

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 ΜΟΥΒΔΑΣ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ 17β-ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ, ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ,
ΤΟΥ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ
ΥΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΗΣΗ.**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΒΕΡΥΚΟΥΚΗ

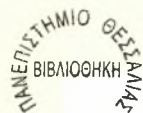
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

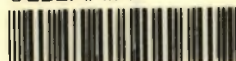
ΛΑΡΙΣΑ 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7970/1
Ημερ. Εισ.: 14-01-2010
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
612.64
ΒΕΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083866

✓

Φορέας χρηματοδότησης:

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ-ΕΠΕΑΕΚ II

«ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ- ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΕΡΕΥΝΑΣ του ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»

ΜΕΤΡΟ 2.2.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΠΡΑΞΗΣ 2.2.3β

Φορέας υλοποίησης:

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ-ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ και

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

«Η επίδραση της 17β - οιστραδιόλης, της προγεστερόνης, του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα και της λεπτίνης στη διαπερατότητα των εμβρυϊκών υμένων στην κύηση.»

MIS 88730

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Καθηγητής Ιωάννης Ε. Μεσσήνης

Διδάκτορας: Χριστίνα Βερκούκη

Προϋπολογισμός έργου: 32.640 ευρώ

Κωδικός Υποέργου: 51711.10

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ - ΠΑΙΔΙΟΥ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ι.Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

☒ **ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

☒ **ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

☒ **ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ**

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

☒ **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ**

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΟΙΤΡΟΠΗ

☉ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

☉ ΠΑΣΧΑΛΗΣ-ΑΔΑΜ ΜΟΛΥΒΔΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

☉ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

☉ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

☉ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΚΑΛΛΙΤΣΑΡΗΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

☉ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

☉ ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΧΑΤΖΗΕΥΘΥΜΙΟΥ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
- Πρόλογος.....	8
- Ευχαριστίες.....	9
• ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
- Εμβρυϊκοί Υμένες.....	12
<i>A. Εμβρυολογική προέλευση.....</i>	12
<i>B. Δομή.....</i>	13
<i>Γ. Αγγείωση.....</i>	16
<i>Δ. Νεύρωση.....</i>	16
<i>E. Ανατομία.....</i>	16
<i>ΣΤ. Λειτουργία και ρόλος των υμένων.....</i>	16
- Αμνιακό Υγρό.....	18
<i>A. Προέλευση του αμνιακού υγρού.....</i>	20
<i>B. Σύσταση του αμνιακού υγρού.....</i>	21
<i>Γ. Διακίνηση του αμνιακού υγρού.....</i>	21
<i>Δ. Διαταραχές του αμνιακού υγρού.....</i>	25
<i>E. Ισχύοντα δεδομένα και παράγοντες, που επηρεάζουν τη διαπερατότητα των εμβρυϊκών υμένων.....</i>	26
- Ussing System.....	28
<i>A. Αντίσταση επιθηλίων.....</i>	28
<i>B. Ussing System και εμβρυϊκοί υμένες.....</i>	30
- Οιστρογόνα- Προγεστερόνη.....	31
<i>A. Τρόπος δράσης των στεροειδών ορμονών.....</i>	34
<i>B. Ο ρόλος των ανταγωνιστών.....</i>	37
- Λεπτίνη.....	38
- Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF).....	40

• ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
- Υλικό και Μέθοδοι.....	46
Α. Συλλογή και προετοιμασία του ιστού.....	46
Β. Πειραματική διαδικασία.....	46
- Στατιστική Επεξεργασία.....	49
• ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
- Διεπιθηλιακή αντίσταση εμβρυϊκών υμένων.....	51
- Επίδραση ορμονών.....	51
• ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	72
• ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	85
• ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	88
• SUMMARY.....	91
• ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πρόλογος

Οι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί υμένες αποτελούνται από δύο πολύστοιβα επιθήλια σε επαφή μεταξύ τους, το άμνιο και το χόριο. Σχηματίζουν το εξώτατο περίβλημα του κυήματος και αποτελούν το ανατομικό όριο ανάμεσα στο μητρικό φθαρτό και το έμβρυο (Hardy et al, 1989). Η σημασία τους κατά την κύηση και τον τοκετό είναι μεγάλη. Ο αμνιακός σάκος τον οποίο σχηματίζουν, περιέχει το αμνιακό υγρό, μέσα στο οποίο αναπτύσσεται και κινείται το έμβρυο. Αν και αρχικά θεωρήθηκε ότι ο ρόλος τους περιοριζόταν μόνο στην ανταλλαγή και μεταφορά ουσιών ανάμεσα στη μητέρα και το έμβρυο, με την πρόοδο της έρευνας βρέθηκε ότι οι υμένες έχουν καίρια σημασία για τη διατήρηση της κύησης και την έναρξη του τοκετού.

Ο ρόλος τους στη διατήρηση του όγκου και της σύστασης του αμνιακού υγρού αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών ετών. Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί οι οποίοι διέπουν την ομοιόσταση του αμνιακού υγρού και η σημασία των υμένων σε αυτή δεν έχει διευκρινισθεί. Αντίθετα, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για το συγκεκριμένο θέμα (Rice et al, 1993). Σε αυτό συμβάλλει το γεγονός ότι υπάρχουν διάφορες οδοί, μέσω των οποίων γίνεται η ανταλλαγή ύδατος και ουσιών και η διαπερατότητα των υμένων μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία κύησης, το μέγεθος και το φορτίο των μεταφερόμενων ουσιών, τη θερμοκρασία και το πάχος των υμένων, καθώς και την απόσταση των υμένων από το όριο του πλακούντα (Brace, 1995, Moore and Word, 1972).

Οι υμένες συμπεριφέρονται ως ένα πορώδες επιθήλιο, το οποίο είναι διαπερατό στο ύδωρ και ημιδιαπερατό στις υπόλοιπες ουσίες (Garby, 1957, Seeds, 1967 και 1973). Η μεταφορά των ουσιών γίνεται διαμέσου της διακυτταρικής και παρακυτταρικής οδού. Αν και η παρακυτταρική οδός είναι η κύρια οδός μεταφοράς, η οποία υπόκειται στους νόμους της παθητικής μεταφοράς, νεότερες μελέτες σε πειραματόζωα υποστηρίζουν τη σημασία της διακυτταρικής μεταφοράς στους υμένες και την επίδραση ορμονών και στις δύο οδούς (Guiet-Bara and Bara , 1983, Hardy et al, 1989).

Κατά την κύηση το ορμονικό προφίλ της γυναίκας μεταβάλλεται. Τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών αυξάνονται στη μητρική κυκλοφορία, παραγόμενα από τον πλακούντα, ο οποίος αποτελεί πηγή πολλών ορμονών. Οι υμένες είναι ικανοί να παράγουν και να μεταβολίζουν μεγάλο αριθμό ουσιών, ενώ περιέχουν διάφορους ορμονικούς υποδοχείς και συμπεριφέρονται ως «ενδοκρινή όργανα» (Petraglia et al, 1996).

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να μελετήσει την επίδραση ορμονικών παραγόντων της κύσεως στη διεπιθηλιακή αντίσταση των ανθρώπινων εμβρυϊκών υμένων. Οι ουσίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν η 17β-οιστραδιόλη και ο ανταγωνιστής της ταμοξιφαίνης, η προγεστερόνη και ο ανταγωνιστής της μifeπριστόνης, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και η λεπτίνη. Η επίδραση των παραπάνω ουσιών έγινε με τη βοήθεια του Ussing System. Μεταβολές στην ηλεκτρική αντίσταση αντικατοπτρίζουν αλλαγές στη διαπερατότητα των υμένων. Το παρόν πειραματικό μοντέλο και η μέτρηση της R_{TE} πραγματοποιήθηκαν για πρώτη φορά σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς υμένες.

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι ιστοί για την πραγματοποίηση των πειραμάτων προέρχονταν από τη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Για την ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη που μου ανέθεσε το θέμα αυτής της διατριβής καθώς και για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και επισημάνσεις του, τον πολύτιμο χρόνο, την υπομονή και τη στήριξη την οποία μου έδειξε, ώστε κατέστη εφικτή η πραγματοποίηση του συγκεκριμένου ερευνητικού πρωτοκόλλου. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Πνευμονολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη

και τον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Πασχάλη-Αδάμ Μολυβδά για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή της διδακτορικής διατριβής μου, τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και τη συμπαράσταση την οποία μου επέδειξαν σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα Φυσιολογίας κ. Χρύσα Χατζόγλου για την πολύτιμη βοήθεια της στην οργάνωση της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής: τον κ. Νικόλαο Σακελλαρίδη Καθηγητή Φαρμακολογίας, τον κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας, τον κ. Γεώργιο Κουκούλη, Επίκουρο Καθηγητή Ενδοκρινολογίας και την κ. Αποστολία Χατζηευθυμίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήταν παράληψη μου να μην ευχαριστήσω το προσωπικό του Μαιευτηρίου της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και ιδιαίτερα την Προϊσταμένη Μαία κ. Αναστασία Πουρνάρα για τη βοήθεια τους στη συλλογή των εμβρυϊκών υμένων. Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Μακαντάση, τεχνικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας για την τεχνική υποστήριξή του. Ευχαριστώ ακόμη, τις κυρίες Σοφία Καρυώτου, Γεωργία Κόκκα και Βασιλική Νούτσου για την γραμματιακή υποστήριξη και την πολύπλευρη συμπαράσταση τους. Τέλος, η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν θα ολοκληρωνόταν χωρίς την αμέριστη βοήθεια, υποστήριξη, υπομονή και αγάπη πρωτίστως του συζύγου μου Απόστολου Ζαβού, των παιδιών μου Γιάννη και Αλεξίας και των γονέων μου Γιάννη και Φιλιώς. Τους ευχαριστώ.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εμβρυϊκοί Υμένες

Οι εμβρυϊκοί υμένες αποτελούν το εξώτατο περίβλημα του κυήματος και έρχονται σε επαφή με το φθαυτό. Σχηματίζουν τον αμνιακό σάκο και αποτελούνται από το άμνιο προς την πλευρά του εμβρύου, και το χόριο προς τη πλευρά της μήτρας (Bourne 1960 και 1966, Cunningham et al, 2005).

A. Εμβρυολογική προέλευση

Το άμνιο και το χόριο είναι δύο διαφορετικά επιθήλια, τα οποία βρίσκονται σε πλήρη επαφή μεταξύ τους.

■ Άμνιο :

Τα κύτταρα, από τα οποία θα προκύψει το αμνιακό επιθήλιο, εμφανίζονται 7 ½ μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Κατά τη διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης, η εσωτερική μάζα κυττάρων σχηματίζει τον εμβρυϊκό δίσκο, ο οποίος διαφοροποιείται στο αρχέγονο εξώδερμα και ενδόδερμα. Τότε, εμφανίζονται μερικά μικρά κύτταρα (από το εξώδερμα) ανάμεσα στον εμβρυϊκό δίσκο και την τροφοβλάστη, τα οποία περικλείουν ένα χώρο που θα αποτελέσει στη συνέχεια την αμνιακή κοιλότητα στη ραχιαία επιφάνεια του εμβρύου. Τα κύτταρα αυτά λέγονται αμνιογενετικά κύτταρα.

■ Χόριο:

Το χόριο αποτελείται εξωτερικά από τα κύτταρα της τροφοβλάστης και εσωτερικά από το μεσέγγυμα. Προς την πλευρά του βασικού φθατού το χόριο συμμετέχει στο σχηματισμό του πλακούντα με τις χοριακές λάχνες και αποτελεί το εμβρυϊκό μέρος του πλακούντα (chorion frondosum). Το υπόλοιπο χόριο προς τη πλευρά της μητρικής κοιλότητας (smooth chorion ή chorion laeve), καθώς το κύημα μεγαλώνει, χάνει σιγά-σιγά την παροχή αίματος και τις λάχνες και γίνεται μια ανάγγεια μεμβράνη σε επαφή με το θυλακοειδή και στη συνέχεια με το γνήσιο φθατό, το οποίο αναπτύσσεται σε ένα περιβάλλον με χαμηλό οξυγόνο.

