί από το εξωκυττάριο περιβάλλον τελείως το ασβέστιο (Batra and Bengtsson 1978, Kostrzewska et al 1988).

Στη συνέχεια εφαρμοζόταν στον ιστό διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{++} για τουλάχιστον μία ώρα έως ότου ο ιστός «ξεπλυθεί» (wash out) από τον διεγέρτη και επανέλθει στον ρυθμό των αυτόματων συστολών του.

Ακολουθούσε εφαρμογή στον ιστό διαλύματος προγεστερόνης σε συγκέντρωση 10^{-6} για 30 min. Παλαιότερες μελέτες δείξαν ότι αραιότερες συγκεντρώσεις προγεστερόνης 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} , δεν μετέβαλλαν σημαντικά το μοντέλο της συσταλτικής συμπεριφοράς του μυομητρίου (Domali et al 2001). Αμέσως μετά εφαρμοζόταν διάλυμα KCl (80 mM) με Ca^{++} για 10 λεπτά. Στη συνέχεια αφήνονταν ο ιστός να «ξεπλυθεί» με διάλυμα Krebs χωρίς Ca^{++} και παρακολουθούνταν η συσταλτική του συμπεριφορά για τουλάχιστον δύο

ώρες. Στο τέλος του πειράματος όπως προαναφέρθηκε εφαρμοζόταν στον ιστό διάλυμα Kreb's με Ca^{++} για να ελεγχθεί η ζωτικότητα του.

Ομάδα μελέτης Β.



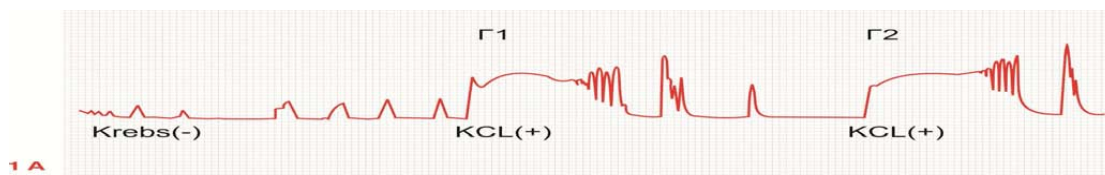
Διάγραμμα 2:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) → KCL(-Ca) για 10 min. → Krebs(-Ca) → progesterone 10^{-6} για 30 min → KCL(-Ca) για 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

Στα πειράματα αυτά ακολουθούνταν ακριβώς η ίδια πειραματική διαδικασία όπως και της ομάδας Α, μόνο που η διέγερση του ιστού γινόταν με KCl (80 mM) χωρίς Ca^{++} για 10 λεπτά.

Ομάδα μαρτύρων Γ.



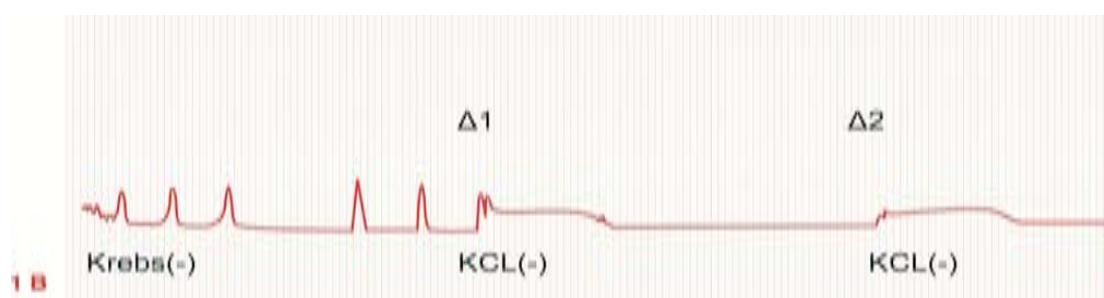
Διάγραμμα 3:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) → KCL(+Ca) για 10 min. → Krebs(-Ca) → KCL(+Ca) για 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

Στη ομάδα Γ των πειραμάτων, τα οποία αποτελούσαν ομάδα μαρτύρων για τα πειράματα της ομάδας Α, ακολουθούνταν η ίδια πειραματική διαδικασία με την ομάδα Α χωρίς όμως την εφαρμογή προγεστερόνης στον ιστό.

Ομάδα μαρτύρων Δ.



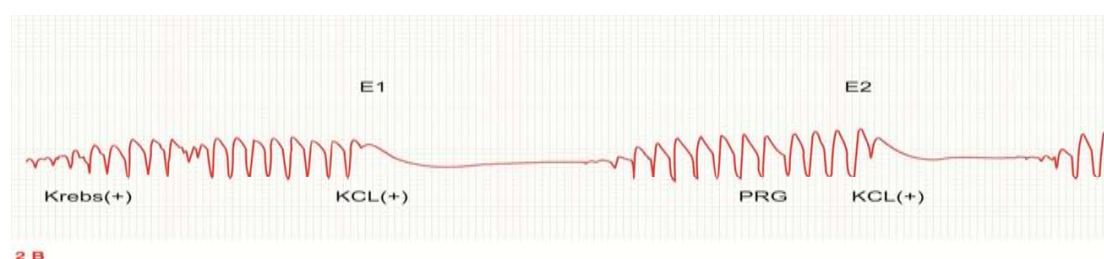
Διάγραμμα 4:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) → KCL(-Ca) για 10 min. → Krebs(-Ca) → KCL(-Ca) για 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

Η ομάδα Δ αυτή αποτελεί ομάδα μαρτύρων για τα πειράματα τύπου Β. Ακολουθούνταν η ίδια πειραματική διαδικασία με τα πειράματα τύπου Β, χωρίς την εφαρμογή προγεστερόνης στον ιστό.

Ομάδα μαρτύρων Ε.



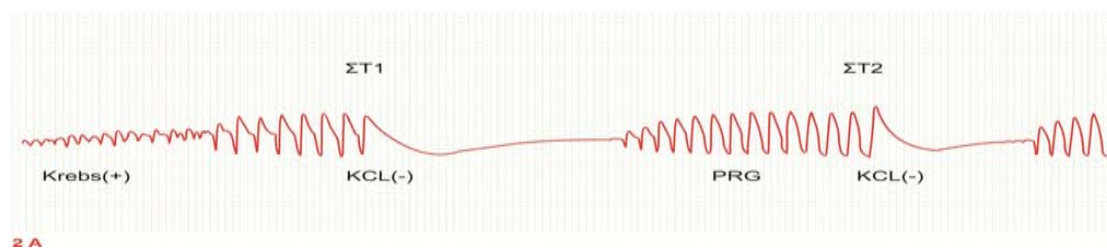
Διάγραμμα 5:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (+Ca) → KCL(+Ca) για 10 min. → Krebs(+Ca) → progesterone 10⁻⁶ για 30 min → KCL(+Ca) για 10 min → Krebs (+Ca).

Η ομάδα Ε αποτελεί ομάδα μαρτύρων για τα πειράματα τύπου Α. Ακολουθούνταν η ίδια πειραματική διαδικασία με τα πειράματα της ομάδας Α μόνο που χρησιμοποιήθηκε σε όλη τη διαδικασία διάλυμα Krebs με ασβέστιο.

Ομάδα μαρτύρων ΣΤ.



Διάγραμμα 6:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (+Ca) → KCL (-Ca) για 10 min. → Krebs (+Ca) → progesterone 10^{-6} για 30 min → KCL (-Ca) για 10 min → Krebs (+Ca).

Η ομάδα αυτή ήταν ομάδα μαρτύρων για την ομάδα Β.

Ακολουθούσαν η ίδια πειραματική διαδικασία με τα πειράματα της ομάδας Β, με τη χρήση διαλύματος Kreb's με ασβέστιο, σε όλη την πειραματική διαδικασία.

B.Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της ενδοθελίνης 1, και η μεταβολή αυτής της συμπεριφοράς με την επίδραση προγεστερόνης.

Στο πειραματικό πρωτόκολλο μελετήθηκε η συσταλτικότητα του μυομήτριου σε 14 ιστοτεμάχια μήτρας. Οι γυναίκες όλες ήταν προεμμηνοπαυσιακές ηλικίας 35 έως 52 ετών με μέση ηλικία τα 45 έτη. Η ένδειξη της υστερεκτομίας ήταν η ινομύομσ μήτρας σε 9 περιπτώσεις , ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του τραχήλου σε 2 περιπτώσεις, αδενοματώδης υπερπλασία ενδομητρίου σε άλλες 2 και κύστη ωοθήκης σε μία από αυτές.

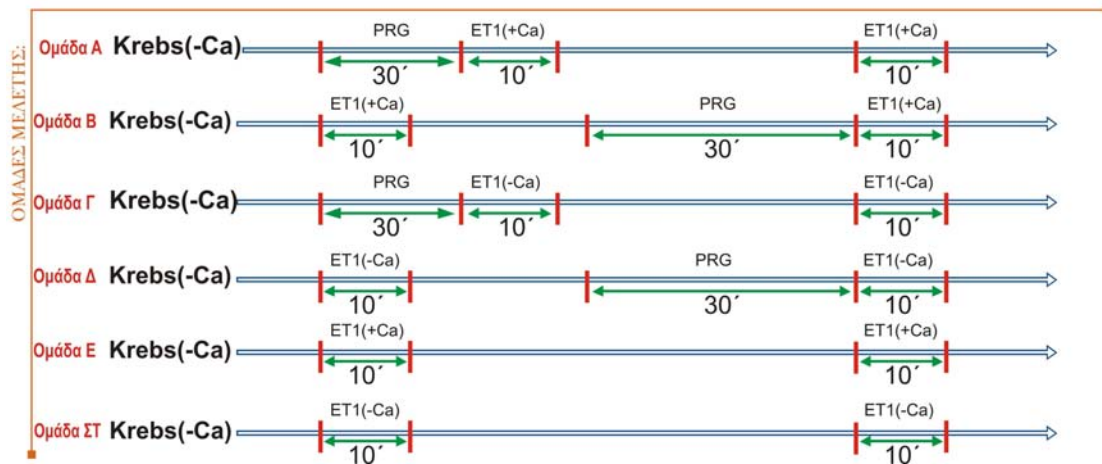
Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία ήταν:

-Διάλυμα Kreb's με και χωρίς ασβέστιο.

-Διάλυμα προγεστερόνης σε συγκέντρωση 10^{-6} χωρίς ασβέστιο στην παρασκευή του.

-Διάλυμα ενδοθελίνης σε συγκέντρωση 10^{-7} που παρασκευάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος(stock) ενδοθελίνης με διάλυμα Kreb's με ή χωρίς ασβέστιο.

ΜΕΘΟΔΟΣ:

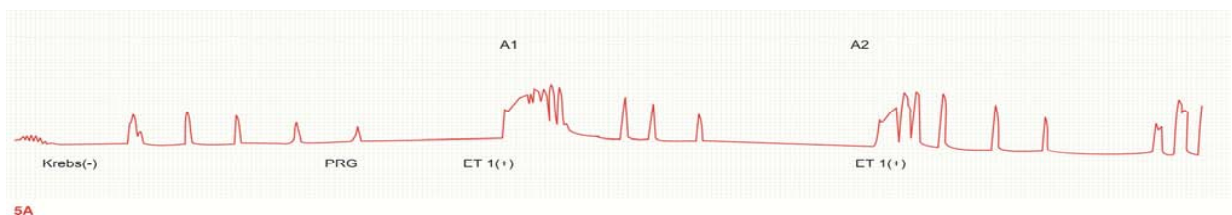


Σχήμα 11: Μεθοδολογία 2^{ου} πειραματικού πρωτοκόλλου.

Τα πειράματα αυτού του πρωτοκόλλου χωρίζονται σε 6 ομάδες.

Οι ομάδες μελέτης είναι οι Α, Β, Γ, Δ και οι ομάδες ελέγχου οι Ε για τις Α και Β και η ομάδα ΣΤ για τις Γ και Δ. Η πειραματική διαδικασία για την κάθε ομάδα είχε ως εξής:

Ομάδα μελέτης Α.



Διάγραμμα 7:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) → progesterone 10^{-6} (-Ca) για 30 min → ET 1(+Ca) για 10 min →

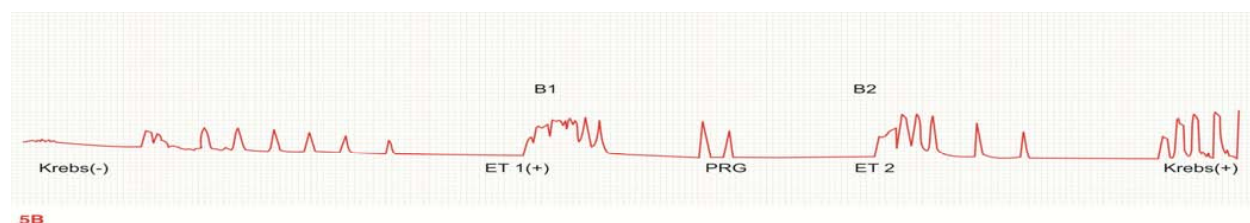
Krebs(-Ca) για 1-2 hours → ET 1(+Ca) για 10 min → Krebs (-Ca).

Οι ίνες μυϊκού ιστού τοποθετούνταν στα υδατόλουτρα συνεχούς ροής και εφαρμοζόταν μία αρχική τάση 1 g. Οι ιστοί αφήνονταν να αναπτύξουν αυτόματη συσταλτικότητα σε διάλυμα Krebs's χωρίς ασβέστιο. Μέσα σε μία ώρα από την έναρξη του πειράματος οι λείες μυϊκές ίνες ανέπτυσαν αυτόματη συσταλτικότητα, η οποία παρουσίαζε σταδιακή ελάττωση της έντασης, διάρκειας και ρυθμού των αυτόματων συστολών. Σε μερικές περιπτώσεις αυτή η σταδιακή ελάττωση οδηγούσε σε πλήρη αναστολή των συστολών.

Στη συνέχεια εφαρμοζόταν στον ιστό διάλυμα προγεστερόνης για 30 λεπτά, σε συγκέντρωση 10^{-6} που για την παρασκευή του δεν χρησιμοποιήθηκε ασβέστιο. Αμέσως μετά ακολουθούσε η εφαρμογή Ενδοθελίνης 1(-ET 1) με Ca^{++} για 10 λεπτά. Η συγκέντρωση της ET 1 που επιλέχθηκε ήταν 10^{-7} διότι είχε φανεί από προηγούμενες μελέτες ότι αραιότερες συγκεντρώσεις (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} M) δεν αλλάζουν τη μορφολογία της αυτόματης συσταλτικότητας του μυομητρίου, ενώ οι πυκνότερες (10^{-6} M) απαιτούν μεγαλύτερη ποσότητα ET1 και λόγω του υψηλού κόστους, δεν είναι η προτιμότερη επιλογή (Domali et al 2001).

Ακολουθούσε η εφαρμογή διαλύματος Krebs(-Ca) για 1 με 2 ώρες για να «ξεπλυθεί» (wash out) ο ιστός και να ανακτήσει αυτόματη συσταλτικότητα. Στη συνέχεια γινόταν μια δεύτερη διέγερση του ιστού με ET 1 με Ca^{++} για 10 λεπτά. Η διέγερση του ιστού με ET 1 ακολουθούσαν από συστολή της λείας μυϊκής ίνας, της οποίας η ένταση, η διάρκεια και το εμβαδό κάτω από την καμπύλη μετρώταν.

Ομάδα μελέτης Β.



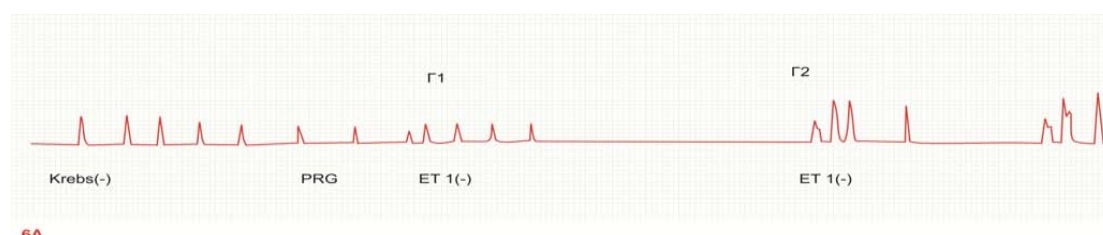
Διάγραμμα 8:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) min → *ET 1(+Ca) για 10 min* → *Krebs(-Ca) για 1-2 hours* →
progesterone 10⁻⁶ (-Ca) για 30 min → *ET 1(+Ca) για 10 min* → *Krebs (-Ca)*.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινούσε με την εφαρμογή στον ιστό διαλύματος Krebs χωρίς ασβέστιο για 2 περίπου ώρες έως ότου να αποκτήσει ο ιστός αυτόματη συσταλτικότητα. Ακολουθούσε η διέγερση του ιστού με διάλυμα ET 1(+Ca) για 10 min σε συγκέντρωση 10⁻⁷M. Ο ιστός ξεπλενόταν με διάλυμα Krebs χωρίς ασβέστιο για 1-2 ώρες και στη συνέχεια επιδρούσε στον ιστό διάλυμα προγεστερόνης χωρίς ασβέστιο σε συγκέντρωση 10⁻⁶ M για 30 λεπτά. Ακολουθούσε μία δεύτερη διέγερση του ιστού με ET 1(+ Ca) για 10 min σε συγκέντρωση 10⁻⁷M.

Ομάδα μελέτης Γ.



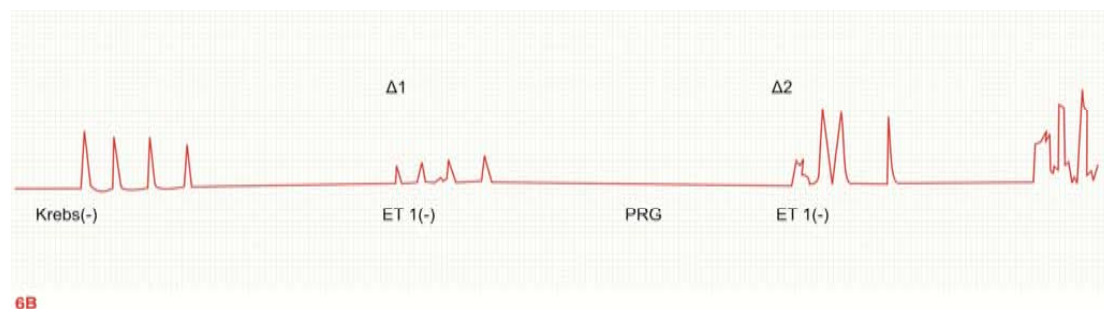
Διάγραμμα 9:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) → *progesterone 10⁻⁶ (-Ca) για 30 min* → *ET 1(-Ca) για 10 min* →
Krebs(-Ca) για 1-2 hours → *ET 1(-Ca) για 10 min* → *Krebs (-Ca)*.

Η πειραματική διαδικασία σε αυτά τα πειράματα ήταν η ίδια με τα πειράματα της ομάδας A, μόνο που το διάλυμα ET 1 που χρησιμοποιούνταν παρασκευαζόταν χωρίς ασβέστιο.

Ομάδα μελέτης Δ.



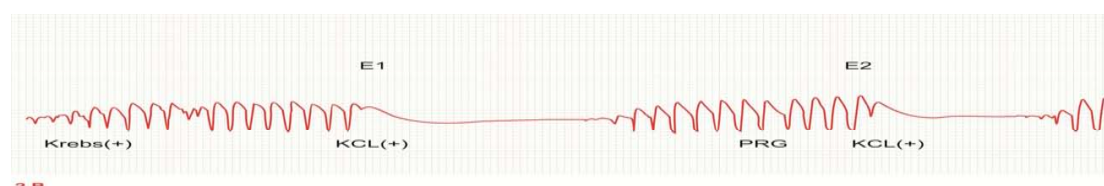
Διάγραμμα 10:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) min → ET 1(-Ca) για 10 min → Krebs(-Ca) για 1-2 hours → progesterone 10^{-6} (-Ca) για 30 min → ET 1(-Ca) για 10 min → Krebs (-Ca).

Η πειραματική διαδικασία ήταν η ίδια με τα πειράματα της ομάδας B, χωρίς τη χρήση ασβεστίου στην παρασκευή του διαλύματος ET 1.

Ομάδα μελέτης E.



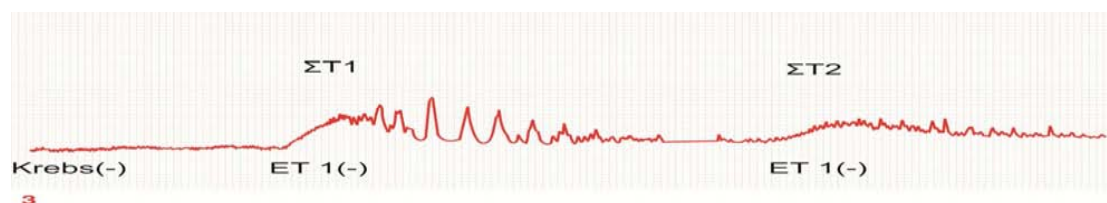
Διάγραμμα 11:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) → ET 1(+Ca) για 10 min → Krebs(-Ca) για 1-2 hours → ET 1(+Ca) για 10 min → Krebs (-Ca).

Η ομάδα πειραμάτων Ε αποτελεί ομάδα ελέγχου για τα πειράματα της ομάδας Α. Η διαφοροποίηση της πειραματικής διαδικασίας είναι στο ότι δεν επιδρούσε διάλυμα προγεστερόνης στον ιστό.

Ομάδα μελέτης ΣΤ.



Διάγραμμα 12:

Η αλληλουχία των διαλυμάτων ήταν ως εξής:

Krebs (-Ca) → ET 1(-Ca) για 10 min → Krebs(-Ca) για 1-2 hours → ET 1(-Ca) για 10 min → Krebs (-Ca).

Τα πειράματα αυτά είναι πειράματα ελέγχου για την ομάδα Γ. Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία χωρίς την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

Μελέτη των αποτελεσμάτων.

Η επίδραση του διεγέρτη προκαλεί μια συστολή των ινών του μυομητρίου, που καταγράφεται στο καταγραφικό μηχάνημα σαν μια καμπύλη με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη και η περιγραφή της αναπτυσσόμενης συσταλτικής δραστηριότητας είναι τα εξής:

Η ένταση της επιφερόμενης συσταλτικότητας.

Με την παράμετρο αυτή εκφράστηκε η τιμή της απόστασης μεταξύ του υψηλότερου σημείου και του αρχικού επιπέδου ηρεμίας της επιφερόμενης συστολής μετά την εφαρμογή του διεγέρτη.

Η διάρκεια της συστολής μετά την προσθήκη του διεγέρτη.

Η επιφερόμενη συστολή μετά την επίδραση του διεγέρτη είχε συγκεκριμένη διάρκεια έως ότου επανέλθει στο αρχικό επίπεδο ηρεμίας.

Το εμβαδό της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη.

Χρησιμοποιήθηκε ειδικό πλανίμετρο για την καταμέτρηση της περιοχής που οριοθετούνταν από την επιφερόμενη καμπύλη με την επίδραση του διεγέρτη. Το κάτω όριο οριοθετούνταν στο επίπεδο του επιπέδου ηρεμίας. Το ανώτερο όριο ήταν το μέγιστο ύψος της επιφερόμενης συστολής. Τα πλάγια όρια της μετρώμενης επιφάνειας καθοριζόταν από την καμπύλη της συστολής και των επιμέρους συστολών που ακολουθούσαν έως ότου επανέλθει η συσταλτικότητα στο επίπεδο ηρεμίας.

Στατιστική ανάλυση.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε από την μονάδα εκπόνησης στατιστικών μελετών του Εργαστηρίου Βιομαθηματικών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σε κάθε ομάδα μελέτης, του κάθε πειραματικού πρωτοκόλλου, οι διαφορές της κάθε παραμέτρου (ένταση, διάρκεια, εμβαδό κάτω από την καμπύλη) πριν και μετά τη δράση της υπό μελέτη ουσίας (προγεστερόνη, ενδοθηλίνη 1) αναλύθηκαν με Wilcoxon δοκιμασία σύγκρισης ζευγαριών.