Αρχικά, ανάμεσα στο χόριο και στο άμνιο υπάρχει η χοριακή κοιλότητα. Στο τέλος του τρίτου μήνα η αμνιακή κοιλότητα έχει αναπτυχθεί τόσο πολύ, που

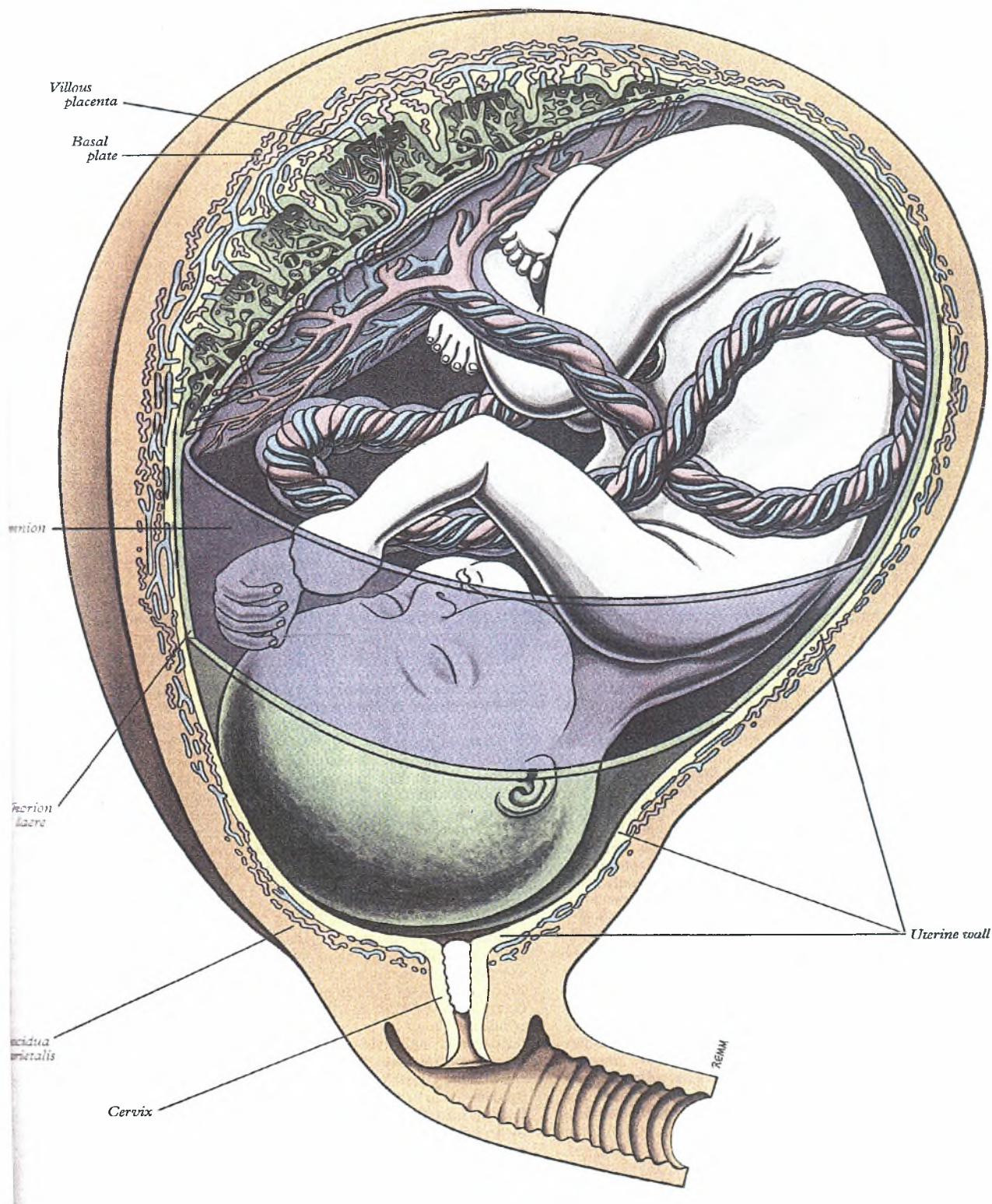
αποφράσσει τη χοριακή και το άμνιο έρχεται σε επαφή με το χόριο (Jauniaux and Guilbis , 2000) (Σχήμα 1).

B. Δομή

■ Άμνιο:

Το άμνιο φυσιολογικών τελειόμηνων κυήσεων έχει πάχος 0.02-0.5 mm. Αποτελείται από πέντε στοιβάδες, οι οποίες από μέσα προς τα έξω είναι:

- 1) Αμνιακό επιθήλιο. Αποτελείται από μία στοιβάδα κυβοειδών, επιθηλιακών, μονοπύρηνων κυττάρων, τα οποία καλύπτονται από πολλές μικρολάχνες. Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός δικτύου ενδοκυττάρων καναλιών, τα οποία φτάνουν μέχρι το κυτταρικό τοίχωμα, ενώ υπάρχουν και μεσοκυττάρια κανάλια, τα οποία συνδέονται με τα ενδοκυττάρια κανάλια.
- 2) Βασική μεμβράνη. Είναι ένα λεπτό στρώμα συνδετικού ιστού, πάνω στο οποίο είναι προσκολλημένα τα επιθηλιακά κύτταρα.
- 3) Συμπαγής στοιβάδα. Η ισχυρότερη στοιβάδα, συμπαγής, στερεά, πυκνή, αποτελούμενη από δικτυωτές ίνες, χωρίς κύτταρα. Μερικές φορές σε αυτή τη στοιβάδα μπορεί να ανευρεθούν λευκοκύτταρα.
- 4) Ινοβλαστική στοιβάδα. Είναι η παχύτερη στοιβάδα και αποτελείται από ινοβλάστες, προερχόμενους από το εμβρυϊκό μεσόδερμα, διάσπαρτους μέσα σε δικτυωτή ουσία. Τα κύτταρα αυτά μερικές φορές εμφανίζουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες.
- 5) Σπογγώδης στοιβάδα. Είναι μια ακυτταρική ζώνη, προερχόμενη από τη χοριακή κοιλότητα, αποτελούμενη από ινώδη ιστό, μέσα σε βλεννίνη. Βρίσκεται ανάμεσα στο άμνιο και το χόριο. Μέσα σε αυτή τη στοιβάδα είναι πιθανό να υπάρχουν μεμονωμένοι ινοβλάστες. Μερικές φορές αυτό το στρώμα γίνεται οίδηματώδες και σε αυτό οφείλεται η αύξηση του πάχους του αμνίου. Επίσης, η ζώνη αυτή επιτρέπει στο άμνιο να ολισθαίνει πάνω στο χόριο.



Σχήμα 1: Εμβρυϊκοί υμένες (προσαρμογή κατά Williams et al, 1995)

■ Χόριο:

Το χόριο είναι γενικά πιο διάφανο από το άμνιο και το πάχος του μπορεί να φτάσει το 1 mm. Αποτελείται από τέσσερις στοιβάδες, οι οποίες από μέσα προς τα έξω είναι:

- 1) Κυτταρική στοιβάδα. Είναι μια λεπτή στοιβάδα αποτελούμενη από ένα δίκτυο ινοβλαστών. Υπάρχει μόνο στα αρχικά στάδια της κύησης και εξαφανίζεται προς το τέλος.
- 2) Δικτυωτή στοιβάδα. Η πιο πεπαχυσμένη στοιβάδα του χορίου, η οποία αποτελείται από δικτυωτές ίνες παράλληλα διατεταγμένες. Λίγοι ινοβλάστες, καθώς και κύτταρα Hofbauer, υπάρχουν διασκορπισμένοι μέσα σε αυτή τη στοιβάδα.
- 3) Ψευδοβασική μεμβράνη. Αποτελεί τη βασική μεμβράνη της τροφοβλάστης. Είναι ένα στρώμα συνδετικού ιστού σε επαφή με τη δικτυωτή στοιβάδα, από το οποίο μικρές προεκβολές κατευθύνονται προς τη τροφοβλάστη.
- 4) Τροφοβλάστη. Το τελευταίο στρώμα του χορίου αποτελείται από δυο έως δέκα κυτταρικές στοιβάδες και έρχεται σε επαφή με το μητρικό φθαρτό. Μέσα σε αυτό υπάρχουν οι υποστραφείσες χοριακές λάχνες.

■ Κύτταρα Hofbauer

Τα κύτταρα αυτά περιγράφηκαν αρχικά από τον Hofbauer στον πλακούντα το 1905. Είναι μονοπύρηνα μακροφάγα, έχουν διάμετρο 15-35 μ και το κυτταρορόπλασμα τους είναι αφρώδες, με κενοτόπια. Ο πυρήνας τους είναι έκκεντρος, με νεφροειδές σχήμα. Το σχήμα των κυττάρων είναι σφαιρικό ή ωοειδές, ενώ μπορεί να έχουν και ψευδοπόδια. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται στην ινοβλαστική και στη σπογγώδη στοιβάδα του αμνίου και στη δικτυωτή στοιβάδα του χορίου. Ο αριθμός των μακροφάγων αυτών κυττάρων αυξάνει, καθώς και το στάδιο ωρίμανσης τους με την πρόοδο της κύησης. Ο κύριος ρόλος τους είναι η φαγοκυττάρωση, ενώ παράγουν κυτοκίνες και ασκούν παρακρινή δράση

ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των κυττάρων της τροφοβλάστης (Cervar et al, 1999).

Γ. Αγγείωση

Οι εμβρυϊκοί υμένες δεν αιματώνονται. Τα μόνα αγγεία, που υπάρχουν στα αρχικά στάδια της κύησης μέσα στη δικτυωτή στοιβάδα του χορίου, προέρχονται από τα ομφαλικά αγγεία στην περιφέρεια του πλακούντα, τα οποία όμως δεν παρέχουν αίμα στους υμένες. Τα αγγεία αυτά καθώς εξελίσσεται η κύηση ατροφούν και εξαφανίζονται. Επίσης, δεν υπάρχουν λεμφαγγεία στους υμένες.

Δ. Νεύρωση

Δεν περιγράφεται.

Ε. Ανατομία

Το χόριο διακρίνεται στο λαχνωτό χόριο (chorion frondosum), το οποίο συμμετέχει στο σχηματισμό του πλακούντα και στο λείο χόριο (smooth chorion ή chorion laeve), το οποίο είναι το εξωτερικό περίβλημα του αμνιακού σάκου.

Το άμνιο με τη σειρά του μπορεί να χωριστεί 1) στο τμήμα εκείνο, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με το λείο χόριο (reflected amnion), 2) στο πλακουντιακό άμνιο, που καλύπτει την εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα και 3) στο ομφαλικό άμνιο, το οποίο περικλείει τον ομφάλιο λώρο.

ΣΤ. Λειτουργία και ρόλος των υμένων

Οι υμένες σχηματίζουν τον αμνιακό σάκο, ο οποίος περιέχει το αμνιακό υγρό, μέσα στο οποίο «κολυμπάει» και κινείται το έμβρυο. Ο ρόλος των υμένων

όμως, δεν περιορίζεται μόνο σε αυτό. Στην αρχή του σχηματισμού της αμνιακής κοιλότητας το αμνιακό επιθήλιο είναι η κύρια πηγή του αμνιακού υγρού, ενώ κατά τη διάρκεια του πρώτου τρίμηνου, όπου το αμνιακό υγρό αποτελεί υπερδιήθημα του μητρικού πλάσματος, οι υμένες ρυθμίζουν τον όγκο και τη σύσταση του αμνιακού υγρού, καθορίζοντας τη μεταφορά ουσιών ανάμεσα στο έμβρυο και τη μητέρα (Brace, 1995).

Η ακεραιότητα των υμένων είναι σημαντική για τη διατήρηση της κύησης. Η πρόωρη ρήξη των υμένων (<37 εβδομάδες) εμφανίζεται στο 1% των κυήσεων και το γεγονός αυτό συνοδεύεται από ένα ποσοστό 30-40% πρόωρου τοκετού (Bryant-Greenwood et al, 2000). Επίσης, οι υμένες συμμετέχουν στην έναρξη του τοκετού, συμβάλλοντας στο σχηματισμό του θυλακίου, το οποίο συμμετέχει στη διαστολή του τραχήλου.

Μια άλλη λειτουργία των υμένων είναι η αποθήκευση και η έκκριση αμινοξέων (άμνιο). Εκτός από τα αμινοξέα, στους υμένες υπάρχει πληθώρα άλλων ουσιών. Στον τροφοβλαστικό ιστό ανιχνεύθηκαν υψηλά επίπεδα αγγειοτενσίνης II και των υποδοχέων της, πλακουντιακού γαλακτογόνου, προγεστερόνης και οιστραδιόλης. Οιστραδιόλη υπάρχει στο χόριο σε υψηλότερα επίπεδα από ότι στο άμνιο (Kalenga et al, 1991). Μελέτες έδειξαν ότι οι υμένες περιέχουν πάνω από 600 κυτοκίνες, υποδοχείς ορμονών, διάφορα γονίδια (Bryant-Greenwood et al, 2000), ρενίνη, αγγειοτενσινογόνο κ.α. (Lenz et al, 1989).

Οι υμένες αποτελούν ιστό στόχο για διάφορες ορμόνες όπως η ρηλαξίνη, καθώς περιέχουν ειδικούς υποδοχείς (Koay et al, 1986). Η σύνδεση με την ορμόνη αυτή οδηγεί στην έκκριση και παραγωγή διαφόρων ενζύμων και πρωτεϊνών από τους υμένες, όπως οι μεταλοπρωτεϊνάσες (MMP) και ο αναστολέας σύνθεσης τους TIMP-1 (Bryant-Greenwood et al, 2000). Οι υμένες επίσης, αποτελούν ιστό-στόχο για το πλασμινογόνο, τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και την ανεξίνη 2, περιέχοντας τους υποδοχείς τους (Bogic et al, 1999).

Οι ίδιοι οι υμένες έχουν την ικανότητα να παράγουν διάφορες ουσίες. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι τελειόμηνοι υμένες έχουν τη δυνατότητα και τα ένζυμα

εκείνα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη βιοσύνθεση χοληστερόλης (Loganath et al, 2000), ρενίνης (Cooke et al, 1985), αραχιδονικού οξέος και προσταγλαδινών (Collins et al, 1992, Tyson et al, 1985) καθώς και του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF- α) (Zicari et al, 2002), ωκυτοκίνης (άμνιο, χόριο) (Chibbar et al, 1995) και CRH (Jones and Challis, 1990). Άλλα γονίδια που εκφράζονται στους υμένες είναι διαφόρων αγγειογενετικών (endothelin 2 και 3, VEGF και VEGF-B) και νευροτροφικών παραγόντων (ephrin A2, ephrin receptors -A2, -B1, -B3, -B4 και -B5, neuripilin 2, semaphoring F), πολλά από τα οποία μεταβάλλουν την έκφραση τους κατά την έναρξη του τοκετού (Marvin et al, 2002).

Με τον τρόπο αυτό, οι υμένες δρουν ως ενδοκρινή όργανα, παράγοντας ουσίες οι οποίες παίζουν ρόλο στην τοπική έκκριση άλλων ουσιών, στην εμφύτευση, στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων του κυήματος, στη συστατικότητα της μήτρας και στην έναρξη του τοκετού, δρώντας αυτοκρινώς, παρακρινώς και ενδοκρινώς (Petraglia et al, 1996).

Τέλος, το άμνιο χρησιμοποιείται στην οφθαλμολογία σε περιπτώσεις σοβαρών εγκαυμάτων του κερατοειδούς κατά την οξεία φάση, όπου γίνεται μεταμόσχευση αμνίου (Zhou et al, 2004).

Αμνιακό Υγρό

Το αμνιακό υγρό περικλείεται μέσα στον αμνιακό σάκο και επιτελεί σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του κυήματος και τη διεξαγωγή του τοκετού (Cunningham et al, 2005, Μεσσήνης, 2005).

Από το 1852, ο Charles Meigs αναφέρθηκε στο ρόλο του αμνιακού υγρού. Συγκεκριμένα:

1. Προστατεύει το έμβρυο από τους κραδασμούς και τα χτυπήματα, που μπορεί να υποστεί η μητέρα και ιδιαίτερα η μήτρα. Παράλληλα, διατηρεί σταθερή τη θερμοκρασία μέσα στο ενδομήτριο περιβάλλον.

2. Επιτρέπει στο έμβρυο να κινείται, ενεργητικά και παθητικά μέσα στη μήτρα και επιδρά στη μυοσκελετική του ανάπτυξη.
3. Αποτρέπει την προσκόλληση του εμβρύου στους πέριξ ιστούς και τη δημιουργία συμφύσεων. Σε περίπτωση διαφυγής αμνιακού υγρού στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης, μπορεί να προκύψουν μορφολογικές ανωμαλίες του εμβρύου, όπως δυσμορφία του προσώπου και των άκρων και ελλείμματα του κοιλιακού τοιχώματος, ως αποτέλεσμα της συμπίεσης που ασκεί σε αυτό η μήτρα.
4. Διατηρεί τη μήτρα διατεταμένη, τους υμένες σε απόσταση και ασκεί ήπια πίεση πάνω στον ομφάλιο λώρο και το έμβρυο.
5. Έχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των πνευμόνων και του γαστρεντερικού συστήματος του εμβρύου. Το αμνιακό υγρό γεμίζει το αναπνευστικό σύστημα και επιτρέπει την εκτέλεση αναπνευστικών κινήσεων. Σε περίπτωση ολιγάμνιου, εμφανίζεται υποπλασία των πνευμόνων.
6. Περιέχει βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες ουσίες, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο το έμβρυο από λοιμώξεις.
7. Συμμετέχει στην εμβρυϊκή βιοχημική ομοίωση, ενώ παρέχει θρεπτικές ουσίες και διάφορους αυξητικούς παράγοντες (epidermal growth factor, EGF-like growth factor, transforming growth factor-β) στο έμβρυο.
8. Επιτρέπει το σχηματισμό του θυλακίου, το οποίο συντελεί, ασκώντας πίεση, στην εξέλιξη της διαστολής.
9. Μετά τη ρήξη των υμένων, δρα ως λιπαντικό των γεννητικών οργάνων και βοηθάει στην έξοδο της κεφαλής του νεογνού.
10. Βοηθάει στους μαιευτικούς χειρισμούς, όταν αυτοί είναι απαραίτητοι.
11. Η λήψη αμνιακού υγρού με την αμνιοπαρακέντηση επιτρέπει την εκτέλεση σημαντικών εξετάσεων. Ο έλεγχος του καρυότυπου του εμβρύου, η ύπαρξη λοίμωξης (χοριοαμνιονίτιδα), η

μέτρηση της χολερυθρίνης και των φωσφωλιπιδίων είναι κάποιες από τις εξετάσεις αυτές .

A. Προέλευση του αμνιακού υγρού

Κατά τον αρχικό σχηματισμό της αμνιακής κοιλότητας το αμνιακό υγρό εκκρίνεται από τα κύτταρα του αμνιακού επιθηλίου, τα οποία έχουν εκκριτικές ικανότητες. Με την πρόοδο της κύησης το επιθήλιο χάνει την ικανότητα έκκρισης, ενώ εμφανίζονται και οι υπόλοιπες στοιβάδες των υμένων.

Στη συνέχεια, η σύνθεση του αμνιακού υγρού είναι παρόμοια με αυτή του μητρικού πλάσματος και αποτελεί ένα μητρικό υπερδιήθημα μέσω των υμένων (Brace, 1995). Από την αρχή του δευτέρου τριμήνου και μετά, το έμβρυο συμμετέχει στο σχηματισμό του αμνιακού υγρού, μέσω διαχύσεως του εμβρυϊκού πλάσματος διαμέσου του εμβρυϊκού δέρματος, του πλακούντα και του ομφαλίου λώρου. Από την 20^η εβδομάδα και μετά όμως, αρχίζει η κερατινοποίηση του δέρματος του εμβρύου, οπότε μειώνεται σε πολύ μικρό βαθμό η διάχυση. Το αμνιακό υγρό από το σημείο αυτό μέχρι το τέλος της κύησης αποτελείται κυρίως από τα ούρα του εμβρύου. Οι εμβρυϊκοί νεφροί αρχίζουν να λειτουργούν από τη 12^η εβδομάδα και έως τη 18^η παράγουν 7-14 ml ούρα την ημέρα. Από το σημείο αυτό και μετά, η ποσότητα των αποβαλλόμενων ούρων αυξάνει συνεχώς, με αποτέλεσμα τα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης να ανεβαίνουν παράλληλα στο αμνιακό υγρό, ενώ η υδροστατική και η ωσμωτική πίεση ελαττώνονται.

Ο αναπνευστικός σωλήνας αποτελεί μια ακόμα πηγή του αμνιακού υγρού. Εκκρίσεις του στόματος, των σιελογόνων αδένων, της τραχείας και των πνευμόνων συνεισφέρουν κατά ένα μέρος στο αμνιακό υγρό. Η προοδευτική αύξηση των επιπέδων λεκιθίνης στο αμνιακό υγρό δείχνει τη συμμετοχή του αναπνευστικού συστήματος και προς το τέλος της κύησης τον βαθμό ωριμότητας του (Brace, 1997).

B. Σύσταση του αμνιακού υγρού

Το αμνιακό υγρό αποτελείται κατά 98-99% από ύδωρ και 1-2% από οργανικά και ανόργανα στοιχεία. Τα οργανικά στοιχεία είναι πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, λίπη και φωσφολιπίδια, ορμόνες, ένζυμα, βιταμίνες κ.α. Όσον αφορά στις πρωτεΐνες, παρατηρείται σταδιακή αύξηση τους από την 12^η έως την 24^η εβδομάδα και μετά ακολουθεί σταδιακή μείωση από την 30^η έως την 40^η εβδομάδα.

Οι ανόργανες ουσίες είναι ηλεκτρολύτες, όπως νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, φωσφόρος και σίδηρος (Μεσσήνης, 2005). Στο πρώτο μισό της κύησης το νάτριο και το χλώριο βρίσκονται σε επίπεδα σχεδόν όμοια με τα επίπεδα στον εμβρυϊκό ορό, ενώ αργότερα μειώνονται. Αντίθετα, η συγκέντρωση του καλίου παραμένει σταθερή. Η ουρία και η κρεατινίνη υπάρχουν σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από ότι στον ορό της μητέρας και αυξάνονται συνεχώς με την πρόοδο της κύησης (αντικατοπτρίζοντας την ωρίμανση της εμβρυϊκής νεφρικής λειτουργίας). Η χολερυθρίνη (έμμεση), επίσης ανευρίσκεται στο αμνιακό υγρό και η μέτρηση της έχει σημασία σε Rhesus ευαισθητοποιημένες γυναίκες. Τέλος, μέσα στο αμνιακό υγρό υπάρχουν στοιχεία που προέρχονται από την αποφολίδωση εμβρυϊκών κυττάρων, χνούδι και τρίχες της κεφαλής του εμβρύου, ακόμη και σμήγμα.

Η σύνθεση και ο όγκος του αμνιακού υγρού μεταβάλλονται καθώς εξελίσσεται η κύηση. Το αμνιακό υγρό στο πρώτο τρίμηνο είναι ισότονο με το εμβρυϊκό πλάσμα, ενώ όσο η κύηση προχωρά γίνεται υπότονο σε σχέση με το εμβρυϊκό και το μητρικό πλάσμα. Έτσι, η ωσμωτικότητα του την 11^η εβδομάδα είναι 280 mOsm/kg H₂O, ενώ την 25^η 276 mOsm/kg H₂O (Modena and Fieni, 2004).

Γ. Διακίνηση του αμνιακού υγρού

Φυσιολογικά ο όγκος του αμνιακού υγρού αυξάνεται έως την 36^η εβδομάδα της κύησης, φτάνοντας το 1 λίτρο. Κατόπιν, αρχίζει βαθμιαία να

ελαττώνεται, έτσι ώστε την 40-41^η εβδομάδα ο όγκος του να είναι περίπου 800 ml. Μελέτες έχουν δείξει ότι έως την 8^η εβδομάδα αυξάνει κατά 10 ml την εβδομάδα (Cunningham et al, 2005) και έως το τέλος του πρώτου τρίμηνου κατά 25 ml την εβδομάδα. Τη 14^η εβδομάδα είναι περίπου 100 ml, τη 16^η 200 ml, την 20^η ανέρχεται στα 400 ml και την 25^η με 26^η στα 600 ml.

Το αμνιακό υγρό αντικαθίσταται εξ ολοκλήρου μέσα σε τρεις ώρες και ο φυσιολογικός χρόνος ημισείας ζωής του ύδατος στο αμνιακό υγρό έχει εκτιμηθεί στα 90 λεπτά. Απομακρύνεται με την κατάποση από το έμβρυο και την απορρόφηση του μέσω των υμένων. Ο καταπινόμενος όγκος καθώς και ο απορροφώμενος μέσω των μεμβρανών αυξάνει γραμμικά έως την 28-30^η εβδομάδα. Από εκεί και πέρα, ο καταπινόμενος όγκος αυξάνει εκθετικά, φτάνοντας το μέγιστο τη 40^η εβδομάδα που είναι 1006 ml την ημέρα, ενώ η απορρόφηση μέσω των υμένων συνεχίζει να αυξάνει γραμμικά έως 393 ml την ημέρα (Mann et al, 1996).

■ *Οδοί διακίνησης του αμνιακού υγρού*

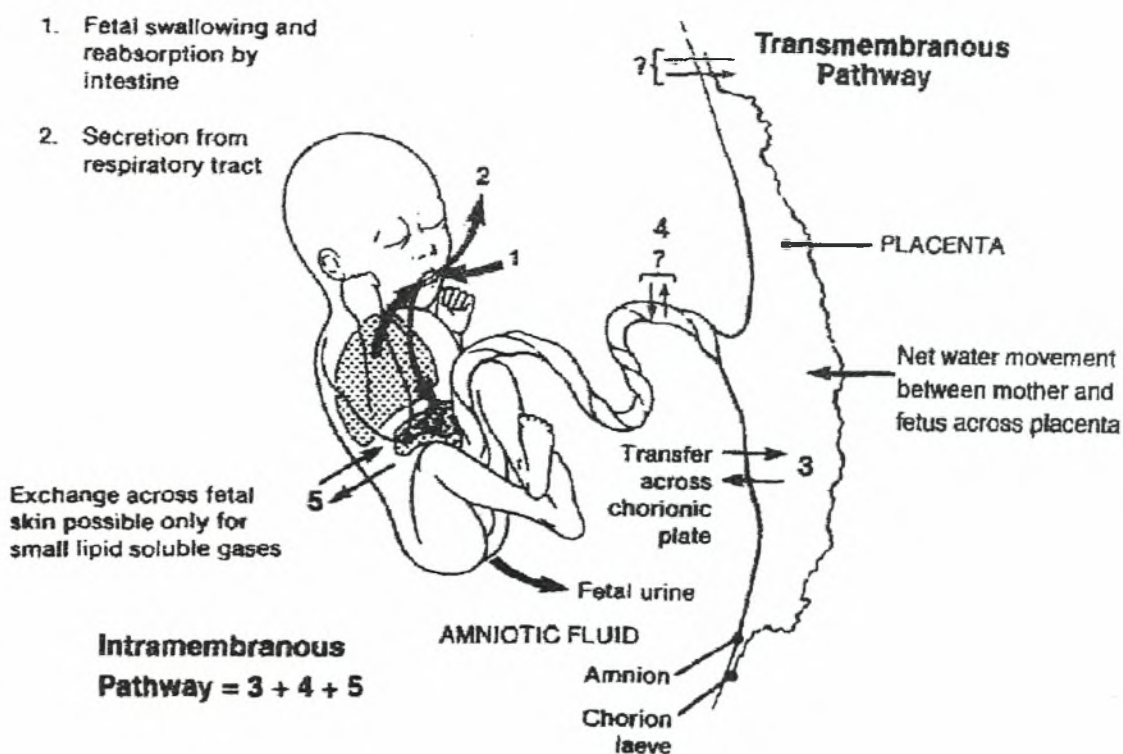
Οι μηχανισμοί, οι οποίοι ρυθμίζουν τον όγκο και τη σύσταση του αμνιακού υγρού, δεν έχουν αποσαφηνισθεί πλήρως. Οι εμβρυϊκοί υμένες συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία, επηρεάζοντας με την διαπερατότητα τους τη διακίνηση των μεταφερόμενων ουσιών και του συνοδού ύδατος. Η διακίνηση υγρών και ουσιών διαμέσου των υμένων ακολουθεί δύο οδούς μεταφοράς:

α. Διαμεμβρανική οδός-1 (transmembranous pathway): αναφέρεται στην ανταλλαγή υγρών και ουσιών ανάμεσα στο αμνιακό υγρό και στο μητρικό πλάσμα διαμέσου των υμένων και του τοιχώματος της μήτρας.