Στις συγκρίσεις των δύο ομάδων – ομάδα μελέτης και ομάδα ελέγχου- έγινε σύγκριση των διαφορών μεταξύ των πριν και μετά τη δράση των ουσιών που μελετώνταν (προγεστερόνη, ενδοθηλίνη), για κάθε παράμετρο χωριστά (ένταση, διάρκεια, εμβαδό κάτω από την καμπύλη) χρησιμοποιώντας T-test σύγκρισης ζευγαριών.

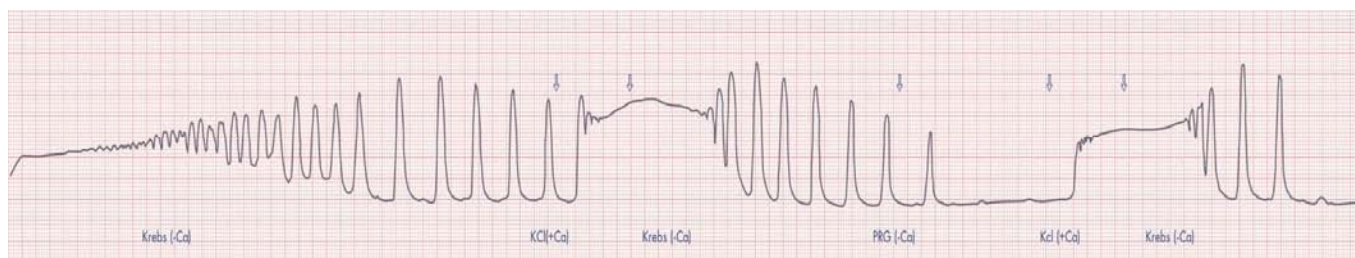
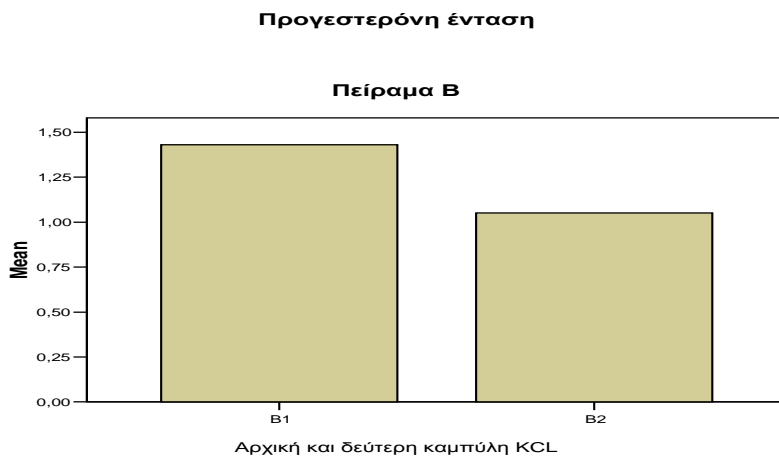
Για τις μεταβλητές που μελετήθηκαν, εκτιμήθηκαν οι μέσες τιμές \pm τυπικό σφάλμα (mean \pm SEM). Ένα αποτέλεσμα κρίνονταν στατιστικά σημαντικό όταν το επίπεδο σημαντικότητας (P value) ήταν μικρότερο του 0.05.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS v.13.0

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

A. Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης .

Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η ένταση της συστολής που προκαλούνταν από τη διέγερση του ιστού με διάλυμα KCL. Σε κάθε πείραμα υπάρχει μία αρχική και μία δεύτερη καμπύλη KCL ανάλογα με την πειραματική διαδικασία. Αρχικά έγιναν οι συγκρίσεις της αρχικής με τη δεύτερη καμπύλη σε κάθε πείραμα και ακολούθησαν οι συγκρίσεις των μεταβολών της έντασης του κάθε πειράματος με αυτές που παρατηρούνταν σε άλλη ομάδα πειραμάτων. Έγιναν επίσης και συγκρίσεις των αρχικών καμπυλών KCL μίας ομάδας πειραμάτων με αντίστοιχες άλλης πειραματικής ομάδας.



Σχήμα 12:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της έντασης στην αρχική και τη δεύτερη καμπύλη KCL στα πειράματα της ομάδας Β.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Β με την αλληλουχία των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η ένταση της προκαλούμενης συστολής της λείας μυϊκής ίνας του μυομητρίου, από το KCL(-Ca), σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,007$)(mean:0,379±0,12g), από την ένταση της συστολής που προκαλείται στο ίδιο περιβάλλον μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

Προγεστερόνη ένταση



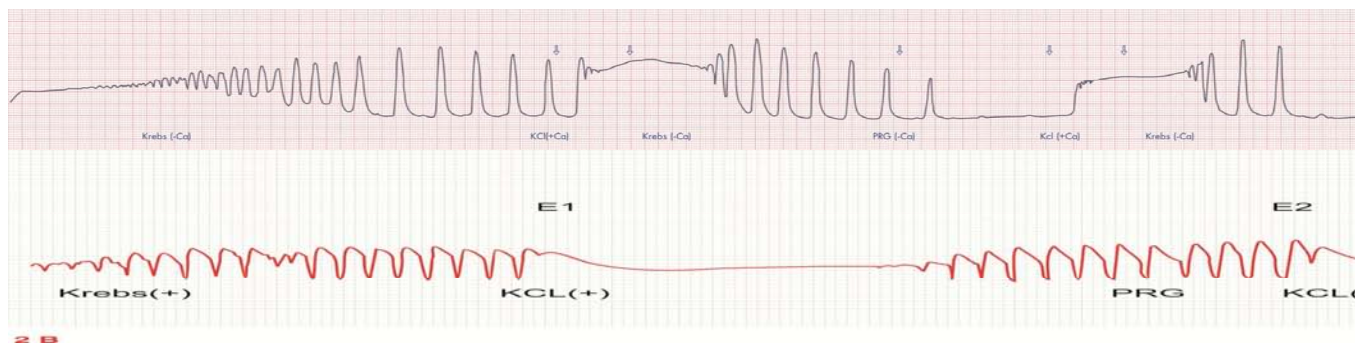
Σχήμα 14:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή των μεταβολών της έντασης (μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλη KCL) στα πειράματα της ομάδας A και στα πειράματα της ομάδας B.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και της ομάδας B με την αλληλουχία των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η μεταβολή της έντασης μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας A, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.001$) (mean: $-0,47 \pm 0,12g$) με την αντίστοιχη μεταβολή στα πειράματα της ομάδας B. Στα πειράματα της ομάδας A δεν υπάρχει ασβέστιο στο περιβάλλον, υπάρχει όμως στο διάλυμα KCL που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του ιστού. Στα πειράματα της ομάδας B δεν υπάρχει ασβέστιο ούτε στο διάλυμα KCL.

Προγεστερόνη ένταση



Σχήμα 15:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή των μεταβολών της έντασης (μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης KCL) στα πειράματα της ομάδας A και στα πειράματα της ομάδας E.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και της ομάδας E με την αλληλουχία των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η μεταβολή της έντασης μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας A, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.008$) (mean: $0,58 \pm 0,12g$), με την αντίστοιχη μεταβολή στα πειράματα της ομάδας E. Στα πειράματα της ομάδας E υπάρχει ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Στα πειράματα της ομάδας αυτής, η δεύτερη καμπύλη KCL έχει μεγαλύτερη ένταση από την αρχική.



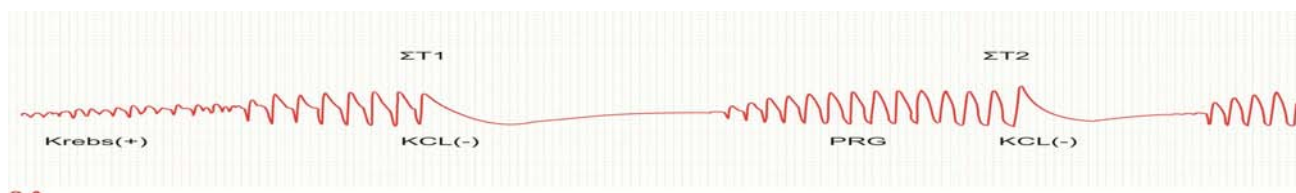
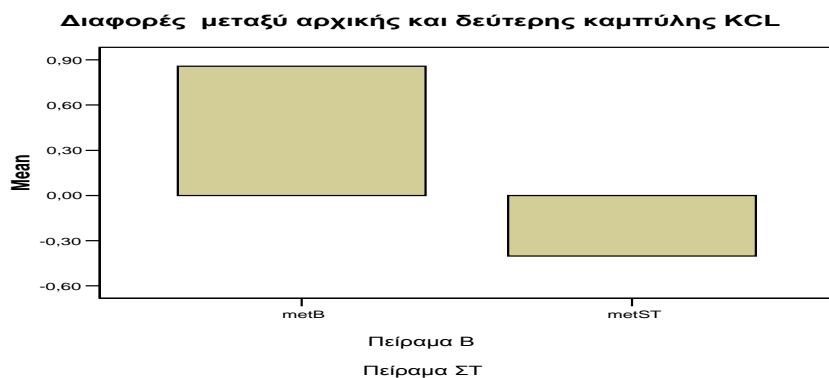
Σχήμα 16:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή των μεταβολών της έντασης (μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλη KCL) στα πειράματα της ομάδας Β και στα πειράματα της ομάδας Δ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Α και της ομάδας Δ .

Μεταβολή της έντασης μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας Β, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.014$) (mean: $0,35 \pm 0,09g$), με την αντίστοιχη μεταβολή στα πειράματα της ομάδας Δ. Και στις δύο ομάδες πειραμάτων δεν υπάρχει ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον, ομάδα Β επιδρά για 30 λεπτά προγεστερόνη

Προγεστερόνη ένταση



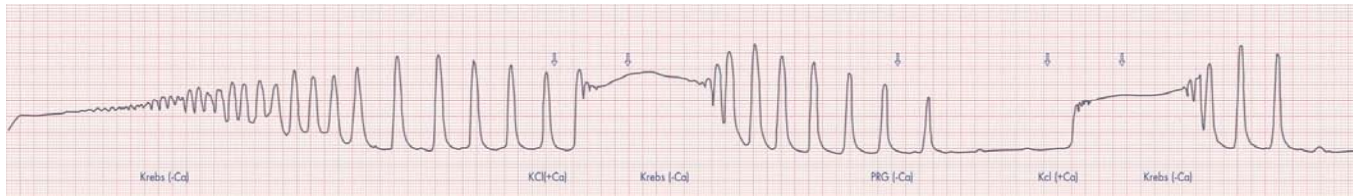
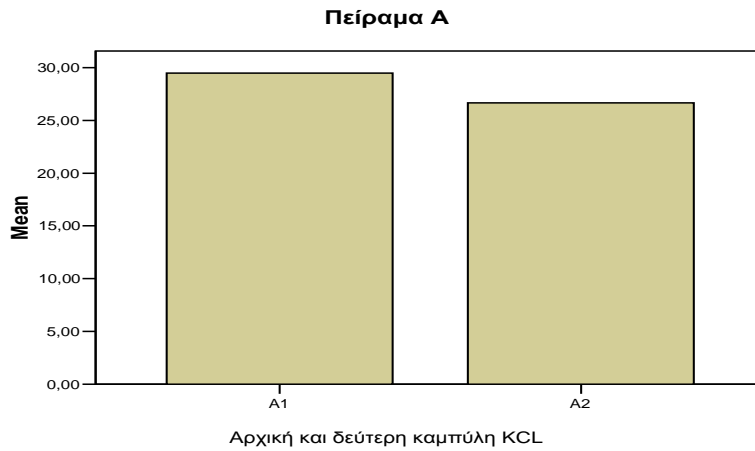
Σχήμα 17:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή των μεταβολών της έντασης (μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλη KCL) στα πειράματα της ομάδας Β και στα πειράματα της ομάδας ΣΤ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Α και της ομάδας ΣΤ .

Η μεταβολή της έντασης μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας Β, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.006$) (mean: $1,26 \pm 0,18g$), με την αντίστοιχη μεταβολή στα πειράματα της ομάδας ΣΤ. Στα πειράματα ΣΤ υπάρχει ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον, και στην κατηγορία αυτών των πειραμάτων η δεύτερη καμπύλη KCL έχει μεγαλύτερη ένταση σε σχέση με την αρχική καμπύλη.

Προγεστερόνη διάρκεια

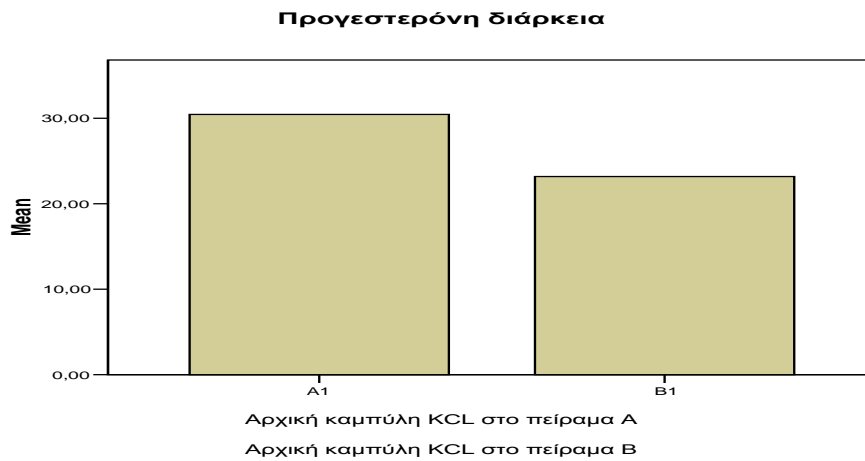


Σχήμα 18:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής και της δευτέρης καμπύλης KCL στα πειράματα της ομάδας A.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A με την αλληλουχία των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η διάρκεια της προκαλούμενης συστολής της λείας μυϊκής ίνας του μυομητρίου, από το KCL(+Ca), σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.02$) (mean: $2,84 \pm 1,11$ min), από την διάρκεια της συστολής που προκαλείται στο ίδιο περιβάλλον μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

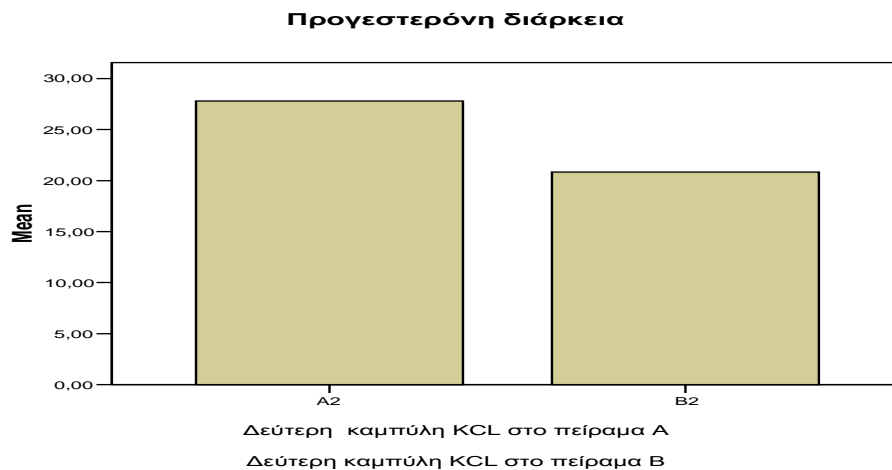


Σχήμα 19:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής καμπύλης KCL στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας B

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και της ομάδας B με την αλληλουχία των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο η διάρκεια της αρχικής καμπύλης συστολής του KCL(+Ca), παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.003$) (mean: $7,24 \pm 2,03$ min), συγκριτικά με τη διάρκεια της καμπύλης που προκαλείται από KCL(-Ca).

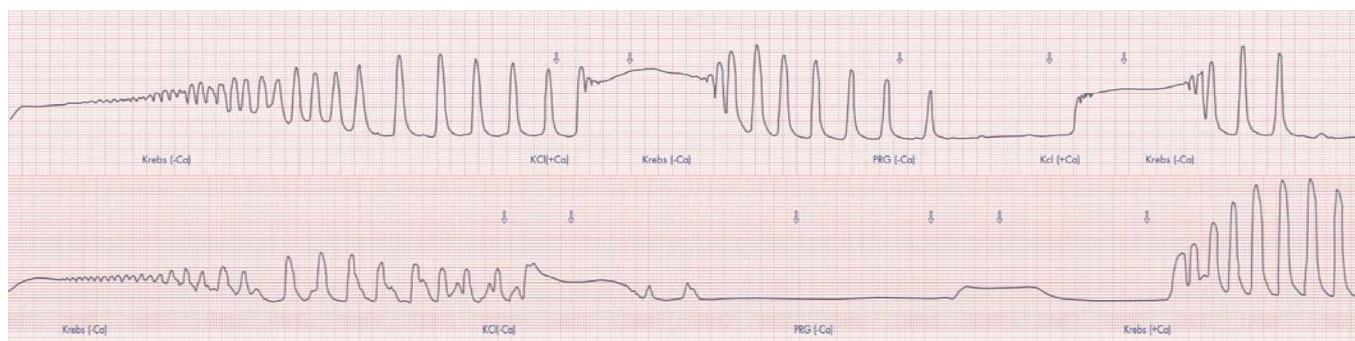


Σχήμα 20:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της δεύτερης καμπύλης KCL στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας B.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και της ομάδας B

Σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο η διάρκεια της δεύτερης καμπύλης συστολής του KCL(+Ca), μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά($p=0.001$) (mean: $9,62 \pm 1,91$), συγκριτικά με τη διάρκεια της δεύτερης καμπύλης που προκαλείται από KCL(-Ca) και πάλι μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

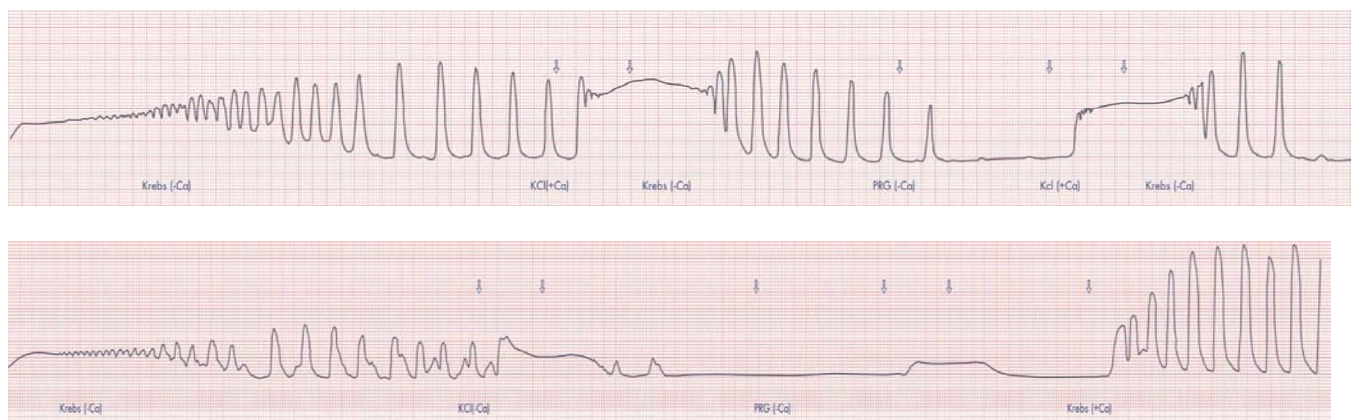
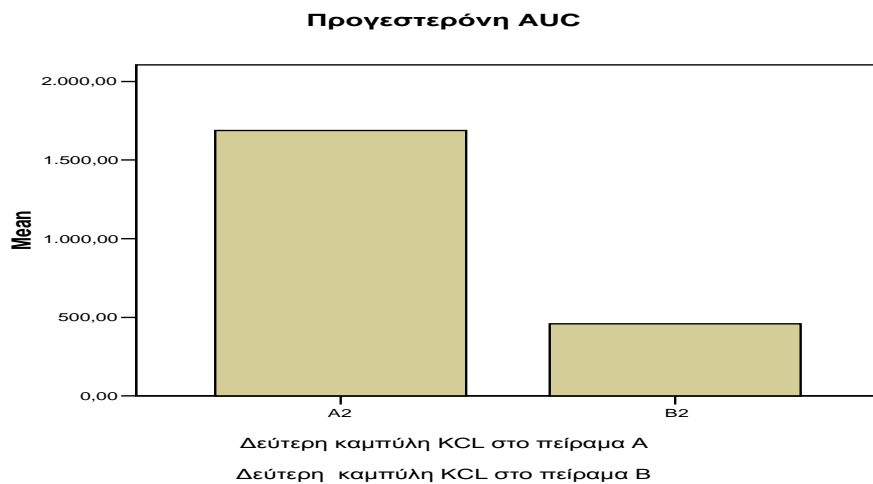


Σχήμα 21:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβადού κάτω από την καμπύλη(AUC) της αρχικής καμπύλης KCL στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας B.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και της ομάδας B

Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC) της προκαλούμενης συστολής της λείας μυικής ίνας του μυομητρίου, από το KCL(+Ca), σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο, παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,002$) (mean:1220,6±159,3 gchmin), από την AUC της συστολής που προκαλείται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο και μετά τη διέγερση του ιστού με KCL(-Ca) .



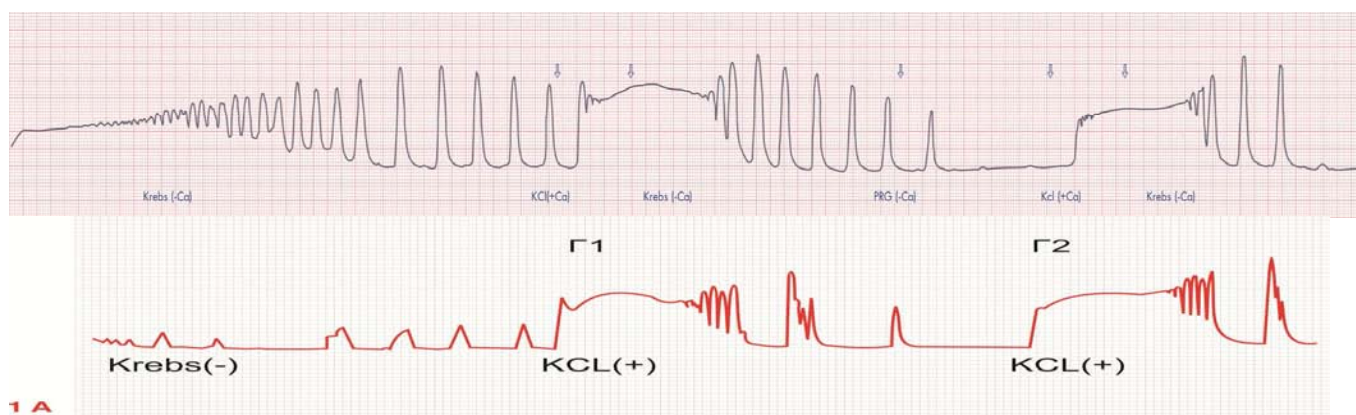
Σχήμα 22:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη(AUC) της δεύτερης καμπύλης KCL στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας B.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και της ομάδας B

Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη που παρατηρείται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο, μετά τη δράση προγεστερόνης στον ιστό, μετά από διέγερσή του με KCL(+Ca), έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,001) (mean:1227,5±147,7 gxmin), από την αντίστοιχη καμπύλη που προκαλείται μετά τη διέγερση του ιστού με KCL(-Ca).

Προγεστερόνη AUC



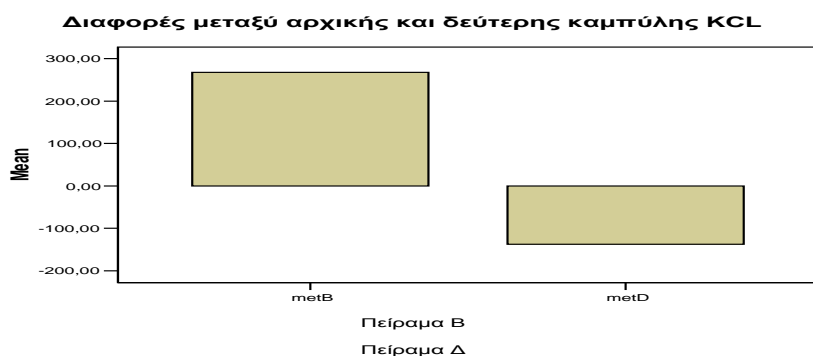
Σχήμα 24:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της μεταβολής του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (AUC) (μεταξύ της αρχικής και δεύτερης καμπύλης KCL) στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας Γ

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και της ομάδας Γ

Η μεταβολή της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (AUC) μεταξύ της πρώτης και της καμπύλης συστολής, στα πειράματα της ομάδας A, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,045$) (mean: $117,3 \pm 98,7$ gxmin), από τη μεταβολή της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη των πειραμάτων της ομάδας Γ. Στα πειράματα της ομάδας Γ δεν επιδρούσε καθόλου προγεστερόνη στον ιστό.