β. Διαμεμβρανική οδός-2 (intramembranous pathway): αναφέρεται σε απευθείας ανταλλαγή ανάμεσα στο αμνιακό υγρό και το εμβρυϊκό πλάσμα. Πραγματοποιείται κυρίως διαμέσου της εμβρυϊκής επιφάνειας του πλακούντα και των υμένων που την καλύπτουν προς τα εμβρυϊκά αγγεία των πλακουντιακών λαχνών, τα οποία καταλήγουν στα ομφαλικά αγγεία. Επίσης, αυτός ο τρόπος

αφορά και την ανταλλαγή διαμέσου του εμβρυϊκού δέρματος και της ομφαλίδος (Σχήμα 2).

Η συνεισφορά της κάθε οδού στη διακίνηση του αμνιακού υγρού εξαρτάται κυρίως, από την ηλικία της κύησης. Η διαμεμβρανική οδός-1 είναι η κύρια οδός μεταφοράς στο πρώτο τρίμηνο, ενώ η διαμεμβρανική οδός-2 στο δεύτερο μισό της κύησης (Brace, 1995). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με το ποια ακριβώς οδό ακολουθεί η κίνηση ύδατος και διαλυτών μεταξύ των διαφόρων μελετητών.



Σχήμα 2: Οι οδοί διακίνησης του αμνιακού υγρού από και προς την αμνιακή κοιλότητα (προσαρμοσμένο κατά Brace, 1995).

Σε κυτταρικό επίπεδο, η μεταφορά ουσιών διαμέσου επιθηλίων μπορεί να συμβεί είτε μέσω των κυττάρων (διακυτταρική οδός-transcellular route), είτε μέσω των μεσοκυττάρων διαστημάτων (παρακυτταρική οδός-paracellular route). Η οδός μέσω των κυττάρων εξαρτάται από τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ η οδός από τα μεσοκυττάρια διαστήματα από τις συνδέσεις των κυττάρων και την

αντίσταση των πλάγιων χώρων (Gorodeski, 2001). Στους ανθρώπινους υμένες, εκτός από αυτές τις δύο οδούς, υπάρχει και μια τρίτη, η οποία οφείλεται σε νεκρά κύτταρα και οπές, που σχηματίζονται κατά τη διάταση των υμένων (leaky path-artifactual path) (Porta et al, 1989).

1. Διακυτταρική οδός μεταφοράς

Η κυτταρική μεμβράνη ξεχωρίζει τον ενδοκυττάριο από τον εξωκυττάριο χώρο, λειτουργώντας ως φραγμός και ρυθμίζοντας με τη διαπερατότητα της την είσοδο και έξοδο ουσιών από και προς το κύτταρο, έτσι ώστε το κυτταρόπλασμα να έχει διαφορετική σύσταση από τον εξωκυττάριο χώρο. Αποτελείται από μια λιπιδιακή διπλοστοιβάδα, μέσα στην οποία υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες. Η μεταφορά ουσιών μέσω των κυττάρων γίνεται με δύο τρόπους:

-Διάχυση ή παθητική μεταφορά. Είναι η τυχαία διακίνηση ουσιών, η οποία επιτελείται με μόνη κινητήρια δύναμη την κινητική ενέργεια των μορίων, λόγω υδροστατικών ή/και ωσμωτικών διαφορών ή κλίσης ιόντων.

-Ενεργητική μεταφορά. Απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και μπορεί να πραγματοποιηθεί αντίθετα προς το ενεργειακό πρηνές, όπως από χαμηλή συγκέντρωσή σε υψηλή συγκέντρωση. Η ύπαρξη πρωτεΐνης φορέα είναι απαραίτητη ή μπορεί να γίνει με το σχηματισμό κυστιδίων. Στο ανθρώπινο άμνιο έχουν βρεθεί κυστίδια στο επιθήλιο, πιθανόν πινοκυτοτοικοί αγωγοί, τα οποία μπορούν να απορροφούν και να εκκρίνουν αμνιακό υγρό (Schmidt et al, 1982, Cheng, 2004).

2. Παρακυτταρική οδός μεταφοράς

Η διακίνηση ουσιών ανάμεσα από τα κύτταρα εξαρτάται από τον τύπο σύνδεσης των κυττάρων μεταξύ τους. Τα κύτταρα μπορεί να συνδέονται στενά με αποφρακτικές συνδέσεις (tight junctions) και δεσμοσώματα ή με χασματικές συνδέσεις (gap junctions). Στους ανθρώπινους υμένες υπάρχουν και οι τρεις τύποι συνδέσεων (Wang and Schneider, 1983).

Επειδή η αντίσταση της κυτταρικής μεμβράνης είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίσταση της παρακυτταρικής οδού, η διαπερατότητα των επιθηλίων καθορίζεται κυρίως από την τελευταία (Gorodeski, 2001). Αν και παλαιότερα η μεταφορά ουσιών διαμέσου της παρακυτταρικής οδού θεωρούνταν ότι ήταν μόνο

παθητική, νεώτερες μελέτες προβάλλουν το μοντέλο της ενεργητικής μεταφοράς παρακυτταρίως (Porta et al, 1989, Gorodeski, 1998 και 2001).

Δ. Διαταραχές του αμνιακού υγρού

Η διατήρηση φυσιολογικού όγκου και σύστασης του αμνιακού υγρού είναι σημαντική για τη διατήρηση της κύησης και την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου. Ανωμαλίες στον όγκο του αμνιακού υγρού σχετίζονται με αυξημένη περιγεννητική θνησιμότητα και νοσηρότητα. Οι ανωμαλίες αυτές διακρίνονται στο υδράμνιο και στο ολιγάμνιο (Ross et al, 2001).

α) Υδράμνιο

Αποτελεί παθολογική κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη ποσότητα αμνιακού υγρού, συνήθως άνω των 2000 ml. Διακρίνεται σε χρόνιο, όταν η αύξηση είναι σταδιακή και σε οξύ, όταν εμφανίζεται απότομα. Τα αίτια τις περισσότερες φορές είναι άγνωστα, ενώ καταστάσεις που συνοδεύονται από υδράμνιο είναι :

1. συγγενείς διαμαρτίες, κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος και του γαστρεντερικού συστήματος (ανεγκεφαλία, ατρησία του οισοφάγου), ανευπλοειδίες- χρωμοσωμικές ανωμαλίες

2. σακχαρώδης διαβήτης της κύησης

3. πολύδυμη κύηση

4. χοριοαγγείωμα πλακούντα

5. εμβρυοεμβρυική μετάγγιση

6. εμβρυϊκός ύδρωπας (Healy, 1989).

β) Ολιγάμνιο

Είναι σπάνια διαταραχή και συνήθως παρατηρείται σε δυσπλασίες του εμβρυϊκού ουροποιητικού συστήματος (πολυκυστικοί νεφροί, νεφρική αγενεσία, απόφραξη του αποχετευτικού συστήματος). Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε οζώδες άμνιο. Ελάττωση του αμνιακού υγρού έχει παρατηρηθεί σε παράταση της

κύησης, σε πλακουντιακή ανεπάρκεια και σε σοβαρή προεκλαμψία. Αν η ελάττωση συμβεί νωρίς κατά την κύηση υπάρχει ο κίνδυνος δυσμορφίας ή ακρωτηριασμού του εμβρύου από συμφύσεις καθώς και υποπλασίας των πνευμόνων και εμβρυϊκής δυσχέρειας από τη συμπίεση του ομφαλίου λώρου. Καθυστερημένη ενδομήτρια ανάπτυξη παρατηρείται σε ποσοστό 60% των περιπτώσεων (Konduri and Fewell, 1989).

Ε. Ισχύοντα δεδομένα και παράγοντες, που επηρεάζουν τη διαπερατότητα των εμβρυϊκών υμένων

Το αμνιοχόριο είναι μια πορώδης, ημιδιαπερατή μεμβράνη, με μεγάλους εξωκυττάριους διαύλους γεμάτους με ύδωρ (Garby, 1957 και Seeds, 1967). Ο ρόλος τους στη ρύθμιση του όγκου και της σύστασης του αμνιακού υγρού είναι γνωστός από παλιά, παρόλα αυτά οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες δεν έχουν διευκρινισθεί.

Έτσι, η διακίνηση ύδατος και ουσιών διαμέσου των υμένων εξαρτάται από την επίδραση των ωσμωτικών και υδροστατικών πιέσεων (Cheng, 2004), την πολικότητα των υμένων, το μέγεθος των ουσιών, το φορτίο και τη λιποδιαλυτότητά τους (Seeds et al, 1977) καθώς και το pH του περιβάλλοντος (Porta et al, 1989). Επίσης, η ηλικία κύησης (Brace, 1995), η φυσική κατάσταση της μητέρας και του εμβρύου (Moore and Word, 1972), η θερμοκρασία, το πάχος των υμένων και η απόσταση τους από τον πλακούντα επηρεάζουν τη διαπερατότητα τους (Seeds et al, 1973).

Σημαντικό είναι ακόμα να αναφερθεί ότι το άμνιο και το χόριο δεν συμβάλλουν το ίδιο στον περιορισμό και στη διάκριση των μεταφερόμενων ουσιών. Το άμνιο είναι ισχυρότερος και εκλεκτικότερος φραγμός από ό,τι το χόριο (Hardy et al, 1989), αν και ο ρόλος του κάθε ιστού μεταβάλλεται ανάλογα με την ηλικία κύησης και ανταποκρίνεται στις ανάγκες του εμβρύου (Guiet-Bara and Bara, 1983 και Brace, 1995).

Έρευνες σε πειραματόζωα και στον άνθρωπο έχουν δείξει το ρόλο ορμονών στη ρύθμιση της διαπερατότητας των υμένων σε διάφορες ουσίες και στο ύδωρ. Η προλακτίνη έχει μελετηθεί *in vitro* σε ανθρώπινο άμνιο και βρέθηκε ότι μειώνει τη μετακίνηση ύδατος, λόγω μεταβολής της διακυτταρικής οδού (Leontic et al, 1977 και 1979 και Tyson et al, 1984). Πιο πρόσφατες μελέτες όμως, έδειξαν αύξηση της μεταφοράς αμνιακού υγρού, όταν ανθρώπινη προλακτίνη χορηγήθηκε στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων (de Bakker-Teunissen et al, 1988).

Η ακετυλοχολίνη είναι μια άλλη ουσία, η οποία έχει μελετηθεί. Χρησιμοποιώντας την πειραματική διάταξη Ussing System, ο Welsch έλεγξε τη διαφορά δυναμικού ανθρώπινων υμένων και βρήκε ότι ήταν παραπλήσια του μηδενός. Η χορήγηση ακετυλοχολίνης δεν επηρέασε τη διαπερατότητα των υμένων στο νάτριο (Welsch, 1981).

Η ενδοθηλίνη, η οποία συντίθεται στο ανθρώπινο άμνιο, είναι μια ακόμα ουσία, που μελετήθηκε με τη βοήθεια του Ussing System για να διαπιστωθεί αν μεταφέρεται η ίδια και αν μεταβάλλει τη διαπερατότητα του ύδατος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν είχε επίδραση στην διακίνηση του ύδατος διαμέσου των ανθρώπινων υμένων (Eis et al, 1992).

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) έχει προκαλέσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την επίδραση την οποία ασκεί στη ρύθμιση του όγκου του αμνιακού υγρού τα τελευταία χρόνια. Έχει μελετηθεί κυρίως σε υμένες προβάτου και βρέθηκε ότι επηρεάζει την ενεργητική διαμεμβρανική απορρόφηση του αμνιακού υγρού (Cheung, 2004).

Όσον αφορά στα οιστρογόνα και την προγεστερόνη μελέτες σε πρόβατα και βοοειδή έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις τους καθώς και ο λόγος τους στο αμνιακό και στο αλλαντοϊκό υγρό μεταβάλλουν τη σύσταση αυτών σε ιόντα και τη μεταφορά του ύδατος (Wintour et al, 1986). Ο Rice (Rice et al, 1993) σε μια μελέτη σε χοιρίδια διερεύνησε την επίδραση των στεροειδών ορμονών στη διαπερατότητα των υμένων και του πλακούντα και έδειξε τη σχέση τους με τη μεταφορά ιόντων και συνεπώς τη διαπερατότητα του πλακούντα και των υμένων.

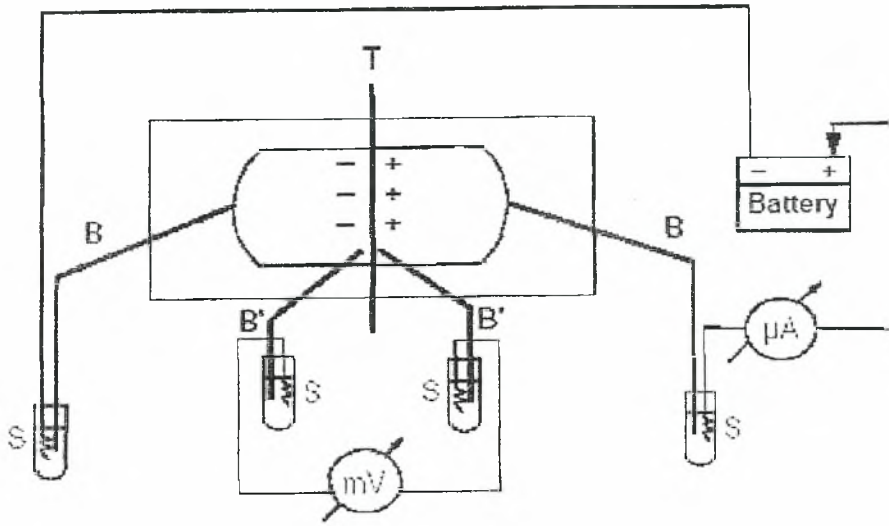
Ussing System

Μια απλή και καθιερωμένη μέθοδος μελέτης των ηλεκτροφυσιολογικών χαρακτηριστικών μιας μεμβράνης και της μεταφοράς ιόντων, υγρών και ουσιών μέσω αυτής είναι η τεχνική Ussing. Η μέθοδος αυτή αρχικά σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε από τον Hans Ussing (από τον οποίο πήρε και το όνομα της) το 1949 για τη μελέτη της ενεργητικής μεταφοράς νατρίου διαμέσου δέρματος βατράχου (Ussing and Zerahn, 1951). Έκτοτε, το πειραματικό αυτό μοντέλο βρήκε εφαρμογή στη μελέτη πλήθους βιολογικών μεμβρανών και επιθηλίων.

Στο Σχήμα 3, αποδίδεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας ενός συστήματος Ussing. Περιληπτικά, ο υπό μελέτη ιστός (T) τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ημιθαλάμους με κατάλληλο υγρό και με τη βοήθεια ηλεκτροδίων, μπορεί να γίνει μέτρηση της διαφοράς δυναμικού κατά πλάτος του ιστού. Το δυναμικό καταγράφεται με ένα βολτόμετρο (mV). Ένα δεύτερο ζεύγος ηλεκτροδίων μπορεί να διοχετεύει ρεύμα στο σύστημα με τη βοήθεια μίας μπαταρίας (battery) και ενός διαιρέτη τάσης (μA). Η δημιουργούμενη ένταση του κυκλοφορούντος ρεύματος επίσης, μπορεί να καταγραφεί, ενώ με τη βοήθεια του νόμου του Ohm μπορεί να υπολογισθεί η ηλεκτρική αντίσταση του ιστού (Li et al, 2004).

A. Αντίσταση επιθηλίων

Ένα επιθήλιο χαρακτηρίζεται ως συνεχές στρώμα κυττάρων, με χαρακτηριστική πολικότητα και ιστική συνοχή. Η πολικότητα οφείλεται στην ασύμμετρη κατανομή πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ της κορυφαίας και βασικής επιφάνειας του επιθηλίου. Το γεγονός αυτό προκαλεί μία διαφορά δυναμικού ανάμεσα στις δύο επιφάνειες. Η ιστική συνοχή αναφέρεται στην ακεραιότητα και τον τρόπο σύνδεσης των κυττάρων μεταξύ τους, καθώς και στην αντίσταση του ιστού σε ηλεκτρικές και μηχανικές καταπονήσεις.



Σχήμα 3: Διάγραμμα της συσκευής Ussing System. **B**: Γέφυρες άγαρ, οι οποίες περιέχουν τα ηλεκτρόδια για τη χορήγηση ρεύματος. **B'**: Γέφυρες άγαρ, οι οποίες περιέχουν τα ηλεκτρόδια για την καταγραφή της διαφοράς δυναμικού. **mV**: μιλιβολτόμετρο. **μA**: μικροαμπερόμετρο. **Battery**: Μπαταρία. **T**: Ιστός (Προσαρμοσμένο κατά Stefanidis et al, 2005)

Η ηλεκτρική αντίσταση (R) ενός ιστού μπορεί να προσδιορίσει την συνοχή του ιστού. Την αρχή αυτή διατύπωσε ο ίδιος ο Ussing. Η αντίσταση ενός υλικού δίδεται από την εξίσωση:

$$R = \rho \cdot L / A_x$$

όπου ρ η ειδική αντίσταση του υλικού, L το πάχος του υλικού και A_x το εμβαδόν της επιφάνειας του. Όταν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά L και A_x παραμένουν σταθερά, η αντίσταση του υλικού οφείλεται στη μοριακή του δομή και αποτελεί μέτρο της μοριακής συνοχής (Barton and Baker, 1967, Sperelakis, 2001).

Μεταβολές στη ηλεκτρική αντίσταση ενός ιστού αντικατοπτρίζουν αλλαγές στην κίνηση των ιόντων, στη διαπερατότητα και αγωγιμότητα ($G=1/R$) του υπό μελέτη ιστού, χαρακτηριστικά τα οποία επίσης εξαρτώνται από τη μοριακή συνοχή (Misfeldt et al, 1976, Gorodeski and Goldfarb, 1998, Sperelakis, 2001).

B. Ussing System και εμβρυϊκοί υμένες

Η εν λόγω πειραματική διάταξη έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη των εμβρυϊκών υμένων. Ο Garby ήταν ο πρώτος που μελέτησε τη μεταφορά ύδατος διαμέσου του ανθρώπινου αμνίου (Garby, 1957), ενώ στη συνέχεια ο Battaglia διερεύνησε τη διαπερατότητα του χορίου σε πολυσακχαρίτες (Battaglia et al, 1962). Το 1983 οι Guiet-Bara και Bara χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη μελέτησαν τη δυνατότητα εκλεκτικότητας των ιόντων από τους ανθρώπινους εμβρυϊκούς υμένες. Μέτρησαν τις ροές των ιόντων και τις αγωγιμότητές τους. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι το άμνιο είχε μεγαλύτερη εκλεκτική ικανότητα ιόντων από το χόριο και το αμνιοχόριο, οι αγωγιμότητες του αμνίου ήταν μεγαλύτερες του χορίου και ότι τα δύο επιθήλια είχαν διαφορετικούς ρόλους στη μεταφορά ουσιών (Guiet-Bara and Bara, 1983). Η ίδια διάταξη χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αναστολής της παραγωγής προσταγλαδινών από προλακτίνη σε ανθρώπινους υμένες (Tyson et al, 1985), τη δυνατότητα μεταφοράς ενδοτοξίνης διαμέσου των υμένων (Romero et al, 1987) και την επίδρασή της προλακτίνης στη μεταφορά αμνιακού υγρού (de Bakker-Teunissen et al, 1988). Το 1989 σε ανθρώπινους υμένες, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη, όπου μετρήθηκε η διαμεμβρανική διαφορά δυναμικού, η αγωγιμότητα των υμένων, η ενδοκυτάρια διαφορά δυναμικού και οι συντελεστές διάχυσης του ύδατος και της ουρίας. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υπογράμμισαν τη σημασία της διακυτταρικής οδού μεταφοράς στους υμένες (Hardy et al, 1989). Στη συνέχεια, ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε υμένες χοιριδίων (Rice et al, 1991), όπου μετρήθηκε η ηλεκτρική δραστηριότητα των υμένων (διαφορά δυναμικού, ηλεκτρική αντίσταση και ένταση ρεύματος) και οι αλλαγές της κατά τη διάρκεια της κύησης.

Έκτοτε, πολλές εργασίες έχουν χρησιμοποιήσει το Ussing system για μελέτες διαπερατότητας εμβρυϊκών υμένων, ανθρώπινων και μη (Eis et al, 1992, Collins et al, 1992, Adams et al, 2005). Παρόλα αυτά, σε ανθρώπινο ιστό δεν αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία αντίστοιχη μελέτη με μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης των υμένων.

Οιστρογόνα- Προγεστερόνη

Οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου παίζουν σημαντικότατο ρόλο κατά την κύηση. Μετά τη γονιμοποίηση ρυθμίζουν την κινητικότητα των σαλπίνγων και τη μεταφορά του προεμβρύου προς τη μητρική κοιλότητα, καθορίζουν τη διαδικασία της εμφύτευσης και τη δεκτικότητα του ενδομητρίου, συμβάλλουν στη διατήρηση της κύησης και στην ανάπτυξη του κυήματος, διατηρούν τη χάλαση και τη διάταση της μήτρας, ενώ στο τέλος συμμετέχουν στην έναρξης του τοκετού, ρυθμίζοντας τη συσταλτικότητα της μήτρας και την παραγωγή μητροσυσπαστικών ουσιών (προσταγλαδίνες-ωκυτοκίνη) από τους εμβρυϊκούς υμένες (Dickey et al, 1995, Chibbar et al, 1995, Patel et al, 1999, Madsen et al, 2004).

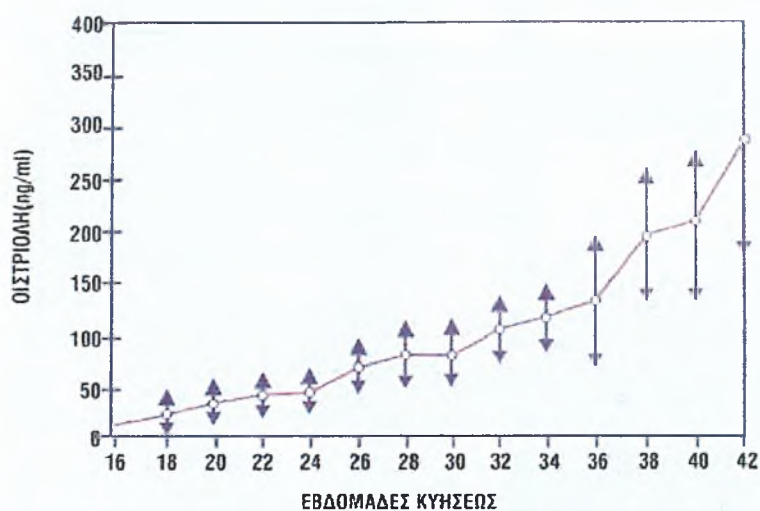
Οι στεροειδείς ορμόνες όμως, ανεξάρτητα από την κύηση, παίζουν ρόλο στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην απόπτωση τους, στην ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού, το μεταβολισμό και την εγκεφαλική λειτουργία (Zhang and Trudeau, 2006). Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος τους στην ομοιόσταση του ύδατος και των ηλεκτρολυτών στο σώμα της γυναίκας. Η δράση τους αυτή οφείλεται στη ρύθμιση της μεταφοράς ιόντων διαμέσου των επιθηλίων (Harvey et al, 2001). Στα υψηλής αντίστασης επιθήλια, δρώντας μέσω πυρηνικών υποδοχέων, ελέγχουν την έκφραση γονιδίων, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό ιοντικών καναλιών, πρωτεϊνών-φορέων ιόντων και αντλιών ιόντων. Και στα χαμηλής αντίστασης επιθήλια όμως, μέσω μη γονιδιακής οδού, ρυθμίζουν τη μεταφορά ιόντων ενεργοποιώντας οδούς δεύτερων διαβιβαστών, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, το ενδοκυττάριο ασβέστιο

και μεταβάλλοντας το ΡΗ. Η επίδραση τους στη μεταφορά ιόντων έχει μελετηθεί στο εντερικό επιθήλιο, στο ενδοθήλιο στεφανιαίων αρτηριών, σε κύτταρα της υπόφυσης, χονδροκύτταρα, ηπατοκύτταρα, κύτταρα του υπεζωκότα κ.α (Harvey et al, 2002, Hatzoglou et al, 2002).