Προγεστερόνη AUC



Σχήμα 25:

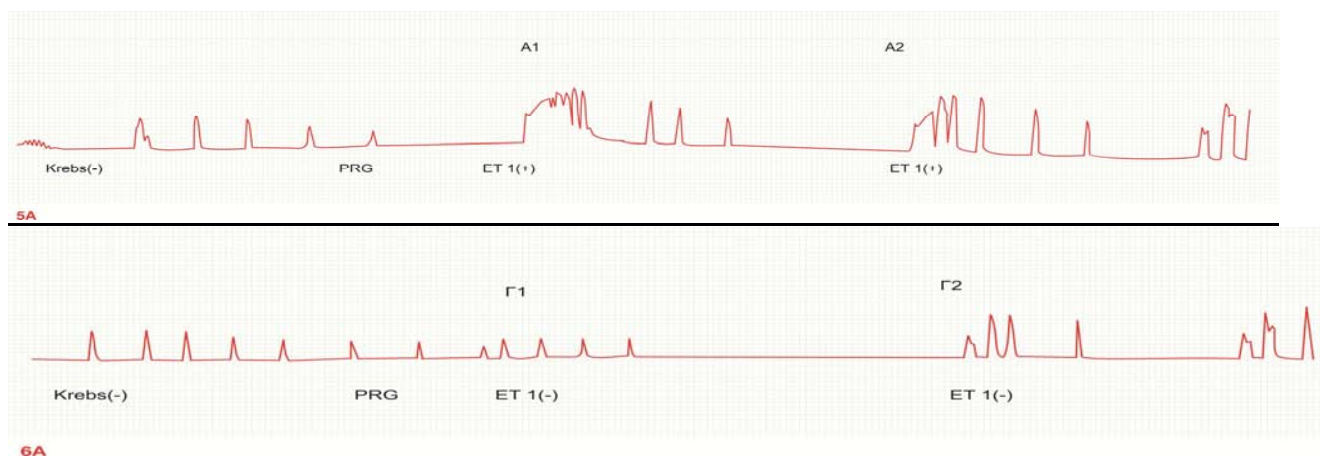
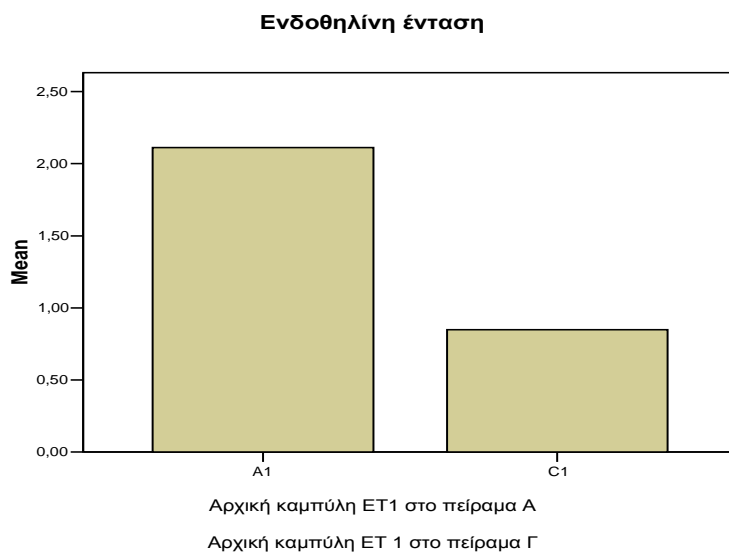
Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της μεταβολής του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (AUC) (μεταξύ της αρχικής και δεύτερης καμπύλης KCL) στα πειράματα της ομάδας Β, και της ομάδας Δ

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Β και της ομάδας Δ

Η μεταβολή της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη (AUC) μεταξύ της πρώτης και της καμπύλης συστολής, στα πειράματα της ομάδας Β, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.008$) (mean: $405.4 \pm 83,8$ gxmin), από τη μεταβολή της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη των πειραμάτων της ομάδας Δ. Και οι δύο τύποι πειραμάτων γίνονται σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο, και μετά από διέγερση του ιστού με KCL(+Ca). Στα πειράματα της ομάδας Δ δεν επιδρούσε καθόλου προγεστερόνη στον ιστό.

B. Πειραματικό πρωτόκολλο μελέτης της συστατικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της ενδοθηλίνης 1 και η μεταβολή αυτής της συμπεριφοράς με την επίδραση προγεστερόνης.

Η πρώτη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η ένταση της συστολής που προκαλούνταν από τη διέγερση του ιστού με διάλυμα ET 1. Σε κάθε πείραμα υπάρχει μία αρχική και μία δεύτερη καμπύλη ET 1 ανάλογα με την πειραματική διαδικασία. Αρχικά έγιναν οι συγκρίσεις της αρχικής με τη δεύτερη καμπύλη σε κάθε πείραμα και ακολούθησαν οι συγκρίσεις των μεταβολών της έντασης του κάθε πειράματος με αυτές που παρατηρούνταν σε άλλη ομάδα πειραμάτων. Έγιναν επίσης και συγκρίσεις των αρχικών καμπυλών ET 1 μίας ομάδας πειραμάτων με αντίστοιχες άλλης πειραματικής ομάδας.



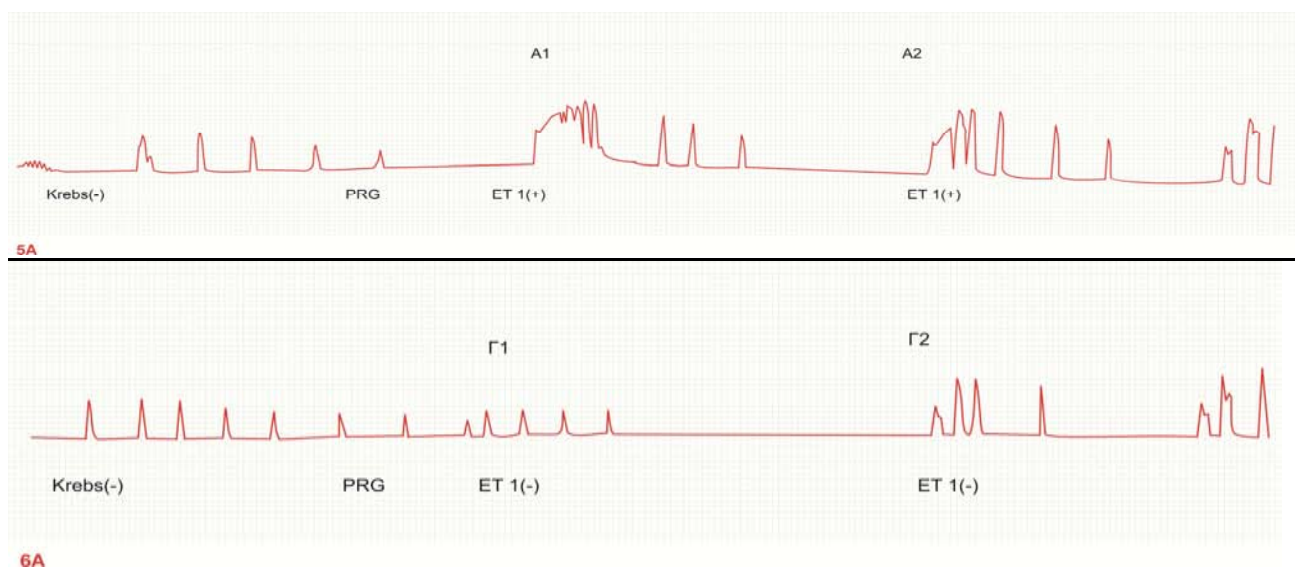
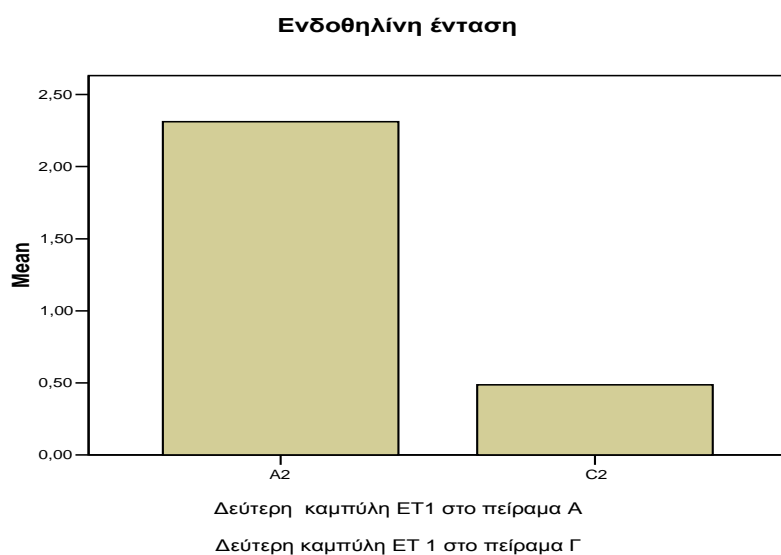
Σχήμα 27:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της έντασης της αρχικής καμπύλης ET 1

στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας Γ

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και Γ..

Η ένταση της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca) μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,037) (mean:1,26±0,41g), από την ένταση της αρχικής καμπύλης ET 1(-Ca) και πάλι μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

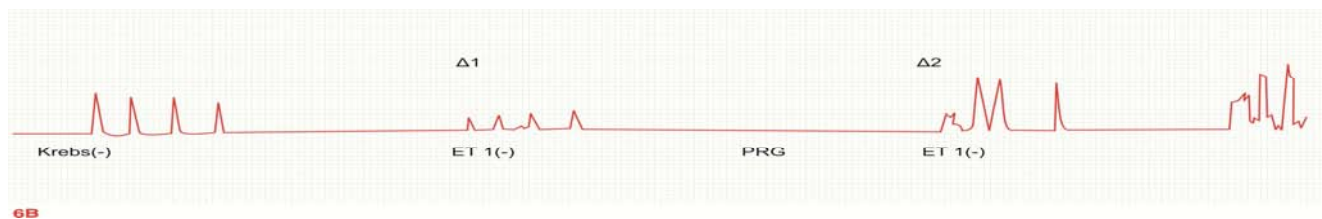
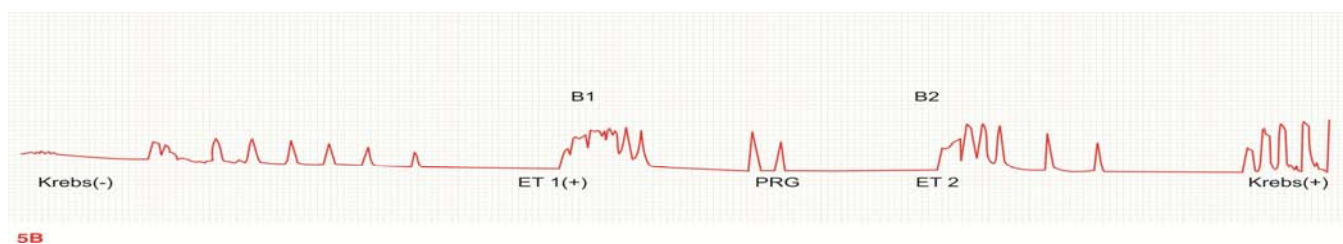
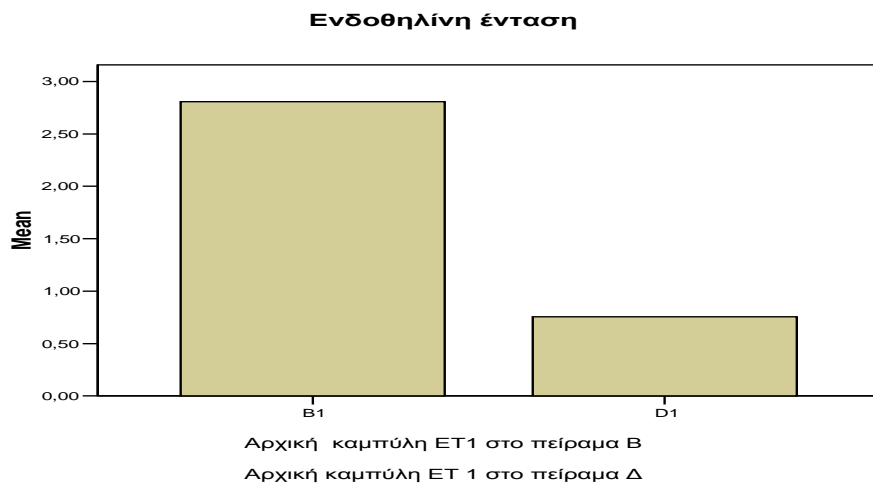


Σχήμα 28:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της έντασης της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας Γ

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και Γ..

Η ένταση της καμπύλης ET 1(+Ca) στα πειράματα της ομάδας A που δεν ακολουθεί άμεσα την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.003) (mean:1,82±0,27g), από την ένταση της αντίστοιχης καμπύλης των πειραμάτων Γ με ET 1(-Ca).

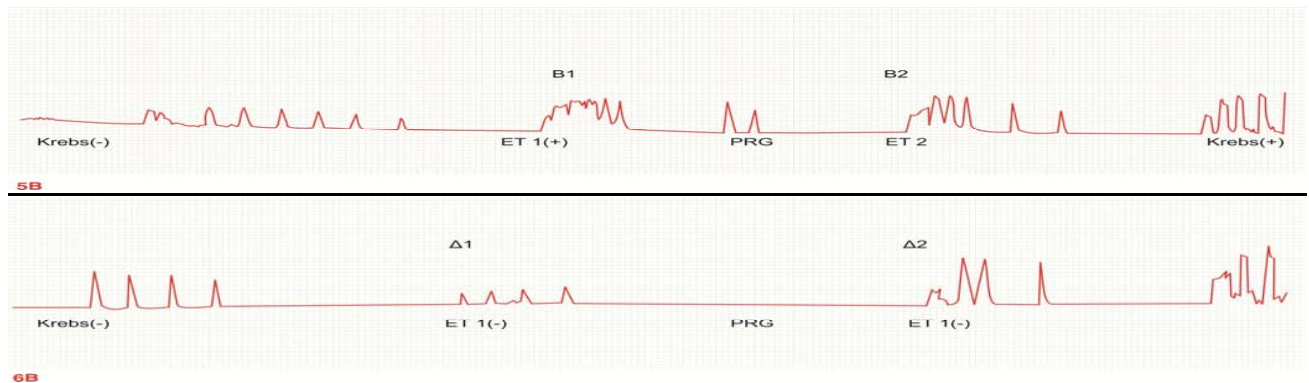


Σχήμα 29:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της έντασης της αρχικής καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας Β, και της ομάδας Δ

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Β και Δ..

Η ένταση της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca), στα πειράματα της ομάδας Β, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.003$) (mean: $2,05 \pm 0,5g$), από την ένταση της αρχικής καμπύλης των πειραμάτων Δ με ET 1(-Ca). Δεν προηγούνταν επίδραση προγεστερόνης στον ιστό και στους δύο τύπους πειραμάτων.



Σχήμα 30:

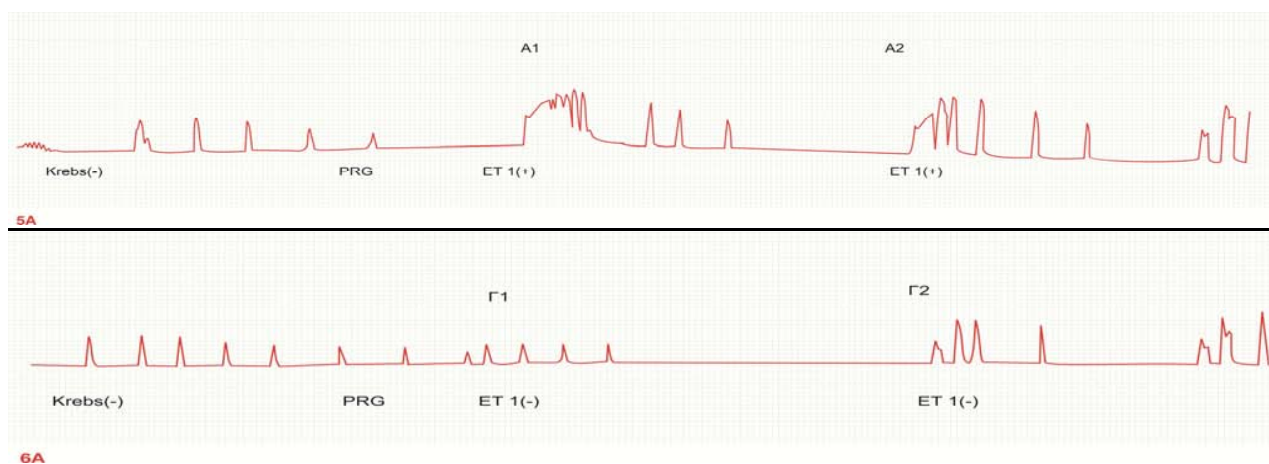
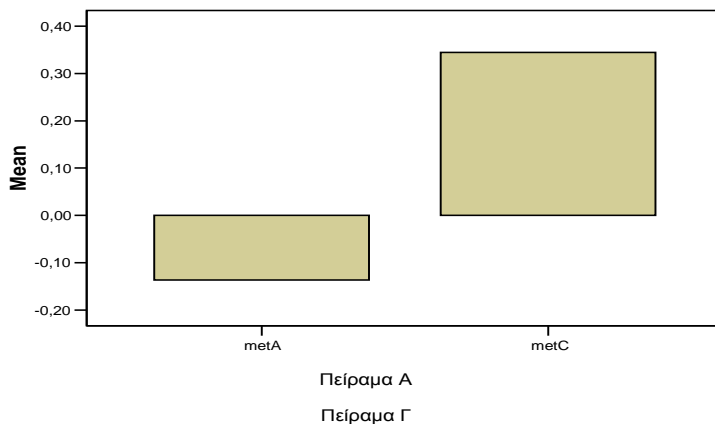
Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της έντασης της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας B, και της ομάδας Δ

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας B και Δ.

Η ένταση της δεύτερης καμπύλης ET 1(+Ca), στα πειράματα της ομάδας B, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.006$) (mean: $2,36 \pm 0,46g$), από την ένταση της δεύτερης καμπύλης των πειραμάτων Δ με ET 1(-Ca). Και στους δύο τύπους πειραμάτων προηγούνταν επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.\

Ενδοθηλίνη ένταση

Διαφορές μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1



Σχήμα 31:

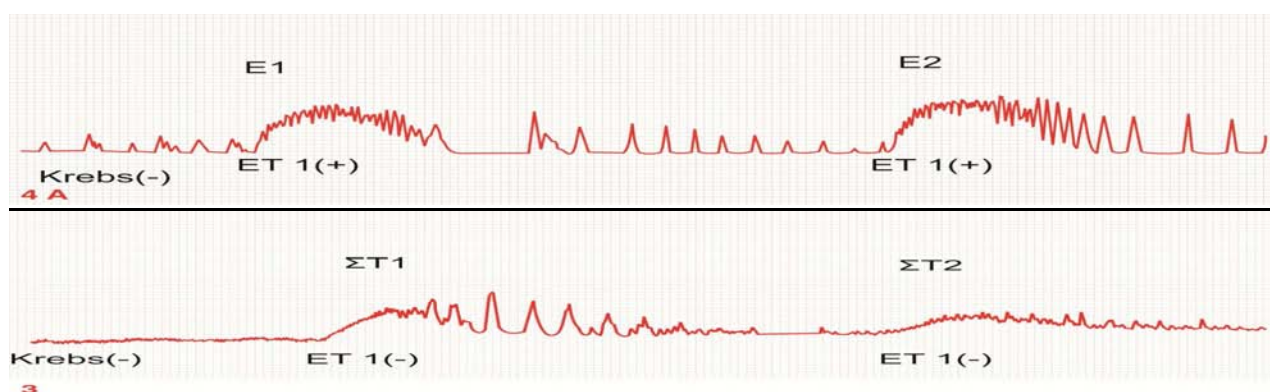
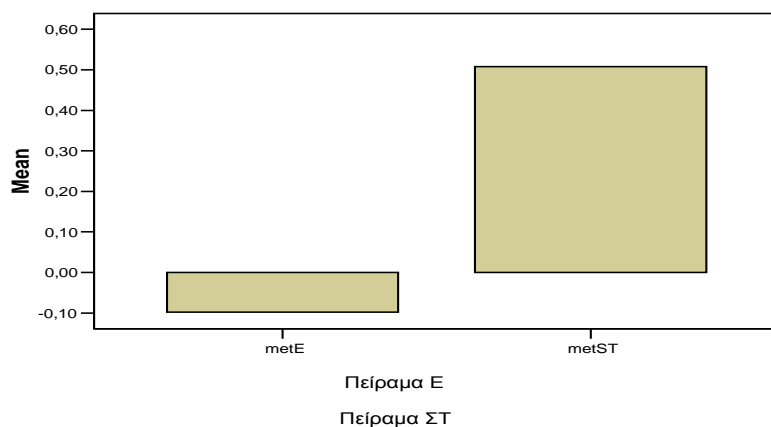
Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της μεταβολής της έντασης (μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1) στα πειράματα της ομάδας A, και της ομάδας Γ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και Γ.

Η μεταβολή της έντασης της αρχικής με τη δεύτερη καμπύλη ET 1(+Ca), των πειραμάτων της ομάδας A, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p= 0.041$) (mean:-0,48±0,17g), με την αντίστοιχη μεταβολή της έντασης των πειραμάτων της ομάδας Γ, όπου γίνεται διέγερση του ιστού με ET 1(-Ca).

Ενδοθηλίνη ένταση

Διαφορές μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1



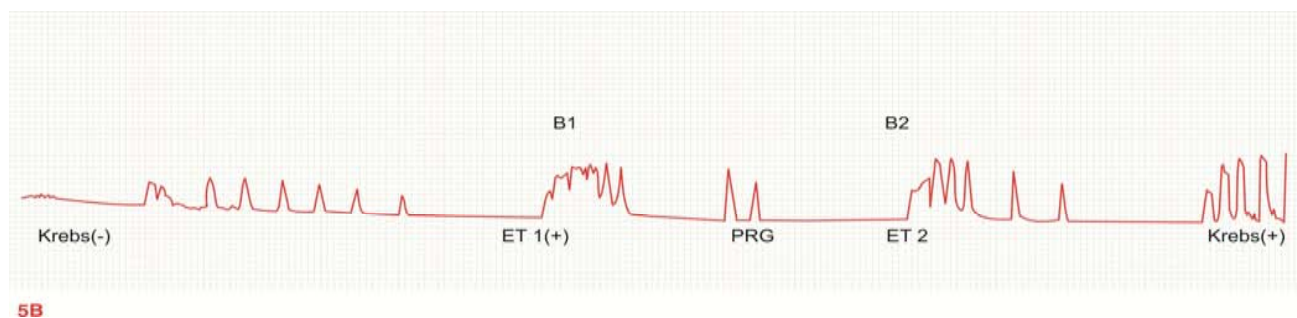
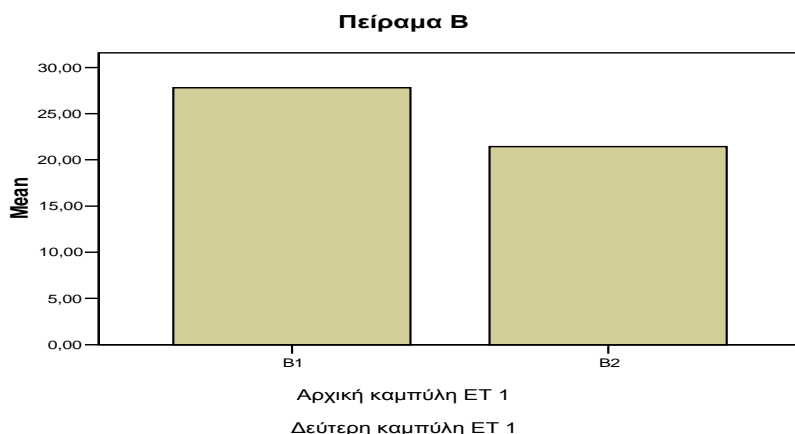
Σχήμα 32:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της μεταβολής της έντασης (μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1) στα πειράματα της ομάδας E, και της ομάδας ΣΤ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας E και ΣΤ.