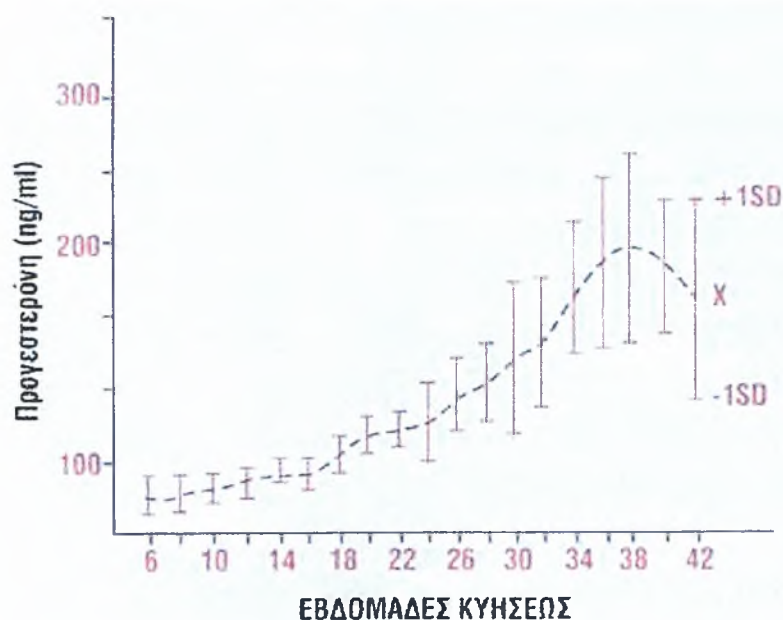
Κατά την κύηση, η προγεστερόνη παράγεται αρχικά από το ωχρό σωματίο και στη συνέχεια, καθώς η κύηση προχωρεί (6^η-8^η εβδομάδα), ο πλακούντας είναι η κύρια πηγή της (συγκεκριμένα η συγκυοτροφοβλάστη).

Τα οιστρογόνα παράγονται από τον πλακούντα και για τη σύνθεση τους απαραίτητη είναι η συμμετοχή του εμβρύου. Το κυριότερο οιστρογόνο κατά την κύηση είναι η οιστριόλη και ακολουθούν η οιστραδιόλη και η οιστρόνη. Η πρόδρομη ουσία τους, δευδροεπιανδροστερόνη (DHEA), αρχικά προέρχεται από τη μητέρα. Με την πρόοδο όμως της κύησης, το έμβρυο παράγει και αυτό DHEA, έτσι ώστε στο τέλος της κύησης κατά 50% προέρχεται από τη μητέρα και κατά 50% από το έμβρυο. Κατά την κύηση, παράγεται και ένα τέταρτο οιστρογόνο, η οιστερόλη, η οποία παράγεται μόνο στο έμβρυο και ασκεί κυρίως αντιοιστρογονική δράση. Οι συγκεντρώσεις των οιστρογόνων και της προγεστερόνης αυξάνουν συνεχώς στον ορό της μητέρας μέχρι το τέλος της κύησης. Το μωμήτριο και οι υμένες εκτίθενται σε επίπεδα 10 έως και 1000 φορές υψηλότερα από εκείνα τα οποία ανευρίσκονται σε μη έγκυες γυναίκες (Madsen et al, 2004) (Σχήματα 4 και 5).

Οι ορμόνες αυτές και οι υποδοχείς τους ανευρίσκονται και στους εμβρυικούς υμένες (Khan-Dawood and Dawood, 1984, Goldhawk and Hodkirk, 1998). Οι υμένες διαδραματίζουν ρόλο στη μεταφορά και το μεταβολισμό των στεροειδών στην εμβρυοπλακουντιακή μονάδα (Nishimoto et al, 1983). Η οιστραδιόλη υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του χορίου και του αμνίου καθώς και στο αμνιακό υγρό (Khan-Dawood and Dawood, 1984). Το ίδιο συμβαίνει και με την προγεστερόνη. Οι συγκεντρώσεις και των δύο είναι υψηλότερες στο χόριο από ό,τι στο άμνιο (Cinque et al, 1986).



Σχήμα 4: Μεταβολές της συγκέντρωσης της οιστριόλης στο αίμα της μητέρας με την πρόοδο της κύησης (προσαρμοσμένο κατά Μεσσήνη, 2005).



Σχήμα 5: Μεταβολές της συγκέντρωσης της προγεστερόνης στο αίμα της μητέρας με την πρόοδο της κύησης (προσαρμοσμένο κατά Μεσσήνη, 2005).

Οι υμένες έχουν την ικανότητα σύνθεσης στεροειδών ορμονών. Διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα για την παραγωγή και το μεταβολισμό των οιστρογόνων, όπως την 3β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση-Δ5-4 ισομεράση (3β HSD), τη στεροειδική σουλφατάση, την αρωματάση, τη σουλφοκινάση κ.α. (Mitchell and Powell, 1984). Τόσο το άμνιο όσο και το χόριο μπορούν να συνθέτουν οιστρόνη και οιστραδιόλη, το χόριο όμως παράγει περισσότερα οιστρογόνα και κυρίως κατά την έναρξη του τοκετού (Mitchell et al, 1984). Πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση οιστρογόνων υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στους υμένες, το φθατό και το αμνιακό υγρό (Romano et al, 1986).

Η προγεστερόνη συντίθεται και αυτή από τους εμβρυϊκούς υμένες. Το χόριο είναι εκατό φορές πιο παραγωγικό από το άμνιο και η σύνθεση γίνεται στα κύτταρα της τροφοβλάστης από την πρεγνενολόνη (Mitchell et al, 1982, Mitchell and Powell, 1984).

Όσον αφορά στους υποδοχείς, οι των οιστρογόνων (ER) έχουν ανευρεθεί στο άμνιο και το χόριο (Chibbar et al, 1995). Οι ER διακρίνονται σε ER alpha και ER beta. ER alpha υπάρχουν στους αμνιακούς ινοβλάστες, ενώ ER beta στο αμνιακό επιθήλιο και στους ινοβλάστες και στα κύτταρα της τροφοβλάστης (Bukovsky et al, 1999) Οι υποδοχείς της προγεστερόνης (PR) υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα των αμνιακών επιθηλιακών κυττάρων και στη τροφοβλάστη του χορίου. Υπάρχουν διάφορες ισομορφές υποδοχέων PR, με κυριότερες μορφές τις PR-A, PR-B και PR-C, ενώ έχουν ανακαλυφθεί και οι PR-M και PR-S. Κατά τη διάρκεια της κύησης, η αναλογία των ισομορφών μεταβάλλεται και αυτό πιθανόν επηρεάζει και τη δράση της προγεστερόνης (Oh et al, 2005). Στους τελειόμηνους υμένες, η κύρια μορφή τους είναι ο PR-C, ενώ ανευρίσκονται και PR-A και PR-B (Taylor et al, 2006).

A. Τρόπος δράσης των στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να δράσουν μέσω δύο οδών: της κλασικής γονιδιακής και της μη γονιδιακής οδού. Σύμφωνα με τον κλασικό τρόπο

δράσης, η ορμόνη φθάνοντας στο κύτταρο-στόχο συνδέεται με ειδικό ενδοκυττάριο, πυρηνικό υποδοχέα και στη συνέχεια το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα προκαλεί την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων, γεγονός που οδηγεί στη μετάφραση και τη σύνθεση πρωτεϊνών (Zhang and Trudeau, 2006). Ο χρόνος που απαιτείται για αυτή τη διαδικασία είναι μεγαλύτερος των 30 λεπτών (Carson-Jurika et al, 1990, Schmidt et al, 2000).

Αναφορικά με τους υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, αν και αρχικά θεωρούνταν ότι ήταν κυτταροπλασματικοί, στη συνέχεια βρέθηκε ότι υπάρχουν και πυρηνικοί και ο λόγος τους (κυτταροπλασματικοί / πυρηνικοί) εξαρτάται από τον τύπο των κυττάρων και τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος (Padayachi et al, 1987). Νεότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι υποδοχείς των στεροειδών υπάρχουν και στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου (Bukovsky et al, 1999, Zhang and Trudeau, 2006, McMillan et al, 2006).

Ο μη κλασικός γονιδιακός μηχανισμός δράσης των στεροειδών ορμονών χαρακτηρίζεται από άμεση επίδραση της ορμόνης, με εμφάνιση αποτελέσματος μέσα σε δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά και δεν απαιτεί τη συμμετοχή του γονιδιώματος. Τέτοιες άμεσες επιδράσεις των οιστρογόνων έχουν παρατηρηθεί σε διάφορα κύτταρα στόχους, όπως 1) αμνιακά κύτταρα (Fiorini et al, 2003), 2) κύτταρα του υπεζωκότα (Hatzoglou et al, 2002), 3) του ιππόκαμπτου (Mize and Alper, 2002), 4) του εντέρου (McNamara et al, 2000), 5) της υπόφυσης (Christian and Morris, 2002), 6) στους οστεοβλάστες (Fiorelli et al, 1996), 7) στα σπερματοζωάρια (Baldi et al, 2000) και 8) στα κύτταρα του ενδομητρίου (Pietras et al, 1977).

Η προγεστερόνη εμφανίζει και αυτή άμεσα αποτελέσματα σε διάφορους ιστούς. Μη γονιδιακή δράση έχει βρεθεί στον υποθάλαμο (Ke and Ramirez, 1987), στα λεία μυϊκά κύτταρα της μήτρας (Putman et al, 1991) και σε ωκύτταρα πειραματοζώων (Blondeau and Baulieu, 1984). Επιπλέον, η προγεστερόνη στο ανθρώπινο σπέρμα επιδρά ταχέως στην αντίδραση του ακροσώματος (Waldegger et al, 1995). Σε ηπατοκύτταρα ποντικών, η χορήγηση προγεστερόνης οδήγησε σε άμεση αναστροφή της πολικότητας της κυτταρικής

μεμβράνης, ενώ σε υμένες επιμύων προκάλεσε αναστολή της δέσμευσης ωκυτοκίνης (Dunlap and Stormshak, 2004).

Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί, με τους οποίους τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη αλλά και οι υπόλοιπες στεροειδείς ορμόνες μπορούν να προκαλέσουν άμεσο αποτέλεσμα. Το 1998, έγινε μια πρώτη ταξινόμηση του τρόπου δράσης.

Σύμφωνα με αυτή την κατάταξη (Mannheim Classification), η ορμόνη μπορεί να δράσει μόνη της (A, άμεση δράση) ή με τη βοήθεια ενός συναγωνιστή (B, έμμεση δράση). Όταν η ορμόνη δρα μόνη της μπορεί να μεταβάλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων στόχων, όπως τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και το μικροπεριβάλλον, χωρίς να δεσμεύεται σε κάποιον υποδοχέα (A1) ή να δεσμεύεται είτε σε έναν κλασικό, ειδικό, ενδοκυττάριο υποδοχέα (A1a), είτε σε έναν μη κλασικό υποδοχέα (A1b). Όταν η δράση είναι έμμεση μπορεί να μη χρειάζεται την παρουσία υποδοχέα (B1) ή πάλι μπορεί να εμπλέκεται κλασικός (B1a) ή μη (B1b) υποδοχέας μαζί με το συναγωνιστή (Falkenstein et al, 2000).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, υπάρχει ενεργοποίηση ενός μεμβρανικού υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός δεύτερου ενδοκυττάρου μεταβιβαστή, όπως το cAMP, οι πρωτεϊνικές κινάσες ή τα ιόντα ασβεστίου (Harvey et al, 2001). Η ενεργοποίηση των δεύτερων μεταβιβαστών οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων, μεταβάλλοντας τη λειτουργία του κυττάρου (Schmidt et al, 2000).

Με βάση τα παραπάνω λοιπόν, οι στεροειδείς ορμόνες μπορούν να δράσουν και με τους δύο τρόπους στο ίδιο κύτταρο-στόχο, οδηγώντας στην ενεργοποίηση διαφορετικών ενδοκυττάρων μηχανισμών, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους. Έτσι, έχουμε ένα σύνθετο μοντέλο δράσης των ορμονών αυτών, με πρώτη εμφανιζόμενη τη μη γονιδιακή δράση και στη συνέχεια την κλασική γονιδιακή επιρροή (Schmidt et al, 2000).

B. Ο ρόλος των ανταγωνιστών

Και στις δύο οδούς δράσης ο ρόλος των υποδοχέων - κυτταροπλασματικοί, πυρηνικοί, μεμβρανικοί- είναι φανερός (εκτός από τις κατηγορίες AI και BI). Για να διερευνηθεί εάν ο μηχανισμός δράσης μιας ορμόνης εμπλέκει ειδικό υποδοχέα ή όχι, χρησιμοποιούνται οι ανάλογοι ανταγωνιστές της κάθε ορμόνης. Ο ανταγωνιστής δεσμεύεται στον υποδοχέα και εμποδίζει τη σύνδεση της ορμόνης με αυτόν.

Ένας από τους πιο γνωστούς ανταγωνιστές οιστρογόνων είναι η ταμοξιφαίνη. Ανήκει στην οικογένεια των SERMS (selective estrogen receptor modulators). Αναστέλλει τους ενδοκυττάριους υποδοχείς, αλλά σε μερικές περιπτώσεις και τους μεμβρανικούς (Chen et al, 1999, Stefano et al, 1999). Η σύνδεση της με τον υποδοχέα, εκτός από την αντιστρογονική της δράση, σε μερικές περιπτώσεις επιφέρει και αγωνιστική δράση (Love et al, 1992). Επίσης, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ταμοξιφαίνη μόνη της μπορεί να προκαλέσει ταχείες αλλαγές στη δραστηριότητα των κυττάρων, μεταβάλλοντας τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών, αποτέλεσμα που δεν εξαρτάται από τη σύνδεση με υποδοχέα, αλλά από την ταχεία μεταφορά ιόντων και τη μεταβολή του pH (Lahenkari et al, 2003).

Η μifeπριστόνη είναι ένας εκλεκτικός ανταγωνιστής της προγεστερόνης, που έχει και αντιγλυκορτικοειδική και αντιοξειδωτική δράση. Την τελευταία δεκαετία, έχουν περιγραφεί και αγωνιστικές δράσεις της μifeπριστόνης (Nordeen et al, 1995, Greb et al, 1999). Η πιθανότητα μη γονιδιακού τρόπου δράσης βασίζεται σε *in vitro* πειράματα, που δείχνουν το αποτέλεσμα της μifeπριστόνης σε κύτταρα, μέσω ενεργοποίησης δεύτερου μεταβιβαστή (protein kinase A και cAMP) (Nordeen et al, 1993, Roberts et al, 1995).

Λεπτίνη

Η λεπτίνη είναι μια πρωτεΐνη που ανακαλύφθηκε το 1994. Το μοριακό της βάρος είναι 14-16 kDa και παράγεται, κυρίως, από το λιπώδη ιστό. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *ob* (*obese*), που στον άνθρωπο εντοπίζεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7, στη θέση 7q31.3 και περιέχει 3 εξόνια και 2 ιντρόνια, που κωδικοποιούν μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 167 αμινοξέων (Casasueva and Dieguez, 1999, Messinis and Milingos, 1999). Δομικά ανήκει στην οικογένεια των κυτοκινών τύπου I και παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την προλακτίνη, την αυξητική ορμόνη, την ιντερλευκίνη 3 κ.α. (Otero et al, 2005). Η λεπτίνη εκφράζεται και εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό, ανεξάρτητα από τη θέση που βρίσκεται και όλα τα λιπώδη κύτταρα είναι ικανά να παράγουν την ουσία αυτή (Casasueva and Dieguez, 1999).

Αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς Ob-R και δρα μέσω αυτών. Οι υποδοχείς της παράγονται από το γονίδιο του διαβήτη (*db*) και το mRNA Ob-R εκφράζει τουλάχιστον έξι διαφορετικά ισότοπα (*a, b, c, d, e, f*) (*long and short*). Οι υποδοχείς της ανήκουν στην οικογένεια των κυτοκινών (*class I cytokine family receptors*) και είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες. Αποτελούνται από τρία τμήματα (εκτός από τον Ob-Re): α) ένα εξωκυττάριο τμήμα, κοινό για όλους, β) ένα διαμεμβρανικό τμήμα και γ) ένα ενδοκυττάριο τμήμα, βραχύ (*a, c, d, f*) ή μακρύ (*b*). Ο Ob-Re είναι διαλυτή μορφή και λειτουργεί ως πρωτεΐνη φορέας της λεπτίνης. Ο Ob-Rb είναι το μακρύ ισότοπο και εκφράζεται κυρίως στον υποθάλαμο και στους πυρήνες του αλλά και στους εμβρυϊκούς ιστούς, στο εντερικό επιθήλιο, στα β κύτταρα του παγκρέατος, στα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης και στα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών (Otero et al, 2005). Η σύνδεση της λεπτίνης με το διαμεμβρανικό υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός δεύτερου μεταβιβαστή, που οδηγεί στη σύνθεση διαφόρων πεπτιδίων (Casasueva and Dieguez, 1999).

Ο κύριος ρόλος της έγκειται στη μεταβίβαση στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στον υποθάλαμο ενός σήματος που αντικατοπτρίζει τα ενεργειακά αποθέματα του οργανισμού και ρυθμίζει έτσι την ενεργειακή ισορροπία και

ομοιόσταση (Messinis and Milingos, 1999). Η έκκριση της λεπτίνης επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, κυρίως από την πρόσληψη τροφής και διάφορες ορμόνες. Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) είναι ο κυριότερος παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει τα επίπεδα της (Messinis et al, 1999). Το φύλο παίζει, επίσης, καθοριστικό ρόλο στις τιμές της λεπτίνης. Η συγκέντρωση της στις γυναίκες είναι περίπου διπλάσια έως τριπλάσια αυτής των ανδρών. Αυτό ισχύει από τη γέννηση, όπου στα θήλα νεογνά η λεπτίνη είναι 40% περισσότερη από ότι στα άρρενα, ενώ μετά την εμμηνόπαυση τα επίπεδα της μειώνονται (Sinha and Caro, 1998).

Από τις ορμόνες η ινσουλίνη διεγείρει την έκκριση της, καθώς επίσης ανάλογη δράση έχουν τα γλυκοκορτικοειδή, τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, η ιντερλευκίνη 1 και ο TNF α (Messinis et al, 2000 και 2001). Αντίθετα, τα ανδρογόνα, οι εστέρες, οι β -αδρενεργικοί αγωνιστές και φάρμακα που αυξάνουν το c-AMP αναστέλλουν την έκκριση της. Τέλος, σε καταστάσεις όπως λοιμώξεις με παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων και πρωτεϊνών οξείας φάσης, η σύνθεση της λεπτίνης αυξάνει ταχέως (Otero et al, 2005).

Πρόσφατα, η λεπτίνη έχει αναγνωρισθεί ως παράγοντας ο οποίος ρυθμίζει τη διαπερατότητα διαφόρων ιστών. Έχει βρεθεί σε πειραματόζωα ότι αυξάνει τη διαπερατότητα των μικροαγγείων καθώς και την ανταλλαγή μικρομορίων ανάμεσα στη μητέρα και το έμβρυο, μέσω των αγγείων του πλακούντα (Anim-Nyame et al, 2002). Επίσης, στο εντερικό επιθήλιο βρέθηκε ότι μεταβάλλει την απορρόφηση λιπιδίων και σακχάρων, τροποποιώντας τη λειτουργία πρωτεϊνών-φορέων (Ducroc et al, 2005).

Στην κύηση, αλλαγές στο βάρος σώματος και στην όρεξη, τη θερμογένεση, το μεταβολισμό των λιπιδίων και άλλες ορμονικές και νευροενδοκρινικές μεταβολές, που συμβαίνουν, έχουν συσχετισθεί με τη λεπτίνη. Ο πλακούντας και οι υμένες, παράγουν λεπτίνη (Soh et al, 2000) και περιέχουν τους υποδοχείς της (Akerman et al, 2002), ενώ και το αμνιακό υγρό περιέχει την ορμόνη, παίζοντας ρόλο στην ανάπτυξη του γαστρεντερικού συστήματος του εμβρύου (Aparicio et al, 2005). Η συγκέντρωση στο αμνιακό υγρό κυμαίνεται σε διάφορες δημοσιεύσεις από 3.7 ± 0.8 ng/ml (Schubring et al, 1997) έως

10.45±0.38 ng/ml (Cagnacci et al, 2006). Η συγκέντρωση είναι υψηλότερη κατά το δεύτερο τρίμηνο, ενώ στο τρίτο τρίμηνο μειώνεται (Aragicio et al, 2005). Τα επίπεδα της εξαρτώνται από το φύλο του εμβρύου και έχει βρεθεί ότι σε θήλεα έμβρυα η συγκέντρωση είναι υψηλότερη παρά σε άρρενα (10.45±0.38 έναντι 7.91±0.36 ng/ml) (Cagnacci et al, 2006). Επίσης, υψηλότερες τιμές εμφανίζονται σε δίδυμες κυήσεις (Perni et al, 2005) καθώς και σε περιπτώσεις προεκλαμψίας (Chan et al, 2006).

Ο ρόλος της στους υμένες και στο αμνιακό υγρό δεν έχει διευκρινισθεί. Εμφανίζεται από πολύ νωρίς, την 7^η εβδομάδα (Makrydimas et al, 2005) και πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της τροφοβλάστης, μέσω της παραγωγής μεταλλοπρωτεϊνών (Castellucci et al, 2000). Στα θήλεα έμβρυα οι Cagnacci και συν. (Cagnacci et al, 2006) συσχέτισαν τα επίπεδα της λεπτίνης του αμνιακού υγρού με την αμφιβρεγματική διάμετρο, την περίμετρο της κοιλίας και το βάρος του νεογνού, ενώ οι Woelfer και συν. (Woelfer et al, 2005) βρήκαν ότι η λεπτίνη του αμνιακού υγρού είχε αρνητική συσχέτιση με το βάρος του πλακούντα και του εμβρύου στο δεύτερο τρίμηνο.

Ο ρόλος της λεπτίνης στην ηλεκτρική αντίσταση και τη διαπερατότητα των εμβρυϊκών υμένων μέχρι σήμερα δεν έχει διερευνηθεί.

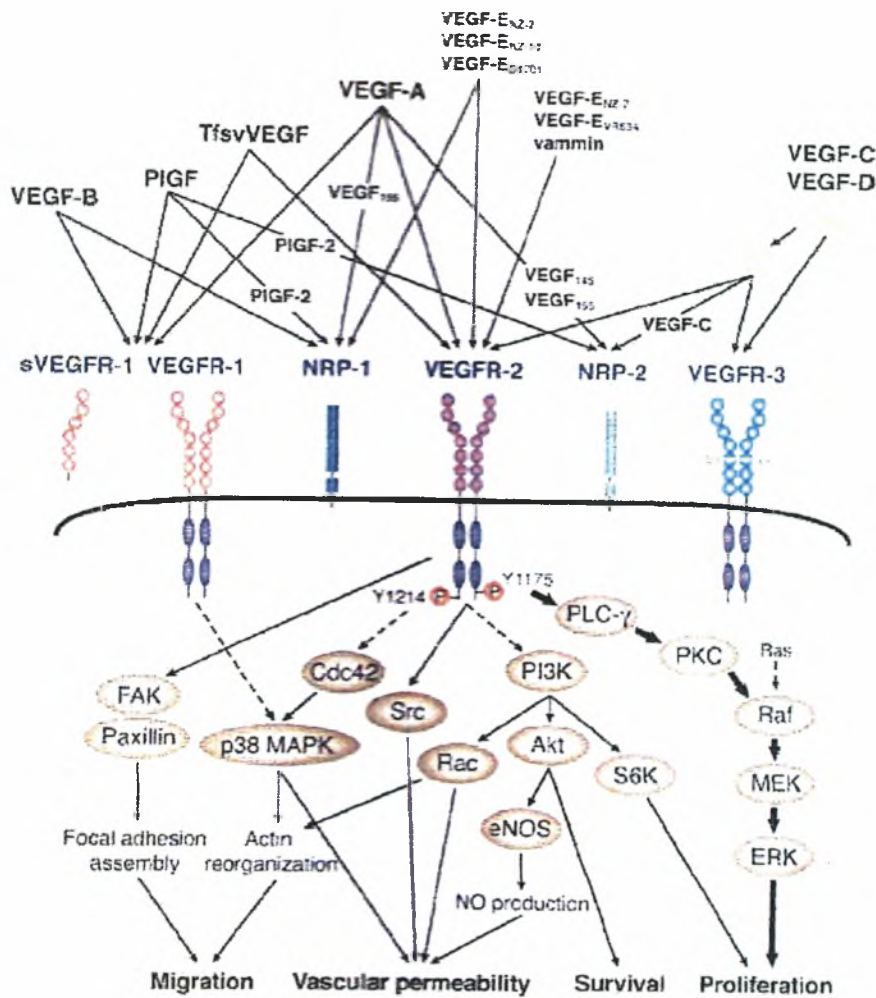
Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (VEGF)

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF ή VEGF-A), ανήκει σε μια ευρύτερη οικογένεια αυξητικών παραγόντων, η οποία αποτελείται από τους εξής παράγοντες: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (κωδικοποιείται μέσω ιού μόνο στα πρόβατα), VEGF-F (snake venom VEGF) και PlGF. Ο VEGF, ο οποίος αναφέρεται και ως VPF (vascular permeability factor), είναι ο πρώτος ο οποίος ανακαλύφθηκε και παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων (Takahashi et al, 2005). Δρα ως μιτογόνο των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχει στο σχηματισμό νέων αγγείων και λεμφαγγείων, στη σταθεροποίηση τους και στη

ρύθμιση της διαπερατότητας των αγγείων (Yamazaki and Morita, 2006). Εκτός όμως από την αγγειογένεση, ο VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της χημειοταξίας των μονοκυττάρων και της δραστηριότητας των πρωτεασών, στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, στη σπερματογένεση και στο σχηματισμό των οστών (Olofsson et al, 1999), ενώ σημαντικός είναι ο ρόλος του στην καρκινογένεση με το σχηματισμό νεοαγγείωσης (Simon et al, 1995).