Η μεταβολή της έντασης των καμπυλών ET 1(+Ca), της ομάδας E, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.038$) (mean: $-0,6 \pm 0,01$ g), συγκριτικά με την μεταβολή της έντασης των καμπυλών ET 1(-Ca), των πειραμάτων της ομάδας ΣΤ.

Ενδοθηλίνη διάρκεια



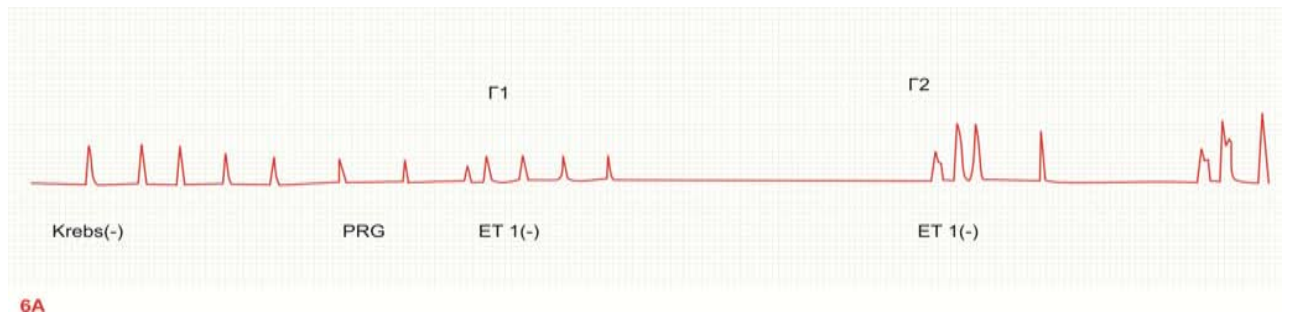
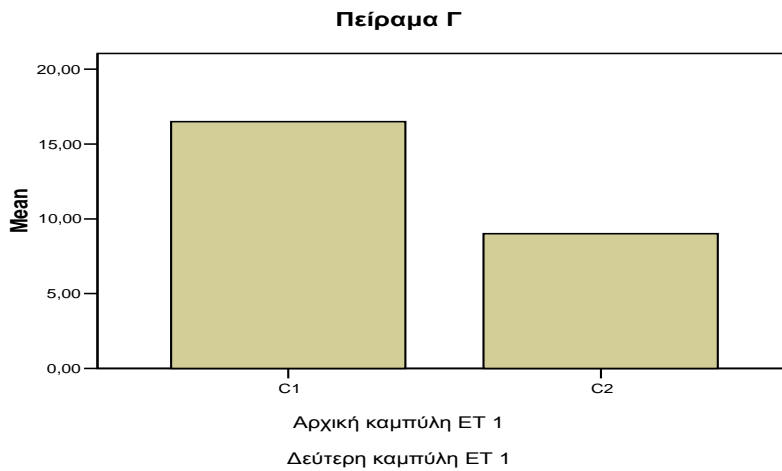
Σχήμα 33:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας Β

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Β

Τα πειράματα της ομάδας Β πραγματοποιούνταν σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο. Η πρώτη καμπύλη ET 1(+Ca) γινόταν χωρίς την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, ενώ η δεύτερα μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό για 30 λεπτά. Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.001$) (mean: $6,37 \pm 1,3$ min), στην διάρκεια συστολής μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1(+Ca).

Ενδοθηλίνη διάρκεια



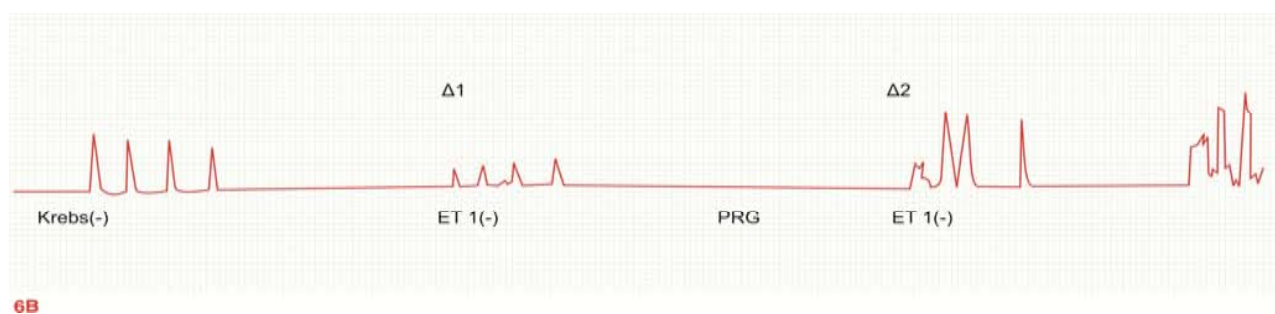
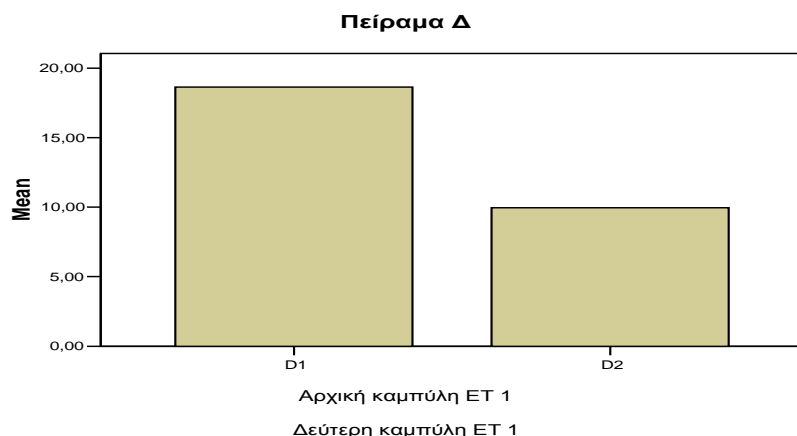
Σχήμα 34:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας Γ.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Γ.

Η αρχική καμπύλη ET 1(-Ca), στα πειράματα της ομάδας Γ, ακολουθούσε την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,003$) (mean: $7,5 \pm 1,5$ min), όσον αφορά τη διάρκεια συστολής, από την δεύτερη καμπύλη ET 1(-Ca), που προκαλούνταν χωρίς την άμεση έκθεση του ιστού στην προγεστερόνη.

Ενδοθηλίνη διάρκεια



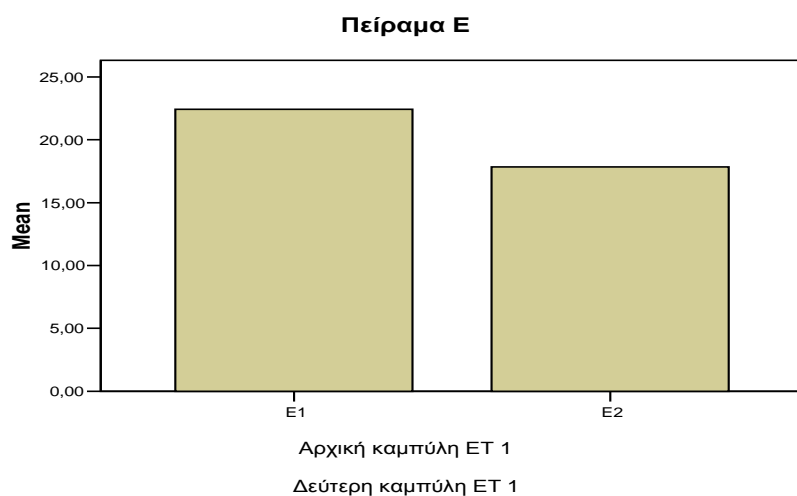
Σχήμα 35:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας Δ.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Δ.

Στα πειράματα της ομάδας Δ, η αρχική καμπύλη ET 1(-Ca), πραγματοποιούνταν πριν επιδράσει προγεστερόνη στον ιστό. Η διάρκεια της καμπύλης συστολής της πρώτης καμπύλης, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.005) (mean:8,68±2,3min), από τη διάρκεια συστολής της δεύτερης καμπύλης ET 1(-Ca), που ακολουθούσε την έκθεση του ιστού σε προγεστερόνη.

Ενδοθηλίνη διάρκεια

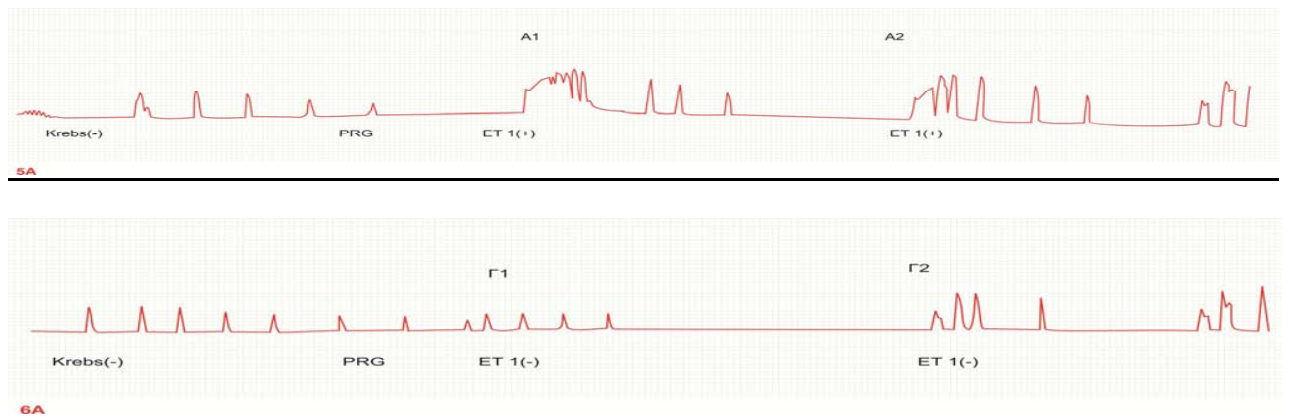


Σχήμα 36:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας E.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας E.

Στα πειράματα της ομάδας E, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.05$) (mean: $4,58 \pm 0,8$ min), μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1(+Ca), όσον αφορά τη διάρκεια της συστολής.



Σχήμα 37:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας Α και της ομάδας Γ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Α και Γ.

Η αρχική καμπύλη ET 1(+Ca), στα πειράματα της ομάδας Α, ακολουθούσε την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό. Η διάρκεια της καμπύλης αυτής, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.05$) (mean: $10,66 \pm 3,23$ min), από την αρχική καμπύλη ET 1(-Ca) στα πειράματα της ομάδας Γ, που γίνεται και πάλι μετά από επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.



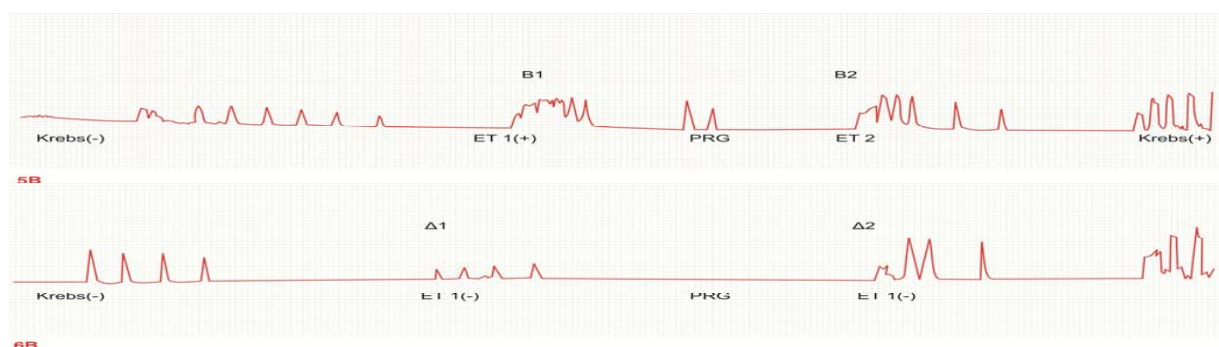
Σχήμα 38:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας A και της ομάδας Γ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και Γ.

Η δεύτερη καμπύλη ET 1(+Ca), στα πειράματα της ομάδας A, δεν ακολουθούσε την άμεση επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

Η διάρκεια της καμπύλης αυτής, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.04) (mean: 13,66±2,7min), από την δεύτερη καμπύλη ET 1(-Ca) στα πειράματα της ομάδας Γ, που γίνεται και πάλι χωρίς την άμεση επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

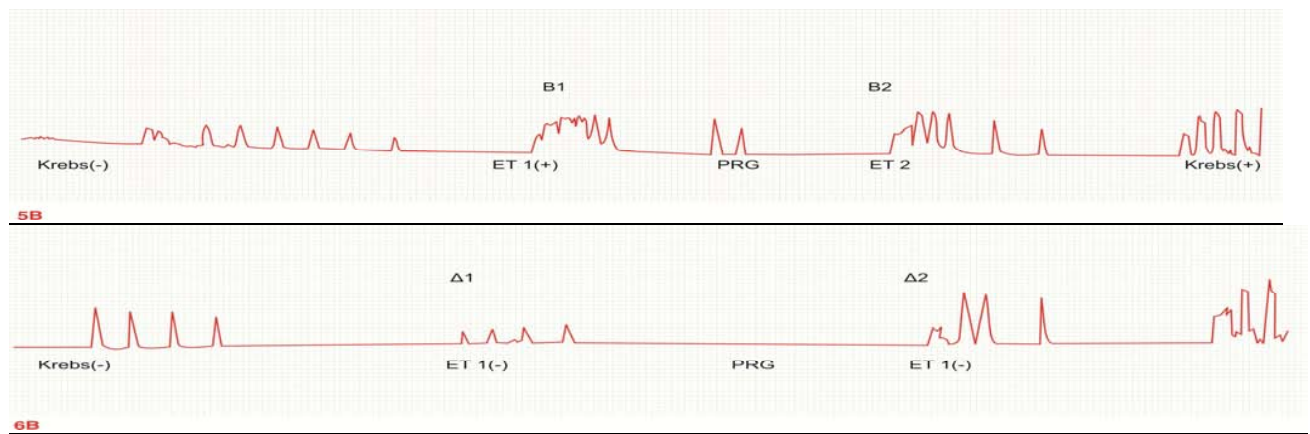
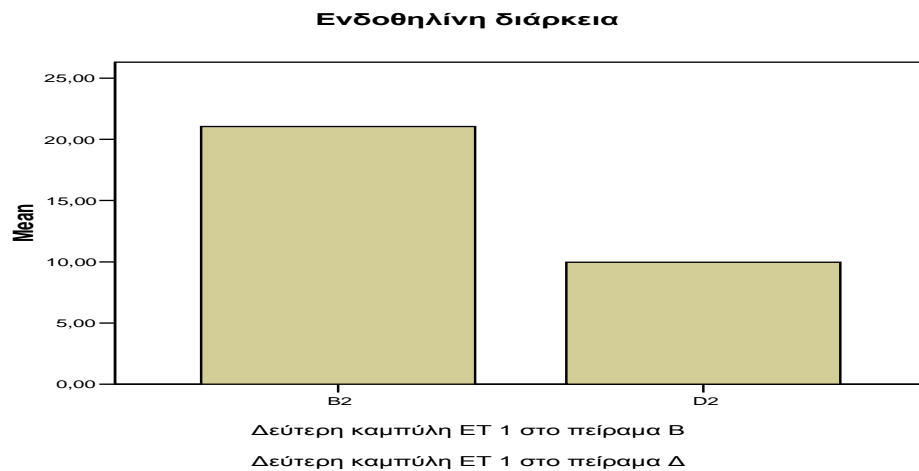


Σχήμα 39:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της αρχικής καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας Β και της αρχικής καμπύλης της ομάδας Δ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Β και Δ.

Η διάρκεια της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca), στα πειράματα της ομάδας Β, χωρίς την άμεση επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.001$) (mean: $9,13 \pm 2,02$ min), από τη διάρκεια της αρχικής καμπύλης ET 1(-Ca), στα πειράματα της ομάδας Δ, και πάλι χωρίς την άμεση επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

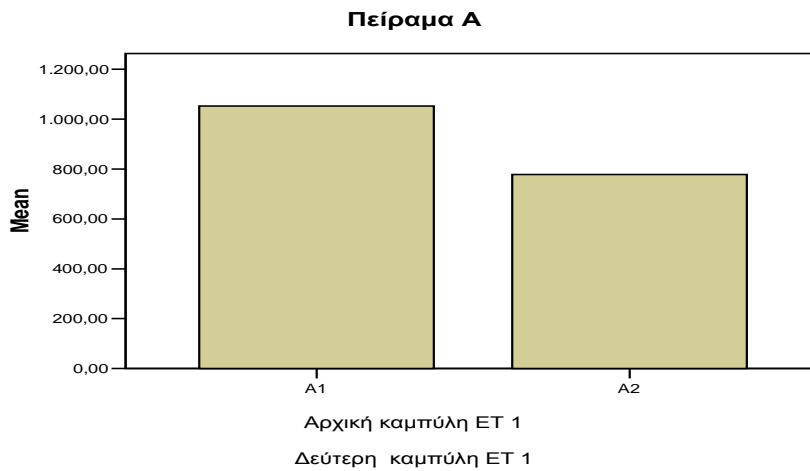


Σχήμα 40:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της διάρκειας της δεύτερης καμπύλης ET 1 στα πειράματα της ομάδας B και της δεύτερης καμπύλης της ομάδας Δ.
 Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας B και Δ.

Η διάρκεια της δεύτερης καμπύλης ET 1(+Ca), στα πειράματα της ομάδας B, μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.003$) (mean: $11,09 \pm 2,8$ min), από τη διάρκεια της καμπύλης ET 1(-Ca), στα πειράματα της ομάδας Δ, μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

Ενδοθηλίνη AUC



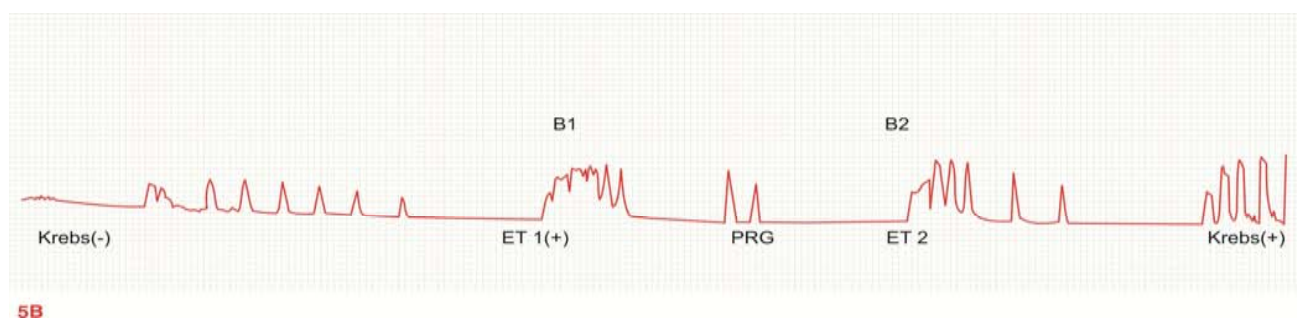
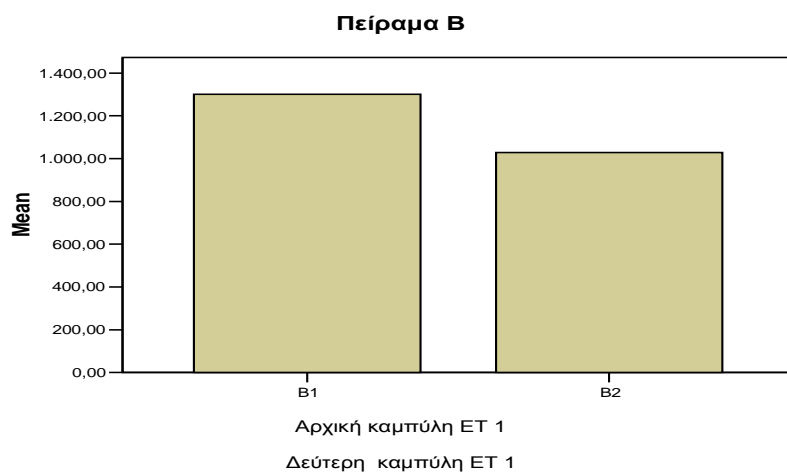
Σχήμα 41:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET1 στα πειράματα της ομάδας A.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A.

Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca), μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.005$) (mean:275,62±69 gxmin), από το AUC της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας A, χωρίς την άμεση επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

Ενδοθηλίνη AUC



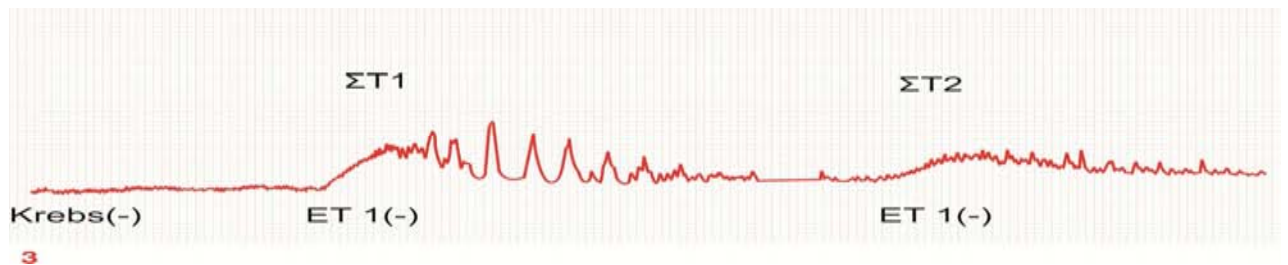
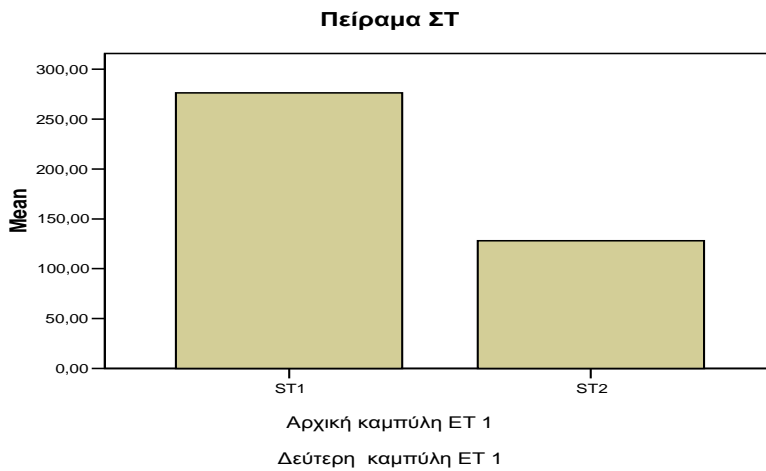
Σχήμα 42:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET1 στα πειράματα της ομάδας B.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας B.

Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca), χωρίς την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.015$) (mean; $272,5 \pm 62$ gxmin), από το AUC της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας B, μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

Ενδοθηλίνη AUC

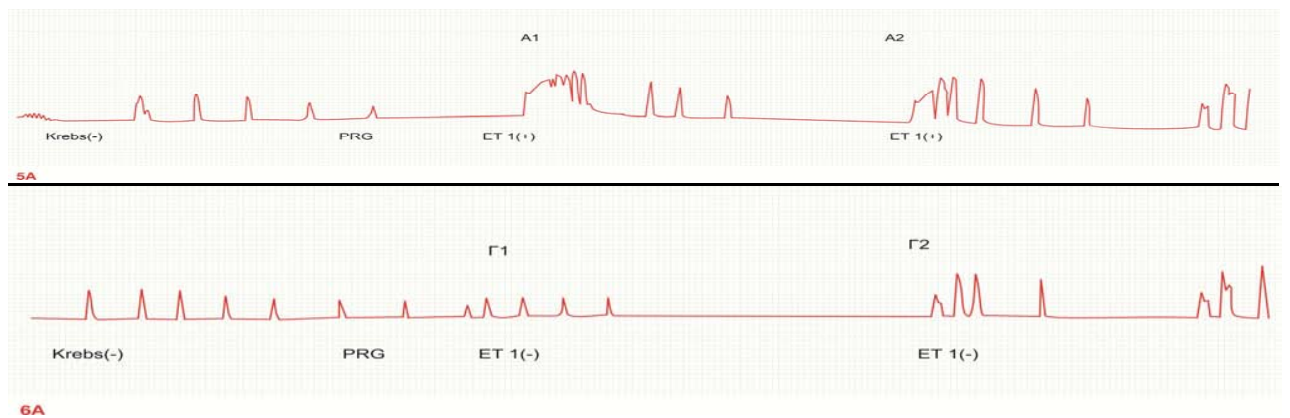
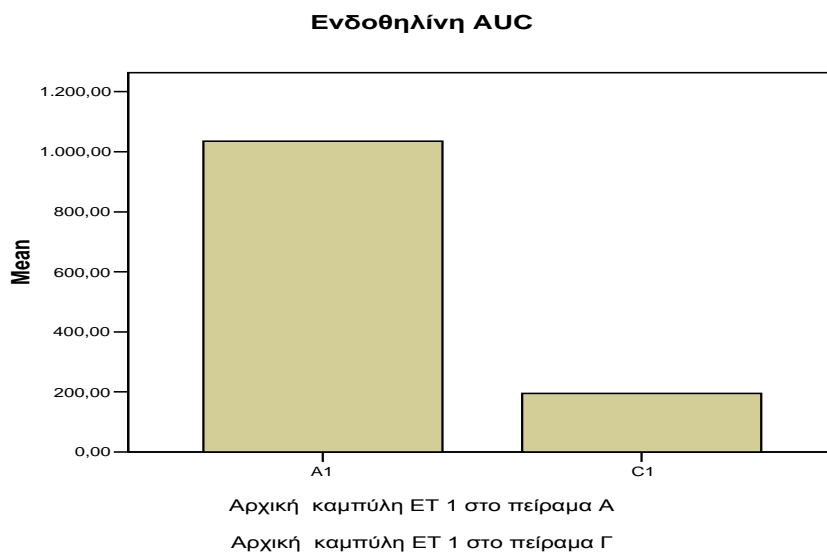


Σχήμα 44:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET1 στα πειράματα της ομάδας ΣΤ.

Διάγραμμα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας ΣΤ.

Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca), έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.014) (mean:148±35 gchmin) , από το AUC της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας ΣΤ.

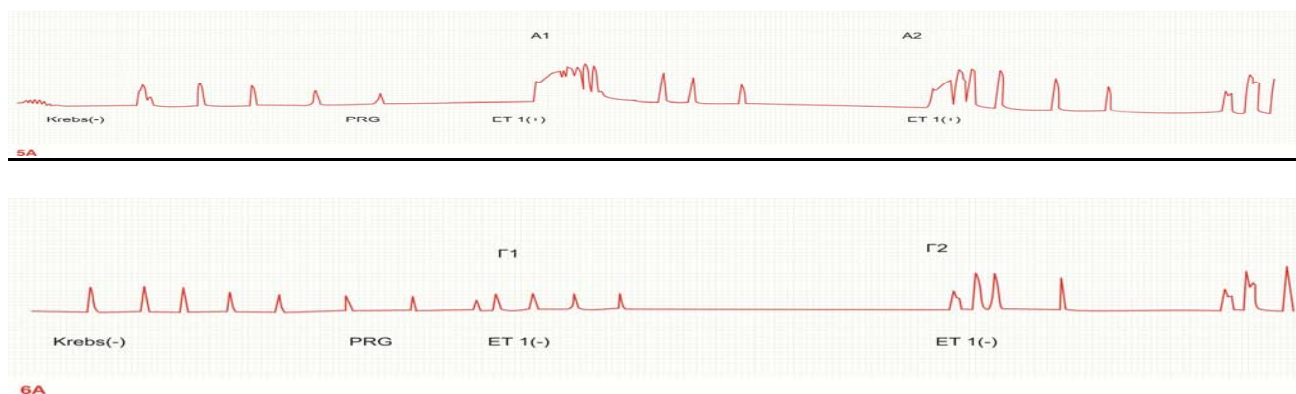
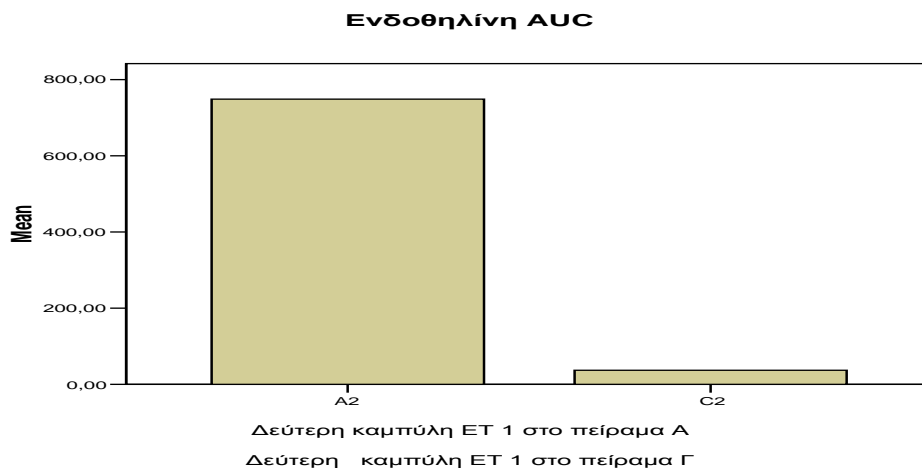


Σχήμα 45:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη της αρχικής καμπύλης ET1 στα πειράματα της ομάδας A και της ομάδας Γ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και Γ.

Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca), μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, στα πειράματα της ομάδας A, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.001$) (mean: 840 ± 114 gch_{min}), από το AUC της αρχικής καμπύλης ET 1(-Ca), στα πειράματα της ομάδας Γ, μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

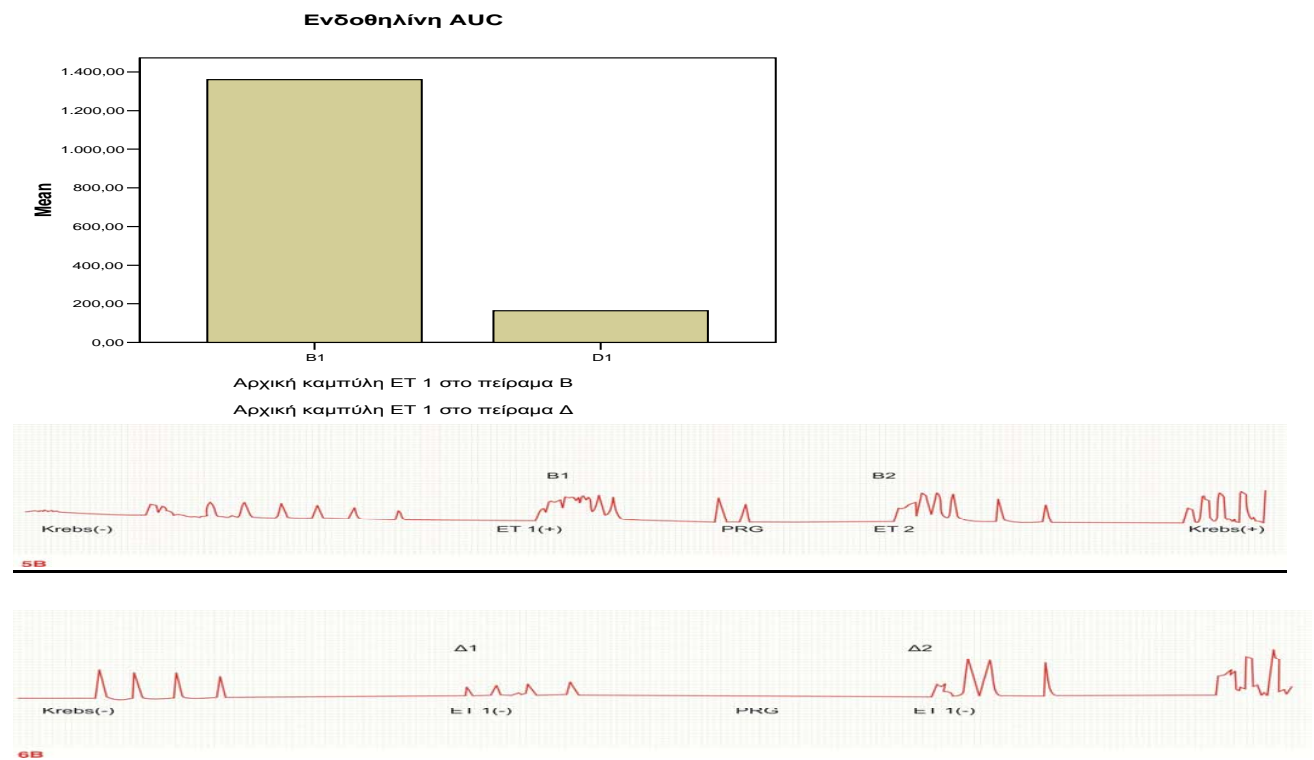


Σχήμα 46:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη της δεύτερης καμπύλης ET1 στα πειράματα της ομάδας A και της ομάδας Γ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας A και Γ.

Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), της δεύτερης καμπύλης ET 1(+Ca), χωρίς την άμεση επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, στα πειράματα της ομάδας A, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.001$) (mean: 710 ± 106 gxmin), από το AUC της δεύτερης καμπύλης ET 1(-Ca), στα πειράματα της ομάδας Γ, χωρίς την άμεση επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

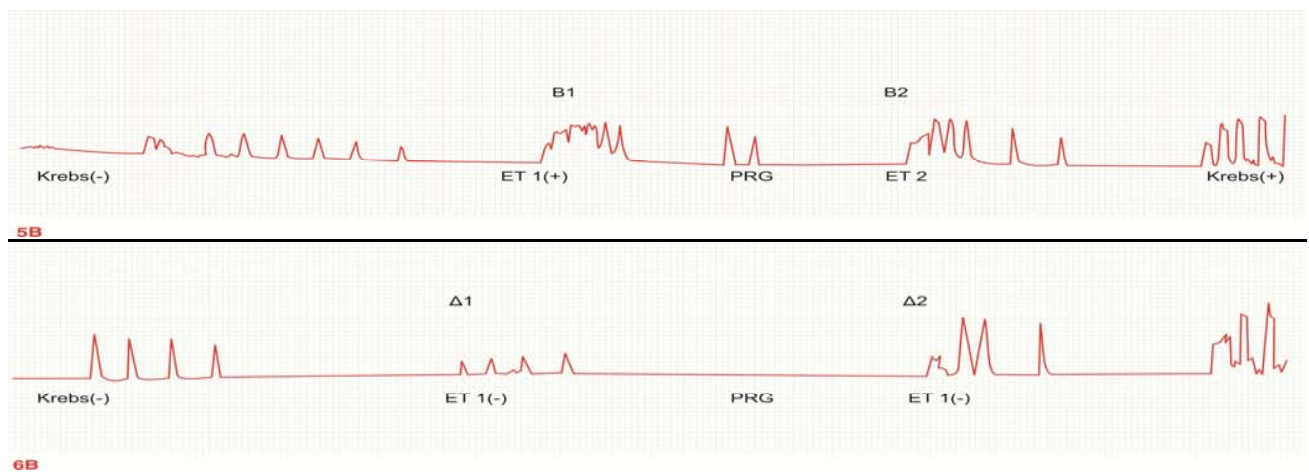
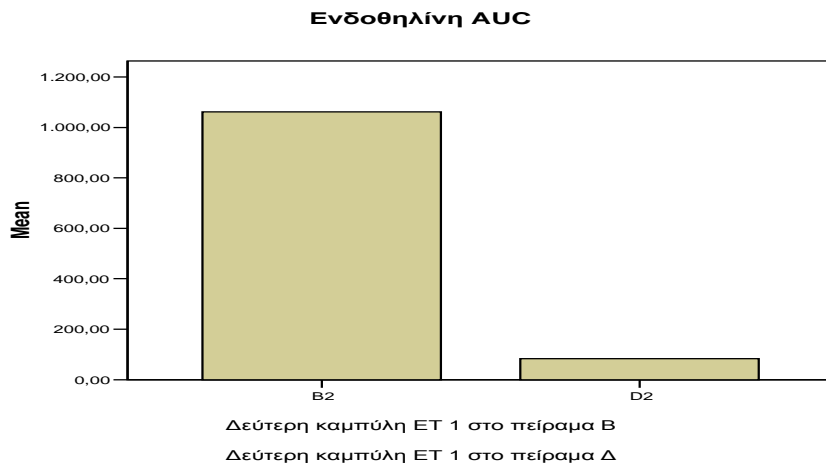


Σχήμα 47:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη της αρχικής καμπύλης ET1 στα πειράματα της ομάδας Β και αρχικής καμπύλης της ομάδας Δ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Β και Δ.

Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), της αρχικής καμπύλης ET 1(+Ca), χωρίς την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, στα πειράματα της ομάδας Β, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.001) (mean:1196±243 gch_{min}), από το AUC της αρχικής καμπύλης ET 1(-Ca), στα πειράματα της ομάδας Δ, χωρίς την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.



Σχήμα 48:

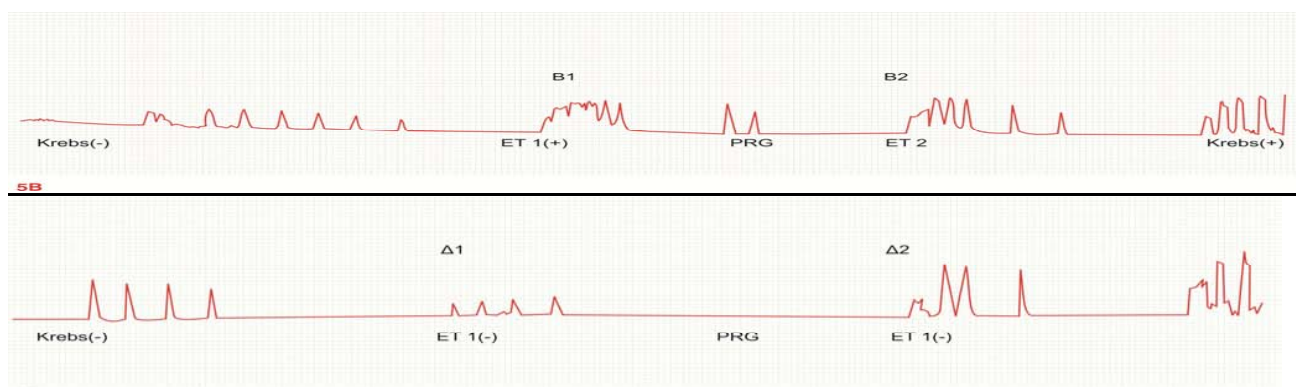
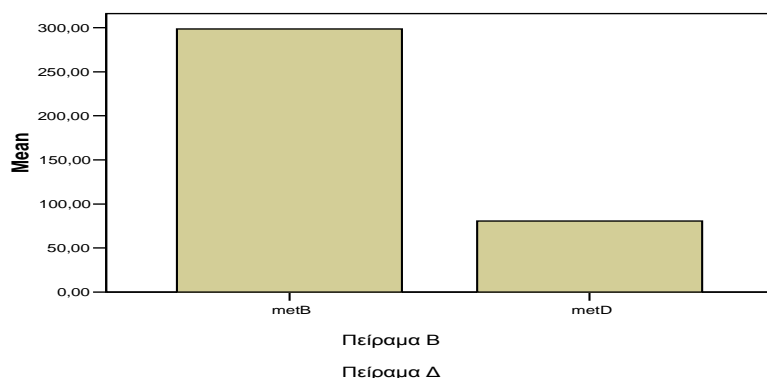
Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη της δεύτερης καμπύλης ET1 στα πειράματα της ομάδας Β και της δεύτερης καμπύλης της ομάδας Δ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας Β και Δ.

Το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), της δεύτερης καμπύλης ET 1(+Ca), μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό, στα πειράματα της ομάδας Β, έχει στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0.001) (mean:978±183 gxmin) , από το AUC της δεύτερης καμπύλης ET 1(-Ca), στα πειράματα της ομάδας Δ, μετά την επίδραση προγεστερόνης στον ιστό.

Ενδοθηλίνη AUC

Διαφορές μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1



6B

Σχήμα 49:

Το γράφημα απεικονίζει τη μέση τιμή της μεταβολής του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (μεταξύ της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET1) στα πειράματα της ομάδας B και της ομάδας Δ.

Διαγράμματα: Ενδεικτικό πείραμα της ομάδας B και Δ.

Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0.037$) (mean: 218 ± 89 gch_{min}), ανάμεσα στη μεταβολή του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (AUC) της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης ET 1(+Ca), των πειραμάτων της ομάδας B και της αντίστοιχης μεταβολής στα πειράματα της ομάδας Δ, όπου γίνεται διέγερση του ιστού με ET 1(-Ca).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστή η κατασταλτική δράση της προγεστερόνης στο ανθρώπινο μυομήτριο. Έχει δειχθεί επίσης από προηγούμενες μελέτες, η συμμετοχή της προγεστερόνης στην ομοιοστασία του ασβεστίου. Ο ακριβής όμως βιοχημικός μηχανισμός δεν έχει διερευνηθεί πλήρως.

Το πρώτο μέρος αυτής της μελέτης, διερευνά τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης, σε περιβάλλον με ή χωρίς ασβέστιο. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν μείωση της έντασης, διάρκειας και εμβαδού κάτω από την καμπύλη της προκαλούμενης συσταλής από το διάλυμα KCL (80mM) στον ιστό, μετά την δράση της προγεστερόνης στον ιστό για 30 λεπτά.

Στην αρχή κάθε πειράματος εφαρμόστηκε τάση 1 g στο ιστοτεμάχιο της μήτρας. Το διάλυμα Kreb's που χρησιμοποιούνταν ήταν χωρίς Ca^{++} . Αρχικά η μήτρα παρουσίασε αυτόματη συσταλτικότητα, αλλά μετά την πάροδο μίας ώρας, η συσταλτικότητα αυτή άρχισε να φθίνει σε συχνότητα, ένταση και διάρκεια. Με την επίδραση διαλύματος KCL (80mM) στον ιστό, με ή χωρίς ασβέστιο στην παρασκευή του, παρατηρούνταν μια έντονη συστολή της μήτρας. Τα χαρακτηριστικά αυτής της συστολής είναι μια απότομη και άμεση αύξηση του τόνου της συστολής και ακολουθεί μια πιο βραδεία φάση χάλασης και επαναφοράς του βασικού τόνου στο αρχικό επίπεδο ηρεμίας. Ακολουθούσε μια περίοδος όπου η μήτρα αποκτούσε και πάλι την αυτόματη συσταλτικότητα της. Έπειτα και ανάλογα με τον τύπο των πειραμάτων εφαρμοζόταν προγεστερόνη στον ιστό για 30 λεπτά. Για την παρασκευή προγεστερόνης χρησιμοποιούνταν διάλυμα Kreb's χωρίς ασβέστιο. Ακολουθούσε άλλη μία διέγερση του ιστού με διάλυμα KCL με ή χωρίς ασβέστιο ανάλογα με τον τύπο του πειράματος και ακολουθούσε και πάλι μια

περίοδος όπου η μήτρα αποκτούσε την αυτόματη συσταλτικότητα της. Στο τέλος των πειραμάτων όπου χρησιμοποιούνταν διάλυμα Krebs's χωρίς ασβέστιο, ελεγχόταν η ζωτικότητα του ιστού με διάλυμα Krebs's με ασβέστιο. Παρατηρούνταν τότε σε όλους τους τύπους των πειραμάτων μια άμεση αύξηση της έντασης και της συχνότητας των παρατηρούμενων συστολών, ακόμη και σε αυτά τα πειράματα όπου είχε ανασταλεί τελείως η αυτόματη συσταλτικότητα λόγω πλήρους έλλειψης ασβεστίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον.

Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει για άλλη μια φορά ότι το ασβέστιο του εξωκυτταρίου περιβάλλοντος, είναι απαραίτητο για την αυτόματη συσταλτικότητα του μυομητίου και η έλλειψή του προκαλεί ως και πλήρη αναστολή της αυτόματης συσταλτικότητας. Η μείωση της έντασης και τις συχνότητας συστολών δεν είναι άμεση, όταν δεν υπάρχει ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Παρατηρείται μια φθίνουσα πορεία που οδηγεί τελικά σε πλήρη αναστολή. Στα πειράματα λοιπόν της ομάδας Α, Β, Γ και Δ μετά την εφαρμογή της αρχικής τάσης στον ιστό 1 g, αναπτύσσονταν αυτόματη συσταλτικότητα η οποία όμως μετά την πάροδο μιας ώρας παρουσίαζε σημαντική μείωση στην ένταση και τη συχνότητα των συστολών. Σε κάποιες μάλιστα περιπτώσεις έφθιναν μεν αλλά όχι μέχρι την πλήρη καταστολή.

Όταν υπάρχει πλήρης έλλειψη ασβεστίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον (KCL και διάλυμα Krebs's χωρίς ασβέστιο), η προγεστερόνη προκαλεί μεγαλύτερη μείωση στην ένταση της συστολής. Η παρουσία ασβεστίου στο διάλυμα KCL (80mM), δεν ευνοεί τόσο μεγάλη μείωση της έντασης συστολής μετά την επίδραση προγεστερόνης. Έτσι λοιπόν η μεταβολή της έντασης

συστολής στα πειράματα της ομάδας Β, όπου δεν υπάρχει καθόλου ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον, είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη μεταβολή που παρατηρούμε στα πειράματα της ομάδας Α, όπου υπάρχει ασβέστιο στο διάλυμα του ΚCL. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενη λόγω του ότι όταν υπάρχει πλήρης έλλειψη ασβεστίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η ένταση της συστολής δεν μπορεί να είναι μεγάλη, λόγω του ότι το ασβέστιο είναι απαραίτητο για την έναρξη και διατήρηση της αυτόματης συσταλτικότητας. Όταν λείπει το εξωκυττάριο ασβέστιο κινητοποιείται ασβέστιο από τις ενδοκυττάρια αποθήκες του κυττάρου, από το σαρκοπλασματικό δίκτυο.

Όσον αφορά και πάλι τη μεταβολή στην ένταση της συστολής, όταν στο εξωκυττάριο περιβάλλον υπάρχει ασβέστιο (ομάδα Ε, στο διάλυμα ΚCL και διάλυμα Kreb's), είναι πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη μεταβολή της έντασης που παρατηρείται στα πειράματα της ομάδας Α όπου στο διάλυμα ΚCL υπάρχει ασβέστιο, ενώ στο διάλυμα Kreb's δεν υπάρχει ασβέστιο. Αυτή η παρατήρηση είναι επίσης αναμενόμενη λόγω της σημασίας που προαναφέρθηκε ότι έχει το ασβέστιο στη συσταλτικότητα του μυομητρίου, η οποία επιβεβαιώνεται στα πειράματα αυτά και μάλιστα με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Όσο μεγαλύτερη ποσότητα ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον (σε ποσότητα η οποία αντιστοιχεί με αυτή που υπάρχει φυσιολογικά στον εξωκυττάριο χώρο του κυττάρου), τόσο καλύτερη η συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου.

Το πιο αξιοσημείωτο εύρημα της παρούσας μελέτης προκύπτει από τη σύγκριση της μεταβολής της έντασης συστολής μεταξύ των πειραμάτων της ομάδας Β και της ομάδας Δ. Στα πειράματα και των δύο ομάδων Β και Δ, δεν

υπάρχει πουθενά ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον (KCL και διάλυμα Krebs's χωρίς ασβέστιο). Στην ομάδα B επιδρά για 30 λεπτά προγεστερόνη στον ιστό. Η μεταβολή στην ένταση των συστολών είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα B όπου επιδρά η προγεστερόνη. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι σε πλήρη απουσία ασβεστίου, η προγεστερόνη δρα πιθανά στις ενδοκυττάρια αποθήκες ασβεστίου στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, μειώνοντας την από το KCL προκαλούμενη αύξηση του ενδοκυττάρια ασβεστίου και προκαλώντας τελικά ελάττωση της έντασης της συστολής.

Όταν υπάρχει ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον είτε στο διάλυμα Krebs's είτε στο διάλυμα KCL, η παρουσία της προγεστερόνης δεν προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση της έντασης συστολής. Έτσι στα πειράματα της ομάδας A , E και ΣΤ ,η εφαρμογή προγεστερόνης στον ιστό δεν προκάλεσε σημαντική μείωση της έντασης συστολής.

Η μελέτη της διάρκειας συστολής δεν έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της διάρκειας συστολής, σε πλήρη έλλειψη ασβεστίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον (KCL και διάλυμα Krebs's χωρίς ασβέστιο) στα πειράματα της ομάδας B και μετά τη δράση προγεστερόνης στη μήτρα, σε σύγκριση με τα πειράματα της ομάδας A όπου υπάρχει ασβέστιο στο διάλυμα KCL .

Η μελέτη του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (AUC) δεν έδειξε και πάλι στατιστικά σημαντική μείωση σε πειράματα της ομάδας B όπου υπάρχει πλήρης απουσία ασβεστίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον και μετά την εφαρμογή προγεστερόνης για 30 λεπτά, συγκριτικά και πάλι με την αντίστοιχη καμπύλη της ομάδας A όπου υπάρχει ασβέστιο στο διάλυμα KCL .

Σημαντική παρατήρηση και στη μελέτη της παραμέτρου AUC είναι ότι η μεταβολή στο AUC στα πειράματα της ομάδας B, όπου έχουμε πλήρη έλλειψη

ασβεστίου, έχει σημαντικά μεγαλύτερη μείωση μετά την εφαρμογή προγεστερόνης στον ιστό, συγκριτικά με τα πειράματα της ομάδας Δ, όπου δεν δρα καθόλου προγεστερόνη στον ιστό. Στη μελέτη αυτής της παραμέτρου, AUC, η μεταβολή που παρατηρείται στα πειράματα της ομάδας Α, όπου υπάρχει κάποια ποσότητα ασβεστίου στο διάλυμα του KCL, είναι σημαντικά μεγαλύτερη συγκρίνοντας την με την αντίστοιχη μεταβολή των πειραμάτων Γ, όπου γίνονται με τις ίδιες συνθήκες αλλά δεν δρα καθόλου προγεστερόνη στον ιστό.

Το ανθρώπινο μυομήτριο αποτελεί όργανο στόχο πολλών ορμονών, νευροδιαβιβαστών και τοπικά εκλυόμενων πεπτιδίων. Διακρίνουμε 3 στιβάδες.: την έσω στιβάδα, που αποτελείται από λείες μυικές ίνες και εντοπίζεται αμέσως κάτω από το ενδομήτριο, τη μέση στιβάδα, που αποτελείται από επιμήκεις λείες μυικές και την εξωτερική στιβάδα, που αποτελείται από μικρού μήκους ομάδες λείων μυικών ινών, συνδεόμενες μεταξύ τους που απαρτίζουν τη μεγαλύτερη μάζα του μυικού τοιχώματος της μήτρας (Wetztein 1965). Τα λεία μυικά κύτταρα αποτελούνται από ινίδια ακτίνης που διατίθενται παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του κυττάρου. Με τη δράση διεγερτών προκαλούνται σημαντικές μεταβολές στα ινίδια ακτίνης που καταλήγουν τελικά στην πρόκληση συστολής.

Η προγεστερόνη μόνη της μειώνει σημαντικά τη συσταλτική δραστηριότητα του μυομητρίου, μια δράση ιδιαίτερα σημαντική για την διατήρηση της κύησης στα πρώτα στάδια. Τα πρώτα πειράματα για τη μελέτη της προγεστερόνης γίνανε σε κουνέλια, και έδειξαν τη σημασία του ωχρού σωματίου της κύησης που παράγει τη συγκεκριμένη ορμόνη, για τη διατήρηση της κύησης.

Ακολούθησαν πειράματα *in vivo* και *in vitro* σε ανθρώπινο μυομήτριο, όπου η κατασταλτική δράση της προγεστερόνης επιβεβαιωνόταν. Στις *in vitro* μελέτες μελετώνταν η κατασταλτική δράση της προγεστερόνης στις συστολές του μυομητρίου που προκαλούνται από την οξυτοκίνη, ενώ στις *in vitro* μελέτες ελέγχονταν η δράση της προγεστερόνης στην αυτόματη συσταλτικότητα του μυομητρίου. Ο ακριβής βιοχημικός μηχανισμός της δράσης της προγεστερόνης στο μυομήτριο δεν είναι ακόμη τόσο ξεκάθαρος.

Ένα από τα πρώτα συμπεράσματα παλαιότερων μελετών ήταν ότι η ευαισθησία της μήτρας στην οξυτοκίνη μειώνεται με την παρουσία προγεστερόνης. Ωστόσο, τα πειράματα *in vivo* πολλές φορές δεν συμφωνούσαν με την κατασταλτική δράση της προγεστερόνης στη συσταλτικότητα του μυομητρίου που παρατηρούνταν στα *in vitro* πειράματα.

Έτσι λοιπόν *in vivo* χορήγηση προγεστερόνης σε υψηλές δόσεις (400mg/μέρα για 4 μέρες) δεν κατάφερε να μειώσει την αυτόματη συσταλτικότητα του μυομητρίου. Πιο πρόσφατες μελέτες, *in vitro* (Sexton et al 2004) που μελέτησαν τη δράση της 17P (17-alpha-hydroxyprogesterone caproate) σε εγκύμονα μήτρα και σε μη εγκύμονα μήτρα, δεν έδειξαν κατασταλτική δράση στη συσταλτικότητα του μυομητρίου. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι η κλινικά παρατηρούμενη κατασταλτική δράση της προγεστερόνης στο μυομήτριο γίνεται μέσω γονιδιακών αλλαγών που προκαλεί, μετά από μακροχρόνια χορήγηση της.

Οι επιδράσεις της προγεστερόνης στο ανθρώπινο μυομήτριο είναι πολλαπλές. Η καταστολή στο ανθρώπινο μυομήτριο γίνεται μέσω γενομικών και μη μηχανισμών.

Οι μη γενομικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν: παρεμπόδιση της εισόδου των ιόντων ασβεστίου (Ca^{++}) μέσα στο κύτταρο, μέσω απενεργοποίησης των καναλιών ασβεστίου (τασσο-εξαρτώμενα και συνδεδεμένα με ειδικούς υποδοχείς κανάλια), έκλυση ασβεστίου από το ενδοκυττάριο περιβάλλον (Kosterin et al 1994), υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης με ενεργοποίηση των καναλιών καλίου (K^+) (Mironneau et al).

Οι περισσότερες δράσεις της προγεστερόνης είναι μέσω σύνδεσής της με ορμονικούς υποδοχείς του πυρήνα και πρόκληση αλλαγών στο γονιδιακό υλικό του κυττάρου. Αναστέλλει την έκφραση της κονεξίνης 43 (Garfield et al 1980, Lye et al 1993), ρυθμίζει το βαθμό σύνδεσης με τους υποδοχείς οξυτοκίνης (Jacobson et al 1987, Soloff et al 1983), μειώνει την από την οιστραδιόλη προκαλούμενη αύξηση του cGMP- εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (Word et al 1998), και μειώνει την έκφραση της ιντερλευκίνης-8 στα κύτταρα του μυομητρίου και του τραχηλικού στρώματος (Ito et al 1994). Συνδέεται με υποδοχείς του πυρήνα και προκαλεί αλλαγές στο γονιδιακό υλικό. Η δράση αυτή της προγεστερόνης στο γονιδιακό υλικό φαίνεται να προκαλείται μετά από παρατεταμένη χορήγησή της.

Καλλιέργεια των λείων μυϊκών κυττάρων με ανάλογο προγεστερόνης-οξική μεδροξυ-προγεστερόνη προκαλεί μείωση της σχετικής αύξησης του ενδοκυτταρίου Ca^{++} από την ενδοθηλίνη 1 ή την οξυτοκίνη (Fomin et al 1999). Η προγεστερόνη μειώνει την σύνδεση των ETA και ETB υποδοχέων ενδοθηλίνης και μειώνει την άμεση απάντηση των λείων μυϊκών ινών στην ενδοθηλίνη 1.

Η ομοιοστασία του ασβεστίου εξαρτάται από την προγεστερόνη και κατ'επέκταση η συσταλτικότητα του μυομητρίου είναι συνδεδεμένη με τα

επίπεδα προγεστερόνης στη συστηματική κυκλοφορία. Η βιοχημική οδός μέσω της οποίας προκαλείται η δράση της προγεστερόνης στο μυομήτριο, είναι μέσω μεταβολής της διαπερατότητας της μεμβράνης στο ασβέστιο. Αυτό πραγματοποιείται μέσω απενεργοποίησης των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών ασβεστίου (VOCs – voltage operated calcium channels) (Perusquia et al 1990), και ταυτόχρονης μείωσης της σύνδεσης της προγεστερόνης με τους υποδοχείς προγεστερόνης της μεμβράνης. Φαίνεται ακόμη από παλιότερες μελέτες ότι η προγεστερόνη κινητοποιεί το ασβέστιο από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες του ενδοπλασματικού δικτύου (Kosterin et al 1994). Δημιουργείται τελικά μια υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης μέσω της ενεργοποίησης των καναλιών K^+ , που οδηγεί σε καταστολή της συστολής.

Η κατασταλτική δράση της προγεστερόνης και των μεταβολιτών της έχει αποδειχθεί και σε άλλες λείες μυικές ίνες, εκτός μυομητρίου, όπως στο ουροποιητικό, το γαστρεντερικό, το κεντρικό νευρικό και το αναπνευστικό σύστημα.

Η δράση της προγεστερόνης είναι πολλές φορές ανταγωνιστική με τη δράση άλλων ορμονών. Ανταγωνίζεται τη δράση των οιστρογόνων μέσω καταστολής των οιστρογονικών υποδοχέων, αύξησης του μεταβολισμού των οιστρογόνων, ή καταστολής της μετάφρασης των γονιδίων που καθορίζουν την απάντηση στα οιστρογόνα. Άλλες φορές παρουσιάζει συνεργική δράση με τα οιστρογόνα, όπως για παράδειγμα τα γονίδια που ρυθμίζουν την έκφραση της οξυτοκίνης, επηρεάζονται από την προγεστερόνη και τα οιστρογόνα. Στις διάφορες φάσεις του κύκλου, που τα επίπεδα των ορμονών είναι διαφορετικά, έχουμε και ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ορμονών.

Το διάλυμα KCL (80 mM) που χρησιμοποιήθηκε για τη διέγερση του μυομητρίου, έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες ότι διαφοροποιεί την αυτόματη συσταλτικότητα του μυομητρίου. Αρχικά προκαλεί μια άμεση σύντομης διάρκειας (< 1 λεπτό) άνοδο του τόνου της συστολής, την οποία ακολουθεί μια αργά εξελισσόμενη φάση χάλασης και επαναφοράς του τόνου στο αρχικό επίπεδο ηρεμίας. Η αποκατάσταση της ρυθμικότητας όσον αφορά τη συχνότητα, την ένταση και τη διάρκεια των συστολών επανέρχεται σταδιακά. Η εφαρμογή διαλύματος KCL οδηγεί σε εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα ενεργοποίηση των τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, είσοδο ιόντων Ca^{++} από τον εξωκυττάριο χώρο, αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής τους και τελικά συστολή. Σε λείες μυϊκές ίνες αγγείων, διαπιστώθηκε πως το KCL επιφέρει ενεργοποίηση της «κινάσης που λειτουργικά εξαρτάται από την καλμοδουλίνη και τα ιόντα Ca^{++} » (Ca-calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII), και της « από mitogen ενεργοποιούμενης πρωτεϊνικής κινάσης» (mitogen-activated protein kinase), επιφέροντας φωσφορυλίωση ελαφράς αλύσου της μυοσίνης (Kim et al 2000). Δεν παρατηρούνται διαφορές όσον αφορά τη συσταλτική συμπεριφορά του μυομητρίου στις δύο φάσεις του κύκλου (παραγωγική και εκκριτική φάση) στη διέγερση του ιστού με διάλυμα KCL.

Η ενδοθηλίνη 1 είναι πεπτίδιο και ανήκει στην οικογένεια των σαραφοτοξινών και έχει σημαντικό ρόλο στην συσταλτικότητα του μυομητρίου. Παράγεται από πολλούς τύπους κυττάρων (Sunnergen et al 1990, Faxen et al 2000, Honore et al 2000, Tieche et al 2001) και αποτελεί ισχυρό αγγειοσυσπαστικό παράγοντα (Luscher and Barton 2000, Giannessi et al 2001). Η επίδραση της ET 1 στις λείες μυϊκές ίνες προκαλεί αύξηση της

έντασης και της συχνότητας των αυτόματων συστολών (Rizzi et al 1998, Maxwell et al 1998, Yap et al 2000, Domali et al 2001).

Η ενδοθηλίνη έχει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος (Arai et al 1990, Kamada et al 1995, Haq et al 1996, Ara et al 1998). Παράγεται κυρίως από το ενδομήτριο και δρα στο παρακείμενο μυομήτριο (παρακρινική δράση), επηρεάζοντας τη συσταλτική συμπεριφορά του μυομητρίου τόσο κατά την κύηση όσο και κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Cameron et al 1995). Η δράση της είναι κυρίως μέσω των ETA υποδοχέων και προκαλεί αύξηση του τόνου και της συχνότητας των αυτόματων συστολών σε προεμμηνοπαυσιακό μυομήτριο (Word et al 1990, Xuan et al 1994, Bacon et al 1995, Osada et al 1997).

Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα η συσταλτικότητα επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου από ένα αρχικό επίπεδο ηρεμίας 130 nM, σε ένα επίπεδο της τάξης των 200-400 nM, που οδηγεί σε φωσφορυλίωση της κινάσης της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης (Ca^{++} activated myosin ATPase light chain kinase), αύξηση της δραστηριότητας της μυοσίνης και συστολή (Barany 1993, Mizuki et al 1993, Word et al 1994).

Η σύνδεση της ET 1 με το σύμπλοκο διαμεμβρανικού υποδοχέα-πρωτεΐνης G, προκαλεί συστολή του λείου μυϊκού κυττάρου «διφασικού τύπου» αποτελούμενη από δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι ανεξάρτητο της εξωκυττάριας συγκέντρωσης ιόντων Ca^{++} , ενώ το δεύτερο είναι άμεσα καθοριζόμενο από την εξωκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{++} . Αρχικά λοιπόν ενεργοποιείται το σύμπλοκο διαμεμβρανικού υποδοχέα ETA-ρυθμιστικής πρωτεΐνης, και οδηγεί σε ενεργοποίηση του φωσφοινοδιτιδικού

κύκλου και υδρόλυση της φωσφολιπάσης C (PLC). Η υδρόλυση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP 3) και διασυλογλυκερόλης (DAG). Η παραγόμενη τριφωσφορική ινοσιτόλη συνδέεται με τους υποδοχείς «που συνδέονται λειτουργικά με την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C», στο ενδοπλασματικό δίκτυο και απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο του λείου μυϊκού κυττάρου.

Το σύμπλοκο «υποδοχέα ενδοπλασματικού δικτύου – διάλυου απελευθέρωσης ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο» εμφανίζει υψηλή ευαισθησία στην παρουσία ιόντων Ca^{++} στο κυτταρόπλασμα και παρουσιάζει ταυτόχρονα μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης. Χαμηλή δηλαδή συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στο εξωκυττάριο περιβάλλον προκαλεί απελευθέρωση αυτών από το ενδοπλασματικό δίκτυο, υπό τη μορφή STOCKS (spontaneous transient outward currents 70-500 mmsec) «σύντομων στιγμιαίων γεγονότων». Μεγάλη συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} στο κυτταρόπλασμα εμποδίζει την περαιτέρω απελευθέρωσή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο (αρνητική ανατροφοδότηση). Η σύνδεση της ET 1 με τον υποδοχέα της στα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου επιφέρει σταδιακή αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP 3), η οποία με τη σειρά της αυξάνει την συχνότητα των σύντομων εκλύσεων ιόντων ασβεστίου και αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης αυτών. Προκαλείται λοιπόν μαζική απελευθέρωση ασβεστίου από τις ενδοκυττάριας αποθήκες και ενεργοποίηση των L τύπου τασεοεξαρτώμενων διαύλων ασβεστίου, είσοδο ιόντων ασβεστίου από τον εξωκυττάριο χώρο και άμεση σύσπαση του κυττάρου στόχου. Ταυτόχρονα η παραγόμενη διασυλογλυκερόλη (DAG), σε συνδυασμό με τα ελεύθερα ιόντα Ca^{++} , ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C

(PLC). Η PLC με τη σειρά της ρυθμίζει τη διατήρηση της εισόδου των ιόντων Ca^{++} , με παράταση της ενεργοποίησης των L τύπου διαύλων ασβεστίου (Large et al 2002). Ακολουθεί φωσφορυλίωση της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης, μεταβολή της λειτουργικότητας των διαύλων, και διαφοροποίηση της ευαισθησίας των πρωτεϊνών καλπονίνη, καλδεσμόνη και δεσμίνη στα ιόντα Ca^{++} . Όλα αυτά οδηγούν σε μια παρατεινόμενη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του ανθρώπινου μυομητρίου (Andrea and Walsh 1992, Wray 2001).

Μετά το πρώτο αυτό στάδιο της άμεσης-στιγμιαίας συσταλτικής ανταπόκρισης των λείων μυικών ινών στη δράση της ET 1 ακολουθεί το δεύτερο στάδιο της «παράτασης» της επίδρασης του μητροσυσπαστικού παράγοντα. Δημιουργείται ένα «plateau» όσον αφορά την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων Ca^{++} , που διατηρεί αυτή την παράταση. Επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των τασεοεξαρτώμενων διαύλων της κυτταρικής μεμβράνης και τη συνεχόμενη εισροή ιόντων Ca^{++} από τον εξωκυττάριο χώρο. Οι δίαυλοι αυτοί είναι εξαρτημένοι λειτουργικά από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη G και τους δευτερογενείς αγγελιοφόρους των εξωκυττάρων σημάτων (ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων Ca^{++} και την πρωτεϊνική κινάση C) και επομένως η είσοδος των ιόντων Ca^{++} στο εσωτερικό του κυττάρου καθορίζεται από την βιοχημική οδό του φωσφοινοσιπιδικού κύκλου (PLC).

Στα πειράματα της παρούσας μελέτης εφαρμοζόταν στις λείες μυικές ίνες μυομητρίου από προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αρχικά τάση 1 g και αφηνόταν ο ιστός να αναπτύξει αυτόματη συσταλτικότητα σε περιβάλλον

όπου έλειπε το ασβέστιο (Kreb's χωρίς ασβέστιο). Η ένταση και η συχνότητα των αυτόματων συστολών παρατηρούνταν για τουλάχιστον 1-2 ώρες.

Αρχικά παρατηρούνταν αυτόματες συστολές οι οποίες σταδιακά έφθιναν τόσο σε ένταση όσο και σε συχνότητα. Σε κάποιες περιπτώσεις είχαμε ως και πλήρη εξάλειψη των συστολών.

Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ET 1 σε συγκέντρωση 10^{-7} για τη διέγερση του ιστού. Η επιλογή της συγκεκριμένης συγκέντρωσης έγινε με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Domali et al 2001), που δείξαν την καλύτερη συσταλτική ανταπόκριση του μυομητρίου στις συγκεντρώσεις 10^{-6} , 10^{-7} ET 1. Μεταξύ των δύο επιλέχθηκε η συγκέντρωση 10^{-7} , λόγω του χαμηλότερου κόστους πειραμάτων. Για την παρασκευή του διαλύματος ET 1 χρησιμοποιήθηκε διάλυμα με προσθήκη ασβεστίου ή όχι. Η καμπύλη συστολής που προκαλείται από την ET 1 χαρακτηρίζεται από μια απότομη και άμεση αύξηση του τόνου και από μια σταδιακή και παρατεταμένη πτώση της συστολής ως το αρχικό επίπεδο ηρεμίας. Ανάλογα με τον τύπο του πειράματος εφαρμοζόταν προγεστερόνη στον ιστό για 30 λεπτά και μελετώνταν η επίδρασή της στην «από την ET 1 προκαλούμενη συστολή» του μυομητρίου.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών μελετούν τρεις παραμέτρους στις προκαλούμενες συστολές. Την ένταση, τη διάρκεια και το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC). Έτσι λοιπόν εξετάζοντας αρχικά την ένταση συστολής παρατηρούμε ότι σε περιβάλλον με πλήρη έλλειψη ασβεστίου-πειράματα ΣΤ, (Kreb's και διάλυμα ET 1 χωρίς Ca^{++}) η ένταση της προκαλούμενης από την ET 1 συστολής παρουσιάζει μείωση με την πάροδο του χρόνου (μεταξύ αρχικής και δεύτερης συστολής). Η παρατήρηση αυτή

είναι μη αξιολογήσιμη καθώς είναι μια φυσιολογική αντίδραση του ιστού στην πλήρη έλλειψη ασβεστίου. Σε περιβάλλον με πλήρη απουσία ασβεστίου - πειράματα Γ, η ένταση συστολής είναι σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη ένταση στα πειράματα της ομάδας Α, όπου χρησιμοποιείται ET 1 με ασβέστιο για τη διέγερση του ιστού. Και στους δύο τύπους πειραμάτων επιδρά για 30 λεπτά προγεστερόνη στον ιστό. Και η παρατήρηση αυτή είναι μη αξιολογήσιμη λόγω του ότι είναι αναμενόμενη η μικρότερη ένταση συστολής λόγω της πλήρους έλλειψης ασβεστίου. Σε αντίστοιχες συγκρίσεις της έντασης των πειραμάτων της ομάδας Β και Δ, φαίνεται και πάλι ότι όπου υπάρχει πλήρης έλλειψη ασβεστίου, οι εντάσεις είναι μικρότερες, αποτέλεσμα και πάλι μη αξιολογήσιμο.

Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουμε και στη σύγκριση των μεταβολών. Εκεί όπου υπάρχει πλήρης έλλειψη ασβεστίου έχουμε στατιστικά σημαντική μείωση της έντασης συστολής. Η σύγκριση των μεταβολών της έντασης, των πειραμάτων Α με τα πειράματα Ε, όπου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ET 1 με ασβέστιο και στους δύο τύπους πειραμάτων, με διαφορά ότι στα πειράματα Α όπου επέδρασε προγεστερόνη στον ιστό, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η σύγκριση, αντίστοιχα των μεταβολών της έντασης των πειραμάτων Γ με τα πειράματα ΣΤ, όπου χρησιμοποιήθηκε και στους δύο τύπους πειραμάτων ET 1 χωρίς ασβέστιο για τη διέγερση του ιστού, και προγεστερόνη μόνο στα πειράματα Γ, δεν δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Μελετώντας τη διάρκεια συστολής, σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο η προγεστερόνη προκαλεί μείωση της διάρκειας συστολής μετά από διέγερση του ιστού με διάλυμα ET 1 με ασβέστιο. Αυτή η παρατήρηση έγινε στα

πειράματα της ομάδας Β, δεν παρατηρήθηκε όμως και στα αντίστοιχα πειράματα της ομάδας Α. Στα πειράματα της ομάδας Γ η διάρκεια της δεύτερης καμπύλης ET 1 χωρίς ασβέστιο είναι σημαντικά μικρότερης έντασης σε σχέση με την πρώτη καμπύλη, όπου έχει επιδράσει προγεστερόνη στον ιστό για 30 λεπτά. Στα πειράματα της ομάδας Δ, όπου και πάλι γίνεται διέγερση του ιστού με ET 1 χωρίς ασβέστιο, η δεύτερη καμπύλη μετά τη δράση προγεστερόνης στον ιστό είναι μικρότερης διάρκειας. Επίσης στα πειράματα της ομάδας Ε και πάλι η δεύτερη καμπύλη έχει μικρότερη διάρκεια. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η προγεστερόνη δεν έχει καμία ξεχωριστή επίδραση στη διάρκεια των συστολών που προκαλούνται από την ET 1 με ή χωρίς ασβέστιο. Το γεγονός ότι σε όλα αυτά τα πειράματα η δεύτερη καμπύλη κάθε φορά παρουσίαζε μικρότερη διάρκεια, δεν είναι αξιολογήσιμο λόγω του ότι είναι η φυσική εξέλιξη να φθίνει η διάρκεια συστολής σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο.

Συγκρίνοντας τη διάρκεια της αρχικής καμπύλης στο πείραμα Α με τη διάρκεια της αρχικής καμπύλης του πειράματος Γ, όπου στο πείραμα Γ γίνεται διέγερση του ιστού με ET 1 χωρίς ασβέστιο, και επιδρά προγεστερόνη για 30 λεπτά και στα δύο πειράματα, η διάρκεια της καμπύλης στο πείραμα Γ είναι σημαντικά μικρότερης διάρκειας. Αντίστοιχη παρατήρηση έχουμε και στη δεύτερη καμπύλη των πειραμάτων της ομάδας Α και Γ. Σε πλήρη δηλαδή απουσία ασβεστίου η διάρκεια συστολής είναι μικρότερη. Στα πειράματα της ομάδας Β με Δ η σύγκριση των αρχικών και των δεύτερων καμπυλών δείχνει σημαντικά μικρότερη διάρκεια συστολής εκεί όπου χρησιμοποιείται ET 1 χωρίς ασβέστιο για τη διέγερση του ιστού. Οι παρατηρήσεις αυτές δεν είναι αξιολογήσιμες λόγω του ότι είναι φυσιολογικό να έχουμε μικρότερη διάρκεια

συστολής εκεί όπου δεν έχουμε καθόλου ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η μικρή έστω παρουσία ασβεστίου στο διάλυμα ET 1 ευνοεί τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου.

Η σύγκριση των μεταβολών της διάρκειας, των πειραμάτων Α με τα πειράματα Ε, όπου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ET 1 με ασβέστιο και στους δύο τύπους πειραμάτων, με διαφορά ότι στα πειράματα Α επέδρασε προγεστερόνη στον ιστό, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η σύγκριση, αντίστοιχα των μεταβολών της διάρκειας των πειραμάτων Γ με τα πειράματα ΣΤ, όπου χρησιμοποιήθηκε και στους δύο τύπους πειραμάτων ET 1 χωρίς ασβέστιο για τη διέγερση του ιστού, και προγεστερόνη μόνο στα πειράματα Γ, δεν δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Η μελέτη του εμβαδού κάτω από την καμπύλη (AUC) έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με την μελέτη των δύο άλλων παραμέτρων. Στα πειράματα τύπου Α, Β, Γ και ΣΤ , η δεύτερη καμπύλη πάντα παρουσίαζε μικρότερο AUC, παρατήρηση μη αξιολογήσιμη λόγω της φυσιολογικής πτώσης που παρουσιάζει η συστολή σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο. Και πάλι εκεί που υπάρχει πλήρης έλλειψη ασβεστίου η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη της συστολής είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτές που έχουμε ασβέστιο στο διάλυμα της ET 1. Συγκρίνοντας το AUC της αρχικής καμπύλης στα πειράματα της ομάδας Α, όπου επέδρασε για 30 λεπτά προγεστερόνη στον ιστό και χρησιμοποιήθηκε ET 1 με ασβέστιο για τη διέγερση του ιστού, με το AUC της αρχικής καμπύλης στα πειράματα Γ όπου έγινε διέγερση του ιστού με ET 1 χωρίς ασβέστιο, έχουμε σημαντικά μικρότερο AUC στην ομάδα . Η σύγκριση του AUC της δεύτερης καμπύλης των ίδιων πειραμάτων έδειξε

σημαντικά μικρότερο AUC εκεί που δεν υπάρχει καθόλου ασβέστιο. Η σύγκριση του AUC της αρχικής και της δεύτερης καμπύλης στα πειράματα της ομάδας Β, με τις αντίστοιχες αρχικές και δεύτερες καμπύλες στα πειράματα της ομάδας Δ, έδειξε σημαντικά μικρότερο AUC εκεί όπου υπήρχε πλήρης απουσία ασβεστίου. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι μη αξιολογήσιμες λόγω του ότι είναι φυσιολογικό να έχουμε μικρότερο AUC της καμπύλης συστολής εκεί όπου λείπει τελείως το ασβέστιο.

Η σύγκριση των μεταβολών του AUC, των πειραμάτων Α με τα πειράματα Ε, όπου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ET 1 με ασβέστιο και στους δύο τύπους πειραμάτων, με διαφορά ότι στα πειράματα Α επέδρασε προγεστερόνη στον ιστό, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά. Η σύγκριση, αντίστοιχα των μεταβολών του AUC των πειραμάτων Γ με τα πειράματα ΣΤ, όπου χρησιμοποιήθηκε και στους δύο τύπους πειραμάτων ET 1 χωρίς ασβέστιο για τη διέγερση του ιστού, και προγεστερόνη μόνο στα πειράματα Γ, δεν δείχνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Στατιστικά σημαντική διαφορά έχουμε μόνο στη σύγκριση της μεταβολής του AUC των πειραμάτων τύπου Β με Δ, όπου στα πειράματα Β γίνεται διέγερση του ιστού με ET 1 με ασβέστιο ενώ στα πειράματα Δ γίνεται διέγερση με ET 1 χωρίς ασβέστιο. Και πάλι η παρατήρηση αυτή είναι μη αξιολογήσιμη λόγω της αναμενομένου μικρότερου AUC σε πλήρη απουσία ασβεστίου.

Παλαιότερες μελέτες έδειξαν αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου μετά την επίδραση ενδοθηλίνης στις λείες μυϊκές ίνες ως και 31% όταν λείπει ασβέστιο από τον εξωκυττάριο χώρο και ως και 143% όταν υπάρχει ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Fomin et al 1999). Η επίδραση προγεστερόνης προκαλεί μείωση της παρατηρούμενης αύξησης της

ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου, μετά την επίδραση ενδοθηλίνης στον ιστό (Fomin et al 1999). Μελέτες που γίνανε σε μιομήτριο προ και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, έδειξαν ότι το ορμονικό προφίλ τροποποιεί τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μιομητρίου στη δράση της ET 1 (Domali et al 2001). Στην ομάδα της εμμηνόπαυσης η δράση της ET 1 είναι μεγαλύτερης διάρκειας και η προγεστερόνη έχει ανασταλτική δράση στην από την ET 1 προκαλούμενη συστολή. Στις γυναίκες που βρισκόταν στην ωχρινική φάση του κύκλου η συσταλτική συμπεριφορά του μιομητρίου ήταν παρόμοια με την ομάδα της εμμηνόπαυσης.

Σε εγκύμονα μήτρα η ET 1 αυξάνει τη συσταλτικότητα του μιομητρίου μέσω αύξησης του αριθμού των υποδοχέων ενδοθηλίνης. Με αυτό τον τρόπο ευνοεί την είσοδο ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο και ευνοεί την μητροσύσπαση. Δρα συνεργικά με την ωκυτοκίνη αλλά δεν έχει αποδειχθεί να έχει δράση κατά την έναρξη του τοκετού (Word et al 1992, Osada et al 1997, Eude et al 2001).

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η προσθήκη προγεστερόνης σε καλλιέργειες κυττάρων λείων μυικών κυττάρων μιομητρίου, μειώνει τον αριθμό των λειτουργικών υποδοχέων ενδοθηλίνης (Fomin et al 1999). Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η προγεστερόνη στην εμμηνόπαυση μειώνει τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μιομητρίου στην ET 1 μας οδηγεί στην κατεύθυνση της ενεργοποίησης των γονιδιακών μηχανισμών δράσης της προγεστερόνης. Η άμεση επίδραση προγεστερόνης στα λεία μυικά κύτταρα του μιομητρίου δεν προκαλεί αξιοσημείωτες μεταβολές στο μοντέλο συσταλτικής συμπεριφοράς του

μυομητρίου στη δράση της ET 1. Όταν όμως η επίδραση της προγεστερόνης στο κύτταρο είναι μακροχρόνια, όπως σε γυναίκες της εμμηνόπαυσης, τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Είναι πιθανό τότε να προκαλεί αλλαγές στο γονιδιακό υλικό του κυττάρου και να τροποποιείται ο αριθμός των υποδοχέων της μεμβράνης, με συνέπεια να παρατηρείται διαφορετικής έντασης απάντηση στη δράση της ET 1.

Στην παρούσα μελέτη η απουσία ασβεστίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον οδήγησε σε πλήρη αναστολή των συστολών, γεγονός που αποδεικνύει ότι η παρουσία εξωκυτταρίου ασβεστίου είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της συστολής. Παρότι η πραγματοποίηση των πειραμάτων γινόταν σε περιβάλλον χωρίς ασβέστιο, τα λεία μυϊκά κύτταρα του μυομητρίου άρχιζαν να συστέλλονται, πιθανά μέσω κινητοποίησης ενδοκυτταρίων αποθηκών ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Δεν ήταν όμως δυνατόν να διατηρηθεί η συσταλτικότητα. Η επίδραση ET 1 με ασβέστιο προκαλούσε μια πολύ άμεση απάντηση από το μυομήτριο με μια απότομη αύξηση του βασικού τόνου και μια βραδεία επαναφορά του στο βασικό επίπεδο ηρεμίας. Η επίδραση της προγεστερόνης για 30 λεπτά δεν είχε καμία τροποποίηση της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου, όσον αφορά την ένταση, τη διάρκεια και το εμβαδό κάτω από την καμπύλη της συστολής που προκαλούνταν από την ET 1. Η επίδραση ET 1 χωρίς ασβέστιο, προκαλούσε μια άμεση απάντηση από το μυομήτριο παρόμοια με την απάντηση που είχαμε και από την επίδραση ET 1 με ασβέστιο, αλλά όχι τόσο μεγάλης έντασης και διάρκειας. Και στην περίπτωση αυτή της πλήρους έλλειψης ασβεστίου, η προγεστερόνη δεν έδειξε να τροποποιεί τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου.

Συμπερασματικά η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο πειραματικά πρωτόκολλα, για να μελετηθούν οι μηχανισμοί δράσης της προγεστερόνης και της ενδοθελίνης στις λείες μυϊκές ίνες γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Για να μελετηθούν οι βιοχημικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον με ή χωρίς ασβέστιο. Βρέθηκε λοιπόν ότι όταν υπάρχει πλήρης έλλειψη ασβεστίου, η προγεστερόνη προκαλεί μια άμεση μείωση στην ένταση και το AUC (εμβαδό κάτω από την καμπύλη), της προκαλούμενης συστολής από το KCL. Η άμεση αυτή δράση της προγεστερόνης, προκαλείται πιθανώς μέσω δράσης της στις ενδοκυττάρια αποθήκες ασβεστίου του σαρκοπλασματικού δικτύου, όπου μειώνει την κινητοποίηση του ασβεστίου που προκαλείται από το KCL. Η κατασταλτική δράση της προγεστερόνης σε μακροχρόνια χρήση της ή όταν το ορμονικό περιβάλλον της γυναίκας έχει μεγάλη ποσότητα προγεστερόνης, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, είναι μέσω αλλαγών που προκαλεί στο γονιδιακό υλικό, επηρεάζοντας έτσι τον αριθμό των υποδοχέων ασβεστίου της μεμβράνης, και των υποδοχέων που συνδέονται με μητροσυσπαστικές ουσίες όπως η ωκυτοκίνη και η ενδοθελίνη, προκαλώντας τελικά την μείωση της εισροής ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο, και μείωση της συστολής.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το δεύτερο πειραματικό πρωτόκολλο φαίνεται ότι η προγεστερόνη δεν προκαλεί καμία μεταβολή στη συσταλτική ανταπόκριση του μυομητρίου στη δράση της ενδοθελίνης 1, όταν λείπει το ασβέστιο από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Η προγεστερόνη όπως δείχνουν παλαιότερες μελέτες έχει κατασταλτική δράση στην συσταλτικότητα του μυομητρίου που προκαλείται από την ET 1. Είναι πιθανό οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην ανταπόκριση αυτή είναι μέσω

γονιδιακών μηχανισμών που προκαλούν αλλαγή στο επίπεδο των κυτταρικών υποδοχέων και μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης στα ιόντα ασβεστίου, με τελικό αποτέλεσμα μείωση της εισροής τους μέσα στο κύτταρο και μείωση της συστολής.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.

- Σε περιβάλλον όπου λείπει το ασβέστιο από το εξωκυττάριο περιβάλλον, παρατηρείται αυτόματη συσταλτικότητα του μυομητρίου, μέσω κινητοποίησης του ασβεστίου από τις ενδοκυττάρια αποθήκες του σαρκοπλασματικού δικτύου. Η ένδεια ασβεστίου αυξάνει τη ευερεθιστότητα των ιστών στους διεγέρτες.
- Με την πάροδο του χρόνου οι αυτόματες συστολές του μυομητρίου αρχίζουν να φθίνουν σε ένταση και συχνότητα, όταν λείπει το ασβέστιο από το εξωκυττάριο περιβάλλον.
- Η εφαρμογή διαλύματος Krebs με ασβέστιο στο τέλος κάθε πειράματος, προκαλεί την άμεση συσταλτική ανταπόκριση του μυομητρίου.
- Σε πλήρη απουσία ασβεστίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον, η εφαρμογή προγεστερόνης στον ιστό προκαλεί μείωση στην ένταση της από το KCL συστολής.
- Είναι πιθανό να δρα στις ενδοκυττάρια αποθήκες ασβεστίου και να προκαλεί μείωση της από το KCL κινητοποίησης των ενδοκυττάρια αποθηκών του, στο σαρκοπλασματικό δίκτυο.
- Όταν υπάρχει κάποια ποσότητα ασβεστίου στο διάλυμα KCL η συσταλτική ανταπόκριση του μυομητρίου είναι πιο έντονη.
- Η πλήρης απουσία ασβεστίου, προκαλεί μικρότερης διάρκειας συστολές εκεί όπου έχει επιδράσει η προγεστερόνη.

- Σε πλήρη απουσία ασβεστίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον, η επίδραση της προγεστερόνης στη λεία μυική ίνα προκαλεί μεγαλύτερη μείωση του AUC, εμβαδού κάτω από την καμπύλη της συστολής.
- Όταν υπάρχει κάποια ποσότητα ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο (διάλυμα KCL), τότε η εφαρμογή προγεστερόνης και πάλι προκαλεί μείωση του AUC, εμβαδού κάτω από την καμπύλη της συστολής.
- Η προγεστερόνη, δεν φαίνεται να επηρεάζει την άμεση συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της ET 1
- Όταν δεν υπάρχει ασβέστιο στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η προγεστερόνη δεν τροποποιεί την άμεση συσταλτική ανταπόκριση του μυομητρίου στην ET 1.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μηχανισμοί συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης και της ενδοθελίνης 1.

Εισαγωγή

Η συσταλτικότητα του μυομητρίου αποτελεί αντικείμενο μεγάλου αριθμού ερευνών, λόγω του σημαντικού ρόλου της τόσο κατά τον τοκετό όσο και στα αρχικά στάδια της κύησης. Η προγεστερόνη είναι μια από τις στεροειδείς ορμόνες, που έχει αποδειχθεί ότι ασκεί κατασταλτική δράση στη συσταλτικότητα του μυομητρίου. Η καταστολή στο ανθρώπινο μυομήτριο γίνεται μέσω γενομικών και μη μηχανισμών. Οι μη γενομικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν: παρεμπόδιση της εισόδου των ιόντων ασβεστίου μέσα στο κύτταρο, έκλυση ασβεστίου από το ενδοκυττάριο περιβάλλον, υπερπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης με ενεργοποίηση των καναλιών καλίου. Οι περισσότερες ωστόσο δράσεις της προγεστερόνης είναι μέσω αλλαγών στο γονιδιακό υλικό του κυττάρου, μετά από παρατεταμένη χορήγησή της. Η ενδοθελίνη 1 είναι ισχυρό αγγειοσυσταλτικό πεπτίδιο παρατεταμένης δράσης που έχει ρυθμιστική δράση στη συσταλτικότητα του μυομητρίου δρώντας κυρίως ως τοπικά εκλυόμενος παράγοντας.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να μελετήσει τη συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης και της ενδοθελίνης 1.

Υλικό και μέθοδος.

Το πειραματικό πρωτόκολλο περιλαμβάνει δύο κύριες ομάδες πειραμάτων. Όλα τα ιστοτεμάχια ελήφθησαν από γυναίκες προεμμηνοπαυσιακές που υποβλήθηκαν σε υστερεκτομία για καλοήθεις παθήσεις της μήτρας. Τα ιστοτεμάχια της μήτρας, αμέσως μετά το χειρουργείο τοποθετούνταν σε πειραματική διάταξη συνεχούς ροής για ισομετρική καταγραφή.

A. Μελέτη της συσταλτικής ανταπακρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της προγεστερόνης. Συνολικά μελετήθηκε η συσταλτικότητα του μυομητρίου 22 γυναικών. Το πρωτόκολλο αυτό περιλάμβανε 6 τύπου πειραμάτων, που ήταν οι εξής:

A. Krebs (-Ca) → KCL(+Ca) for 10 min. → Krebs(-Ca) → progesterone 10^{-6} for 30 min → KCL(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

B. Krebs (-Ca) → KCL(-Ca) for 10 min. → Krebs(-Ca) → progesterone 10^{-6} for 30 min → KCL(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

Γ. Krebs (-Ca) → KCL(+Ca) for 10 min. → Krebs(-Ca) → KCL(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

Δ. Krebs (-Ca) → KCL(-Ca) for 10 min. → Krebs(-Ca) → KCL(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca) → Krebs(+Ca).

E. Krebs (+Ca) → KCL(+Ca) for 10 min. → Krebs(+Ca) → progesterone 10^{-6} for 30 min → KCL(+Ca) for 10 min → Krebs (+Ca).

ΣΤ. Krebs (+Ca) → KCL(-Ca) for 10 min. → Krebs(+Ca) → progesterone 10^{-6} for 30 min → KCL(-Ca) for 10 min → Krebs (+Ca).

B. Μελέτη της συσταλτικής ανταποκρισιμότητας του μυομητρίου στη δράση της ενδοθελίνης 1, και η μεταβολή αυτής της δράσης όταν έχει επιδράσει

προγεστερόνη στον ιστό. Μελετήθηκε η συσταλτικότητα του μυομητρίου 14 γυναικών. Πραγματοποιήθηκαν 6 τύποι πειραμάτων :

A. Krebs (-Ca) → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).

B. Krebs (-Ca) min → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).

Γ. Krebs (-Ca) → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).

Δ. Krebs (-Ca) min → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).

E. Krebs (-Ca) → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).

ΣΤ. Krebs (-Ca) → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).

Αποτελέσματα.

Σε κάθε πείραμα μετρώνταν η ένταση, η διάρκεια και το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC), στις καμπύλες KCL στο 1^ο πρωτόκολλο και στις καμπύλες ET 1 στο 2^ο πρωτόκολλο. Ακολούθησε σύγκριση αυτών των παραμέτρων τόσο στον ίδιο τύπο πειραμάτων όσο και μεταξύ διαφορετικών τύπων πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση έγινε με T test, για τη σύγκριση απλών μεγεθών.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν μείωση της έντασης, διάρκειας και εμβαδού κάτω από την καμπύλη της προκαλούμενης συσταλής μετά από εφαρμογή διαλύματος KCL (80mM) στον ιστό, μετά την δράση της προγεστερόνης στον ιστό για 30 λεπτά. Σε πλήρη απουσία ασβεστίου από το

εξωκυττάριο περιβάλλον, η εφαρμογή προγεστερόνης στον ιστό προκαλεί μείωση στην ένταση της από το KCL συστολής. Δρα στις ενδοκυττάρια αποθήκες ασβεστίου και προκαλεί μείωση της από το KCL κινητοποίησης των ενδοκυττάρων αποθηκών του, στο σαρκοπλασματικό δίκτυο. Αν υπάρχει κάποια ποσότητα ασβεστίου στο διάλυμα KCL η συσταλτική ανταπόκριση του μυομητρίου είναι πιο έντονη. Πιθανά η παρουσία του ασβεστίου να έχει δόσοεξαρτώμενη δράση στη συσταλτική απάντηση του μυομητρίου. Η πλήρης απουσία ασβεστίου, προκαλεί μικρότερης διάρκειας συστολές εκεί όπου έχει επιδράσει η προγεστερόνη. Σε πλήρη απουσία ασβεστίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον, η επίδραση της προγεστερόνης στη λεία μυική ίνα προκαλεί μεγαλύτερη μείωση του AUC, εμβαδού κάτω από την καμπύλη της συστολής. Όταν υπάρχει κάποια ποσότητα ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο (διάλυμα KCL), τότε η εφαρμογή προγεστερόνης και πάλι προκαλεί μείωση του AUC, εμβαδού κάτω από την καμπύλη της συστολής.

Η προγεστερόνη, δεν φαίνεται να επηρεάζει την άμεση συσταλτική ανταποκρισιμότητα του μυομητρίου στη δράση της ET 1. Όταν έχουμε απουσία ασβεστίου από το εξωκυττάριο περιβάλλον, η προγεστερόνη δεν τροποποιεί την άμεση συσταλτική ανταπόκριση του μυομητρίου στην ET 1.

SUMMARY.

Mechanisms of the contractile responsiveness of the human myometrium on the action of progesterone and endothelin 1.

Introduction

A great number of researches has been made the latest years due to the importance of the role it has played during both the first stages of pregnancy and labour. Progesterone is a steroid hormone, which has proved to have a relaxant effect on the contractility of the myometrium. This suppression to the human myometrium is through genomic and non genomic mechanisms. The non genomic mechanism through which progesterone affects the myometrial contractility concerns the inhibition of the entry of Ca^{++} into the cell, the Ca^{++} from the intracellular environment and the hyperpolarization of the cellular membrane through activation of the K^+ channels. Most of the mechanisms of progesterone action are achieved through changes to the DNA of the cell after longlasting administration. Endothelin 1 is a long acting vasoconstrictor factor of long action which plays a functional role on the myometrial contractility and acts as a locally released factor.

The aim of the present study is to investigate the contractile responsiveness of the human myometrium to the action of progesterone and endothelin 1.

Material and methods.

The experimental protocol includes two main groups of experiments.

Myometrial strips were taken from pre-menopausal women who had done hysterectomy for nonmalignant conditions. The myometrial strips soon after surgery, were mounted horizontally in bathing chambers for isometric recording.

A. Study of the contractile responsiveness of the myometrium to the action of progesterone. 22 cases have been examined in total. The protocol has 6 types of experiments, which were:

A. Krebs (-Ca)→KCL(+Ca) for 10 min.→Krebs(-Ca)→progesterone 10^{-6} for 30 min→KCL(+Ca) for 10 min→Krebs (-Ca) →Krebs(+Ca).

B. Krebs (-Ca)→KCL(-Ca) for 10 min.→Krebs(-Ca)→progesterone 10^{-6} for 30 min→KCL(-Ca) for 10 min→Krebs (-Ca) →Krebs(+Ca).

Γ. Krebs (-Ca)→KCL(+Ca) for 10 min.→Krebs(-Ca)→KCL(+Ca) for 10 min→Krebs (-Ca) →Krebs(+Ca).

Δ. Krebs (-Ca)→KCL(-Ca) for 10 min.→Krebs(-Ca)→KCL(-Ca) for 10 min→Krebs (-Ca) →Krebs(+Ca).

E. Krebs (+Ca)→KCL(+Ca) for 10 min.→Krebs(+Ca)→progesterone 10^{-6} for 30 min→KCL(+Ca) for 10 min→Krebs (+Ca).

ΣΤ. Krebs (+Ca)→KCL(-Ca) for 10 min.→Krebs(+Ca)→progesterone 10^{-6} for 30 min→KCL(-Ca) for 10 min→Krebs (+Ca).

B. Study of the contractile responsiveness of the myometrium to the action of endothelin 1, as well as the modification of this action after progesterone application on the tissue for 30 min. The myometrial contractility has been examined in 14 cases. The protocol has 6 types of experiments, which were:

- A. Krebs (-Ca) → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).
- B. Krebs (-Ca) min → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).
- Γ. Krebs (-Ca) → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).
- Δ. Krebs (-Ca) min → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → progesterone 10^{-6} (-Ca) for 30 min → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).
- E. Krebs (-Ca) → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(+Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).
- ΣΤ. Krebs (-Ca) → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs(-Ca) for 1-2 hours → ET 1(-Ca) for 10 min → Krebs (-Ca).

Results.

In each type of experiments we have evaluated the tension, the duration and the area under the curve (AUC), for the KCL induced curve for the first protocol and ET 1 induced curve for the second protocol. We have compared the differences in terms of amplitude, duration and AUC between the first and the second contractile curve, and between different types of experiments. For the statistical analysis of the results we have used T test.

The results of the present study shows reduction in terms of tension, duration and AUC of the KCL induced contraction, after the administration of progesterone for 30 min. In the total absence of calcium from the extracellular environment, progesterone can cause reduction on the tension of the KCL induced contraction. KCL activates intracellular stored calcium, while progesterone probably inhibites this action. Even a small amount of calcium within the KCL solution can cause acute contraction. It is asumed that calcium acts with a dose-dependent manner on the myometrial contractility. Complete absence of calcium, reduses the duration and the AUC (area under curve) of the myometrial contractility after the application of progesterone on the tissue for 30 min.

There is no clear evidence that progesterone can change the contractile responsiveness of the myometrium on the action of ET 1. The same effect occurs also, in the total absence of calcium.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acevedo CH, Ahmed A. Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *J Clin Invest.* 1998 Mar 1;101(5):949-55.

Anbe H, Okawa T, Sugawara N, Takahashi H, Sato A, Vedernikov YP, Saade GR, Garfield RE. Influence of progesterone on myometrial contractility in pregnant mice treated with lipopolysaccharide.

J Obstet Gynaecol Res. 2007 Dec;33(6):765-71.

Anwer K, Oberti C, Perez GJ, Perez-Reyes N, McDougall JK, Monga M, Sanborn BM, Stefani E, Toro L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. *Am J Physiol.* 1993 Oct;265(4 Pt 1):C976-85.

Arthur P, Taggart MJ, Zielnik B, Wong S, Mitchell BF. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in the rat during gestation, uterine activation and both term and preterm labour. *J Physiol.* 2008 Dec 15;586(Pt 24):6063-76. Epub 2008 Oct 20.

Bacon CR, Morrison JJ, O'Reilly G, Cameron IT, Davenport AP.

ETA and ETB endothelin receptors in human myometrium characterized by the subtype selective ligands BQ123, BQ3020, FR139317 and PD151242.

J Endocrinol. 1995 Jan;144(1):127-34.

Barrany M. Biochemistry of smooth muscle contraction.

Academic Press, San Diego. USA 269-282

Batra S .Effect of estrogen and progesterone treatment on calcium uptake by the myometrium and smooth muscle of the lower urinary tract.

Eur J Pharmacol. 1986 Aug 7;127(1-2):37-42

Batra S. 1992. Hormonal control of myometrial function

Ben-Chetrit A, Eldar-Geva T, Lindenberg T, Farhat M, Shimonovitz S, Zacut D, Gelber H, Sitruk-Ware R, Spitz IM. Mifepristone does not induce cervical softening in non-pregnant women.Hum Reprod. 2004 Oct;19(10):2372-6.

Epub 2004 Jul 22.

Blanks AM, Zhao ZH, Shmygol A, Bru-Mercier G, Astle S, Thornton S.

Characterization of the molecular and electrophysiological properties of the T-type calcium channel in human myometrium.J Physiol. 2007 Jun 15;581(Pt 3):915-26. Epub 2007 Apr 19.

Boonsri Chanrachakul, F. Broughton Pipkin, A.Y. Warren, S. Arulkumaran, R.N. Khan.Progesterone enhances the tocolytic effect of ritodrine in isolated pregnant human myometrium.Am J. Obstet Gynecol 2005, 192:458-63

Bottari SP, Vokaer A, Kaivez E, Lescrainier JP, Vauquelin G.

Regulation of alpha- and beta-adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium.Acta Physiol Hung. 1985;65(3):335-46.

Bradley KK, Buxton IL, Barber JE, McGaw T, Bradley ME

Nitric oxide relaxes human myometrium by a cGMP-independent mechanism.

Am J Physiol. 1998 Dec;275(6 Pt 1):C1668-73.

Brancazio LR, Murtha AP,Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate . N Engl J Med 2003, 349:1087-1088

Brennand JE, Calder AA.Labor and normal delivery: induction of labor.

Curr Opin Obstet Gynecol. 1991 Dec;3(6):764-8.

Bursztyan L, Eytan O, Jaffa AJ, Elad D. Modeling myometrial smooth muscle contraction. Ann N Y Acad Sci. 2007 Apr;1101:110-38. Epub 2007 Feb 15.

Bygdeman M, Swahn ML, Gemzell-Danielsson K, Svalander P.

Mode of action of RU 486. Ann Med. 1993 Feb;25(1):61-4.

Carbillon L, Seince N, Uzan M. Myometrial maturation and labour.

Ann Med. 2001 Dec;33(9):571-8.

Challis JR, Patel FA, Pomini F. Prostaglandin dehydrogenase and the initiation of labor. J Perinat Med. 1999;27(1):26-34.

Chanrachakul B, Matharoo-Ball B, Turner A, Robinson G, Broughton-Pipkin F, Arulkumaran S, Khan RN. Immunolocalization and protein expression of the alpha subunit of the large-conductance calcium-activated potassium channel in human myometrium. Reproduction. 2003 Jul;126(1):43-8.

Chanrachakul B, Pipkin FB, Khan RN. Contribution of coupling between human myometrial beta2-adrenoreceptor and the BK(Ca) channel to uterine quiescence. Am J Physiol Cell Physiol. 2004 Dec;287(6):C1747-52. Epub 2004 Aug 25.

Chanrachakul B, Pipkin FB, Warren AY, Arulkumaran S, Khan RN.

Progesterone enhances the tocolytic effect of ritodrine in isolated pregnant human myometrium. Am J Obstet Gynecol. 2005 Feb;192(2):458-63.

Csapo A.I, Wiest W.G. An examination of the quantitative relationship between progesterone and the maintenance of pregnancy.

Endocrinology 1969, 85:735-746

Dawn X.Wen, You-Feng Xu, Dale E. Mais, Mark E. Goldman, Donald P. Mc

The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. Mol. Cell. Biol. 1994, 14:8356-8364.

Dogan S, Deepak A. Deshpande, White T.A, Walseth T.F, Kannan M.S.

Regulation of CD38 expression and function by steroid hormones in myometrium. Molecular and Cellular Endocrinology 2006, 246:101-106.

Dogan S, Deshpande DA, White TA, Walseth TF, Kannan MS.

Regulation of CD 38 expression and function by steroid hormones in myometrium. Mol Cell Endocrinol. 2006 Feb 26;246(1-2):101-6. Epub 2006 Jan 4.

Domali E, Asproдини E, Molyvdas PA, Messinis IE. In vitro effects of endothelin-1 on the contractility of myometrium obtained from pre- and postmenopausal women. J Endocrinol. 2001 Jan;168(1):153-62

.Domali E, Molyvdas PA, Messinis IE In vitro responsiveness of human postmenopausal myometrium to endothelin-1 and ovarian steroids.

J Endocrinol Invest. 2005 Jun;28(6):485-93.

Donal J Sexton, Michael W O'Reilly, Anne M Friel, John J Morrison.

Functional effects of 17 alpha- hydroxyprogesterone caproate(17P) on human myometrial contractility in vitro.Reprod Biol and Endocrinol 2004, 2:80

*Egarter CH, Husslein P.*Biochemistry of myometrial contractility.

Baillieres Clin Obstet Gynaecol. 1992 Dec;6(4):755-69.

*Engstrom T, Bratholm P, Christensen NJ, Vilhardt H.*Up-regulation of oxytocin receptors in non-pregnant rat myometrium by isoproterenol: effects of steroids.J Endocrinol. 1999 Jun;161(3):403-11

Erny R, Pigne A, Prouvost C, Gamberre M, Malet C, Serment H, Barrat J.

The effects of oral administration of progesterone for premature labor.

Am J Obstet Gynecol. 1986 Mar;154(3):525-9.

Erulkar SD, Rendt J, Nori RD, Ger B. The influence of 17 beta-oestradiol on K⁺ currents in smooth muscle cells isolated from immature rat uterus.

Proc Biol Sci. 1994 Apr 22;256(1345):59-65.

Fomin VP, Cox BE, Word RA. Effect of progesterone on intracellular Ca²⁺ homeostasis in human myometrial smooth muscle cells. Am J Physiol. 1999 Feb;276(2 Pt 1):C379-85.

Fowden AL, Forhead AJ, Ousey JC. The Endocrinology of equine parturition. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2008 Jul;116(7):393-403.

Fried G, Liu YA, Andersson E. Endothelin contracts human uterine myometrium by a partly dihydropyridine-sensitive mechanism. Acta Physiol Scand. 1993 Jan;147(1):131-6.

Fu X, Backstrom T, Ulmsten U. Progesterone increases cAMP release and accumulation in isolated term human myometrium. Gynecol Obstet Invest 1998, 45:242-6

Fu X, Moberg C, Bäckström T, Ulmsten U. Effects of estradiol and interaction with progesterone or oxytocin on term human myometrial contractile activity. Acta Obstet Gynecol Scand. 1996 Jan;75(1):13-8.

Fu X, Rezapour M, Lofgren M, Ulmsten U, Backstrom T. Unexpected stimulatory effect of progesterone on human myometrial contractile activity in vitro. Obstet Gynecol 1993, 82:23-8

Inoue T, Kanzaki H, Iwai M, Imai K, Narukawa S, Higuchi T, Katsuragawa H, Mori T. Tumor necrosis factor alpha inhibits in-vitro decidualization of human endometrial stroma cells. Hum Reprod 9:2411-7. 1994.

Glasier MA, Hobkirk R Nuclear receptors for progesterone and estradiol in the guinea pig uterine compartment during gestation. Steroids. 1993 Oct;58(10):478-83.

Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg H.H. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. Nature 1998, 392:509-512

Greene MF. Progesterone and preterm delivery- déjà vu all over again. N Engl J Med 2003 348: 2453-2455

Hardy DB, Janowski BA, Corey DR, Mendelson CR. Progesterone receptor plays a major antiinflammatory role in human myometrial cells by antagonism of nuclear factor-kappaB activation of cyclooxygenase 2 expression.

Mol Endocrinol. 2006 Nov;20(11):2724-33. Epub 2006 Jun 13.

Hatthachote P, Gillespie JI. Complex interactions between sex steroids and cytokines in the human pregnant myometrium: evidence for an autocrine signaling system at term. Endocrinology. 1999 Jun;140(6):2533-40.

Hennan JK, Diamond J. Evidence that spontaneous contractile activity in the rat myometrium is not inhibited by NO-mediated increases in tissue levels of cyclic GMP. Br J Pharmacol. 1998 Mar;123(5):959-67.

Hertelendy F, Zakar T. Regulation of myometrial smooth muscle functions. Curr Pharm Des. 2004;10(20):2499-517.

Huszar G. Biology and biochemistry of myometrial contractility and cervical maturation. Semin Perinatol. 1981 Jul;5(3):216-35.

Huszar G, Roberts JM. Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: regulation at the cellular and molecular levels. *Am J Obstet Gynecol.* 1982 Jan 15;142(2):225-37.

Izumi H, Byam-Smith M, Garfield RE. Gestational changes in oxytocin- and endothelin-1-induced contractility of pregnant rat myometrium.

Eur J Pharmacol. 1995 May 24;278(3):187-94

Janicek F, Franova S, Nosalova G, Visnovsky J. In vitro contractile response of human myometrium to oxytocin, PGF₂alpha, bradykinin and ET-1.

Bratisl Lek Listy. 2007;108(4-5):174-8

Jie Zhang, Kendrick A, Quenby S, Wray S. Contractility and calcium signaling of human myometrium are profoundly affected by cholesterol manipulation: implications for labor? *Reprod Sci.* 2007 Jul;14(5):456-66.

Kawarabayashi T, Kishikawa T, Sugimori H. Effects of external calcium, magnesium, and temperature on spontaneous contractions of pregnant human myometrium. *Biol Reprod.* 1989 May;40(5):942-8.

Khan RN, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, Ashford ML. Potassium channels in the human myometrium. *Exp Physiol.* 2001 Mar;86(2):255-64.

Kofinas AD, Rose JC, Koritnik DR, Meis PJ. Progesterone and estradiol concentrations in nonpregnant and pregnant human myometrium. Effect of progesterone and estradiol on cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase activity. *J Reprod. Med* 35: 1045-50. 1990

Kosterin S.A, Burdyga T.V, Fomin V.P, Grover A.K. Mechanisms of Ca²⁺ transport in myometrium. In: control of uterine contractility ed. Garfield and Tabb. Boca Raton 1994 p. 129-154

Kostrzewska A, Laudanski T, Batra S. Effect of calcium and calmodulin antagonists on contractile responses of the human uterine artery.

Br. J. Pharmacol 1988, 94:1037

Kostrzewska A, Laudanski T, Batra S. Effect of ovarian steroids and diethylbestrol on the contractile responses of the human myometrium and intramyometrial arteries. Eur J Pharmacol 1993, 233:127-34

Kurowicka B, Franczak A, Oponowicz A, Kotwica G. In vitro contractile activity of porcine myometrium during luteolysis and early pregnancy: effect of oxytocin and progesterone. Reprod Biol. 2005 Jul;5(2):151-69.

Lechner W, Marth C, Keene F. Calcium antagonists for uterine relaxation.

Gynecol Obstet Invest. 1989;28(3):144-6.

Litorowicz A, Kostrzewska A. The effects of heparin on intrauterine arteries of the human non-pregnant uterus: II. The analysis of the route of action [Ginekol Pol. 1998 Oct;69(10):740-5. Polish.

Lobaccaro-Henri C, Descomps B, Thaler-Dao H. RU 38486 inhibits intracellular calcium mobilization and PGI₂ release from human myometrium: mechanisms of action. J Steroid Biochem Mol Biol. 1996 Sep;59(1):63-73.

Lobaccaro-Henri C, Saintot M, Laffargue F, Zahradnik HP, Descomps B, Thaler-Dao H. Effect of the progesterone antagonist RU486 on human myometrial spontaneous contractility and PGI₂ release. Prostaglandins. 1992 Nov;44(5):443-55.

Longo M, Jain V, Vedernikov YP, Hankins GD, Garfield RE, Saade GR.

Effects of L-type Ca(2+)-channel blockade, K(+)(ATP)-channel opening and nitric oxide on human uterine contractility in relation to gestational age and labour. Mol Hum Reprod. 2003 Mar;9(3):159-64.

López Bernal A. Mechanisms of labour--biochemical aspects.

BJOG. 2003 Apr;110 Suppl 20:39-45.

López Bernal A, Rivera J, Europe-Finner GN, Phaneuf S, Asbóth G. Parturition: activation of stimulatory pathways or loss of uterine quiescence? Adv Exp Med Biol. 1995;395:435-51.

Luckas MJ, Wray S. A comparison of the contractile properties of human myometrium obtained from the upper and lower uterine segments.

BJOG 2000, 107:1309-1311

.Maggi M, Baldi E, Susini T. Hormonal and local regulation of uterine activity during parturition. Part 1- The oxytocin system. J Endocrinol Invest. 1994, 17:739-56

Maggi M, Fantoni G, Peri A, Giannini S, Brandi ML, Orlando C, Serio M.

Steroid modulation of oxytocin/vasopressin receptors in the uterus.

J Steroid Biochem Mol Biol. 1991;40(4-6):481-91.

Maggi M, Magini A, Fiscella A, Giannini S, Fantoni G, Toffoletti F, Massi G, Serio M. Sex steroid modulation of neurohypophysial hormone receptors in human nonpregnant myometrium. J Clin Endocrinol Metab. 1992 Feb;74(2):385-92

Maher E, Bardequez A, Gardner JP, Goldsmith L, Weiss G, Mascarina M, Aviv A. Endothelin- and oxytocin-induced calcium signaling in cultured human myometrial cells. J Clin Invest. 1991 Apr;87(4):1251-8.

Mandi G, Sarkar SN, Mishra SK, Raviprakash V. Effects of calcium channel blocker, mibefradil, and potassium channel opener, pinacidil, on the contractile response of mid-pregnant goat myometrium. Indian J Exp Biol. 2005 Sep;43(9):795-801.

Meis PJ, Klebanoff M, Thom E, Dombrowski MP, Sibai B, Moaward AH, Spong CY, Hauth JC, Miodovnik M, Varner MW, Leveno KJ, Caritis SN, Iams JD, Wapner RJ, Conway D, O'Sullivan MJ, Carpenter M, Mercer B, Ramin SM, Thorp JM, Peaceman AM, Gabbe S.

Prevention of preterm delivery by 17 alpha- hydroxyprogesterone caproate. N Engl J Med 2003, 348:2379-2385

Mesiano S Myometrial progesterone responsiveness.

Semin Reprod Med. 2007 Jan;25(1):5-13.

Mesiano S, Welsh TN. Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. Semin Cell Dev Biol. 2007 Jun;18(3):321-31. Epub 2007 May 18.

Messinis IE, Templeton A. 1990 In-vivo bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor(GnSAF). Clin.Endocrinol(Oxf) 33:213-8

Moawad AH. The in vivo human myometrial response to withdrawal of estrogen and progestins in the nonpregnant state. Am J Obstet Gynecol. 1971 Feb 1;109(3):359-68

Monir-Bishty E, Pierce SJ, Kupittayanant S, Shmygol A, Wray S.

The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and contractility of human myometrium. BJOG. 2003 Dec;110(12):1050-6.

Moore F, Bernal AL. Myosin light chain kinase and the onset of labour in humans. *Exp Physiol.* 2001 Mar;86(2):313-8.

Morrison J.J, Ashford M.L, Khan R.N, Smith S.K, The effect of potassium channel openers on isolated pregnant human myometrium before and after the onset of labour. Potential for tocolysis. *Am. J. Obstet Gynecol* 1993,169:1277-1285

Neulen J, Breckwoldt M. Placental progesterone, prostaglandins and mechanisms leading to initiation of parturition in the human. *Exp Clin Endocrinol* 1994, 102: 195-202

Nisolle M, Gillerot S, Casanas- Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 1999, 14:2844-50.

Noble K, Zhang J, Wray S. Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *J Physiol.* 2006 Jan 1;570(Pt 1):29-35. Epub 2005 Oct 20.

Olson DM, Mijovic JE, Sadowsky DW. Control of human parturition. *Semin Perinatol.* 1995 Feb;19(1):52-63.

Perusquía M. Nongenomic action of steroids in myometrial contractility. *Endocrine.* 2001 Jun;15(1):63-72.

Perusquía M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, Montañó LM. Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a

nongenomic action on L-type calcium channels. Biol Reprod. 2005 Aug;73(2):214-21. Epub 2005 Mar 9.

Popper LD, Batra SC, Akerlund M. The effect of magnesium on calcium uptake and contractility in the human myometrium. Gynecol Obstet Invest. 1989;28(2):78-81.

Price SA, Bernal AL. Uterine quiescence: the role of cyclic AMP. Exp Physiol. 2001 Mar;86(2):265-72.

Putman CD, Brann DW, Kolbeck RC, Mahesh VB.

Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites. Mediation by progesterone and gamma aminobutyric acid receptor systems. Biol Reprod 1991,45:266-272

Ruddock NK, Shi SQ, Jain S, Moore G, Hankins GD, Romero R.

Progesterone, but not 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate, inhibits human myometrial contractions. Am J Obstet Gynecol. 2008 Oct;199(4):391.e1-7.

Sexton DJ, O'Reilly MW, Friel AM, Morrison JJ. Functional effects of 17alpha-hydroxyprogesterone caproate (17P) on human myometrial contractility in vitro. Reprod Biol Endocrinol. 2004 Dec 7;2:80.

Schiff E, Ben-Baruch G, Galron R, Mashiach S, Sokolovsky M

Endothelin-1 receptors in the human myometrium: evidence for different binding properties in post-menopausal as compared to premenopausal and pregnant women. Clin Endocrinol (Oxf). 1993 Mar;38(3):321-4

Shmygol A, Blanks AM, Bru-Mercier G, Gullam JE, Thornton S.

Control of uterine Ca²⁺ by membrane voltage: toward understanding the excitation-contraction coupling in human myometrium. Ann N Y Acad Sci. 2007 Apr;1101:97-109. Epub 2007 Mar 1.

Steer PJ. The endocrinology of parturition in the human.

Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1990 Jun;4(2):333-49

Takayama T. Effects of highly concentrated estrogen and progesterone on the contractile mechanism of the uterine smooth muscle. Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi. 1986 Feb;22(1):43-51.

Takayama T. Effects of prostaglandins on the contractile mechanism, especially on an intracellular Ca store in uterine smooth muscle cells.

Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi. 1986 Feb;22(1):31-42.

Thornton S, Terzidou V, Clark A, Blanks A. Progesterone metabolite and spontaneous myometrial contractions in vitro. Lancet 1999, 353:1327-1329.

Tribe RM. Regulation of human myometrial contractility during pregnancy and labour: are calcium homeostatic pathways important? Exp Physiol. 2001 Mar;86(2):247-54.

Tribe RM, Moriarty P, Dalrymple A, Hassoni AA, Poston L. Interleukin-1beta induces calcium transients and enhances basal and store operated calcium entry in human myometrial smooth muscle. Biol Reprod. 2003 May;68(5):1842-9. Epub 2002 Dec 11.

Viville B, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Wetzka B, Smith SK. Distribution of the A and B forms of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in uterine leiomyomata and adjacent myometrium. Hum Reprod 1997, 12: 815-22

Whittle WL, Holloway AC, Lye SJ, Gibb W, Challis JR Prostaglandin production at the onset of ovine parturition is regulated by both estrogen-independent and estrogen-dependent pathways. *Endocrinology*. 2000 Oct;141(10):3783-91.

Wolff K, Nisell H, Modin A, Lundberg JM, Lunell NO, Lindblom B.

Contractile effects of endothelin 1 and endothelin 3 on myometrium and small intramyometrial arteries of pregnant women at term.*Gynecol Obstet Invest*. 1993;36(3):166-71.

Wray S Insights into the uterus.*Exp Physiol*. 2007 Jul;92(4):621-31. Epub 2007 May 4.

*Wray S, Jones K, Kupittayanant S, Li Y, Matthew A, Monir-Bishty E, Noble K, Pierce SJ, Quenby S, Shmygol AV.*Calcium signaling and uterine contractility.*J Soc Gynecol Investig*. 2003 Jul;10(5):252-64.

*Wray S, Kupittayanant S, Shmygol A, Smith RD, Burdyga T.*The physiological basis of uterine contractility: a short review.*Exp Physiol*. 2001 Mar;86(2):239-46.

*Wray S, Shmygol A.*Role of the calcium store in uterine contractility.

Semin Cell Dev Biol. 2007 Jun;18(3):315-20. Epub 2007 May 18.

Young R Coordination of myometrial contractility.

Front Horm Res. 2001;27:201-15.

*Young RC.*Myocytes, myometrium, and uterine contractions.

Ann N Y Acad Sci. 2007 Apr;1101:72-84. Epub 2007 Apr 18.

Young RC. Tissue-level signaling and control of uterine contractility: the action potential-calcium wave hypothesis. J Soc Gynecol Investig. 2000 May-Jun;7(3):146-52.

Young RC, Zhang P. Inhibition of in vitro contractions of human myometrium by mibefradil, a T-type calcium channel blocker: support for a model using excitation-contraction coupling, and autocrine and paracrine signaling mechanisms. J Soc Gynecol Investig. 2005 May;12(4):e7-12.

Zeitune MG, Bazerque PM. Effects of ovarian hormone treatment on Ca(+2)-induced contractions and Ca(+2) antagonism in the depolarized rat myometrium. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam 1996;46:41-7

Zeng Z, Velarde MC, Simmen FA, Simmen RC. Delayed parturition and altered myometrial progesterone receptor isoform A expression in mice null for Krüppel-like factor 9. Biol Reprod. 2008 Jun;78(6):1029-37. Epub 2008 Feb

27