Ο ανθρώπινος VEGF κωδικοποιείται από ένα γονίδιο στο 6q21.3 χρωμόσωμα, το οποίο περιέχει οκτώ εξόνια και επτά ιντρόνια. Απαντά σε τουλάχιστον εννέα υποτύπους με 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189 και 206 αμινοξέα (Takahashi et al, 2005). Ο ανθρώπινος VEGF περιέχει ένα περισσότερο αμινοξύ από τον VEGF των άλλων ειδών. Παράγεται κυρίως, από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και από τα μακροφάγα, τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα και από διάφορα άλλα κύτταρα. Η κυριότερη μορφή του είναι ο VEGF₁₆₅ και ακολουθούν ο VEGF₁₂₁ και ο VEGF₁₈₉ (Banks et al, 1998).

Η δράση του VEGF επιτυγχάνεται μέσω της δέσμευσης του σε ειδικούς υποδοχείς. Έχουν ανιχνευθεί και κλωνοποιηθεί τρεις ειδικοί υποδοχείς υψηλής δεσμευτικής ικανότητας, που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων της τυροσινικής κινάσης. Αυτοί είναι ο VEGFR-1 ή flt-1 (fms-like tyrosine kinase), ο VEGFR-2 ή KDR και ο VEGFR-3 ή flt-4, οι οποίοι ανευρέθησαν στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Takahashi et al, 2005). Και οι τρεις υποδοχείς αποτελούνται από τρία τμήματα: 1) ένα εξωκυττάριο τμήμα που αποτελείται από 7 ανοσοσφαιρίνες (Ig-like domains), 2) ένα απλό διαμεμβρανικό τμήμα και 3) από ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Εκτός από αυτούς τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς, υπάρχουν και διαλυτές μορφές υποδοχέων, όπως ο sVEGF-R1, παρόμοιος με τον Flt-1. Η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζεται κατά την κύηση στο μητρικό πλάσμα και σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αμνιακό υγρό. Πιθανολογείται ότι έχει ρυθμιστικό ρόλο στη δραστηριότητα του VEGF (Vuorela et al, 2000). Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχουν αναγνωρισθεί ως συνυποδοχείς του VEGF, υποδοχείς των σεμαφορινών/καλαψωνών: η νευροπιλίνη 1, η οποία ανευρίσκεται και στους εμβρυϊκούς ιστούς (Olofsson et al, 1999) και η νευροπιλίνη 2, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό των μικρών λεμφαγγείων (Takahashi et al, 2005) (Σχήμα 6).



Σχήμα 6: Σχηματικό διάγραμμα των μελών της οικογένειας VEGF και των υποδοχέων στους οποίους δεσμεύονται (προσαρμοσμένο κατά Takahashi et al, 2005).

Έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προκαλέσει ο ρόλος του VEGF στην κύηση. Η σημασία του κατά τη διάρκεια της κύησης έγκειται σε δύο καθοριστικά γεγονότα: την αγγειογένεση και τη ρύθμιση της διαπερατότητας των αγγείων και των υμένων. Η αγγειογένεση είναι μία φυσιολογική διαδικασία, απαραίτητη για

την ωορρηξία, την εμφύτευση, την πλακουντοποίηση, την εμβρυογένεση και τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη του κυήματος. Εξίσου σημαντικός όμως, είναι και ο ρόλος του VEGF στη ρύθμιση της διαπερατότητας των εμβρυϊκών υμένων και του τοιχώματος των αγγείων. Η δράση του αυτή είναι καίριας σημασίας για την επιτυχή έκβαση της κύησης (Banks et al, 1998).

Κατά τη διάρκεια της κύησης, ο VEGF ανευρίσκεται από πολύ νωρίς. Κατά τα αρχικά στάδια της κύησης ανιχνεύεται στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης, που καλύπτουν τη χοριακή κοιλότητα, ενώ στη συνέχεια υπάρχει στο άμνιο, στο χόριο, στο στρώμα των λαχνών και στο αμνιακό υγρό (Ahmed et al, 1995, Ghosb et al, 2000). Ο VEGF μπορεί να παραχθεί από τους υμένες και τον πλακούντα. Υποδοχείς του VEGF υπάρχουν επίσης στους υμένες και στο αμνιακό υγρό (Marvin et al, 2000). Ο Flt-1 υπάρχει στην κυτταροτροφοβλάστη, ενώ ο KDR υπάρχει στο άμνιο και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του πλακούντα (Cheung, 2004). Το αμνιακό υγρό επίσης περιέχει το VEGF σε συγκέντρωσή μικρότερη των 20 ng/ml, σε ελεύθερη και συνδεδεμένη με το διαλυτό υποδοχέα μορφή (Vuorele-Vepsalainen et al, 1998).

Διάφοροι παράγοντες εμπλέκονται στην έκφραση του γονιδίου του VEGF και προκαλούν θετική αλληλορρύθμιση. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι προσταγλαδίνες και κεντρικοί αυξητικοί παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί υπάρχουν στο άμνιο και στο αμνιακό υγρό, προερχόμενοι από τα εμβρυϊκά ούρα και προάγουν την έκφραση του γονιδίου του VEGF, ενώ αλληλεπιδρούν και μεταξύ τους (Cheung, 2004). Οι κυτοκίνες και οι στεροειδείς ορμόνες (οιστρογόνα και προγεστερόνη) (Bausero et al, 1998), η TSH και το NO επίσης ελέγχουν την έκφραση του VEGF (Cheung, 1997, Hildebrandt et al, 2001, Takahashi et al, 2005). Ένας άλλος παράγοντας που προκαλεί αύξηση του VEGF είναι η υποξία (Cheung, 1997, Matsumoto et al, 2002) καθώς και καταστάσεις που οδηγούν σε αύξηση του όγκου του αμνιακού υγρού (Matsumoto et al, 2001, Daneshmand et al, 2003). Τέλος, έχει βρεθεί ότι ο VEGF αυξάνει σε περιπτώσεις προεκλαμψίας (Baker et al, 1995), ενώ είναι μειωμένος σε περιπτώσεις συνδρόμου Down (Tranquilli et al, 2003).

Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι ο VEGF είναι ένας από τους κύριους παράγοντες, ο οποίος επηρεάζει την ενεργητική μεταφορά αμνιακού υγρού και τη ρύθμιση του όγκου του (Daneshmand et al, 2003). Σε υμένες προβάτου χρησιμοποιήθηκε το Ussing System . Σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς υμένες παρόμοια μελέτη του VEGF δεν έχει πραγματοποιηθεί.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικό και Μέθοδοι

A. Συλλογή και προετοιμασία ιστού

Για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα εμβρυϊκών υμένων, αποτελούμενα από το άμνιο και το χόριο σε επαφή. Οι ιστοί συλλέγονταν αμέσως μετά από φυσιολογικό τοκετό ή καισαρική τομή φυσιολογικών κυήσεων, που διενεργούνταν στη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Οι κυήσεις ήταν ηλικίας 37 έως 41 εβδομάδων.

Αμέσως μετά την έξοδο του πλακούντα και των υμένων από τη μήτρα, οι ιστοί αποκόπτονταν σε μια απόσταση 3 cm από το χείλος του πλακούντα. Στη συνέχεια, ξεπλένονταν με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer Lactate, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν πύγματα αίματος και υπολείμματα φαρτού και τοποθετούνταν σε οξυγονωμένο διάλυμα Krebs στους 4° C (Collins et al, 1991). Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν μέσα σε 30 λεπτά. Κατά την παραπάνω διαδικασία, γινόταν προσπάθεια για τη λιγότερη δυνατή καταπόνηση του ιστού. Το διάλυμα Krebs είχε pH=7.4 και η σύνθεσή του σε mM ήταν 117.5 NaCl, 1.15 NaH₂PO₄, 24.99 NaHCO₃, 5.65 KCl, 1.18 MgSO₄, 2.52 CaCl₂ και 5.55 γλυκόζη. Το διάλυμα συνεχώς εμπλουτιζόταν με αέριο σύνθεσης 95% O₂ και 5% CO₂.

Τμήματα 2x2 cm από τους υμένες, χωρίς εμφανή σημεία ρήξης, διαχωρισμού του αμνίου από το χόριο ή οίδημα, χρησιμοποιούνταν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

B. Πειραματική διαδικασία

Κάθε ιστικό τεμάχιο τοποθετούνταν ως επίπεδο στρώμα σε μία αντλία τύπου Ussing μεταξύ δύο θαλάμων από plexiglas. Στο σημείο επαφής του κάθε θαλάμου με τον ιστό, τοποθετούνταν ένας δακτύλιος από σιλικόνη, προκειμένου

να ελαχιστοποιηθεί η βλάβη στον ιστό από την πίεση των τοιχωμάτων της αντλίας (Li et al, 2004). Το σχήμα του κάθε θαλάμου ήταν κωνικό και συνδεόταν με ένα ρεζερβουάρ συνολικού όγκου 20 ml. Η επιφάνεια μεταξύ των θαλάμων ήταν 1.43 cm². Στους θαλάμους διοχετευόταν συνεχώς αέριο σύνθεσης 95% O₂ και 5% CO₂ και λόγω της επίδρασης της θερμοκρασίας στη μεταφορά ιόντων η όλη διαδικασία πραγματοποιούνταν στους 37°C.

Με ένα ζεύγος ηλεκτροδίων τύπου Ag/AgCl (3M KCl, 3% άγαρ), τοποθετημένων σε απόσταση 3 mm και από τις δύο επιφάνειες της μεμβράνης, μετρήθηκε η διαφορά δυναμικού κατά πλάτος της μεμβράνης με τη βοήθεια ενισχυτή (model PVC-3 with input impedance 10¹² Ω, Word Precision Instruments) μετά τη χορήγηση εξωγενούς ρεύματος. Το ρεύμα ήταν συνεχές, χορηγούμενο διαμέσου ηλεκτροδίων τοποθετημένων σε απόσταση 30 mm από κάθε επιφάνεια της μεμβράνης. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη χορήγηση ρεύματος ήταν μια συσκευή voltage-clamp (model DVC-100, Word Precision Instruments). Η ένταση του ρεύματος κυμαινόταν από -400 έως +400 μΑ, αυξανόμενη κατά 100 μΑ σε κάθε μέτρηση. Η αντίσταση του ιστού (R_{TE}) υπολογίστηκε βάση του νόμου Ohm $R=V/I$, όπου R η αντίσταση, V το δυναμικό και I η ένταση του ρεύματος.

Μετά την τοποθέτηση των υμένων στην αντλία, ίσος όγκος διαλύματος Krebs προσθέτονταν και στους δύο θαλάμους της αντλίας συγχρόνως, ούτως ώστε η υδροστατική πίεση να είναι η ίδια και από τις δύο επιφάνειες του ιστού. Ο ιστός παρέμενε σε ηρεμία για τουλάχιστον 30-40 λεπτά μετά την τοποθέτησή του. Η επιφάνεια των υμένων που ερχόταν σε επαφή με το αμνιακό υγρό, δηλαδή το άμνιο, ονομαζόταν εμβρυϊκή επιφάνεια, ενώ αυτή προς το τοίχωμα της μήτρας (δηλαδή το χόριο) μητρική επιφάνεια. Μια αρχική μέτρηση (βασική τιμή) γινόταν πριν την προσθήκη της υπό εξέταση ουσίας (χρόνος 0).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων (28 πειράματα) με παρουσία διαλύματος Krebs, χωρίς προσθήκη κάποιας ουσίας και από τις δύο επιφάνειες του ιστού. Οι μετρήσεις γινόταν σε προκαθορισμένους χρόνους και συγκεκριμένα στα 0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 και 60 λεπτά. Επειδή οι στεροειδείς ορμόνες διαλύονταν αρχικά σε αιθανόλη, διάλυμα Krebs με

αιθανόλη, σε τελική συγκέντρωση 0.95% χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα για να ελεγχθεί εάν προκαλεί μεταβολή της αντίστασης –πειράματα αναφοράς (control). Πειράματα αναφοράς πραγματοποιούνταν κάθε φορά σε κάθε ιστό, από τον οποίο στη συνέχεια γινόταν μετρήσεις, ώστε να περιοριστούν διαφορές οφειλόμενες στη μεταβλητότητα των ιστών.

1. Οιστρογόνα και προγεστερόνη

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της 17β οιστραδιόλης. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 10^{-4} έως 10^{-7} M και ο χρόνος μελέτης καθορίστηκε στα 60 λεπτά, από τη στιγμή που χορηγούνταν η ουσία. Η μέτρηση της αναπτυσσόμενης διαφοράς δυναμικού από το χορηγούμενο ρεύμα και ο υπολογισμός της R_{TE} γινόταν πριν τη χορήγηση της ουσίας και μετά από 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 και 60 λεπτά.

Ακολούθησε σειρά πειραμάτων με προσθήκη ταμοξιφαίνης. Αρχικά, η ταμοξιφαίνη χορηγήθηκε μόνη της, προκειμένου να δούμε εάν η ίδια προκαλεί κάποιο αποτέλεσμα. Χρησιμοποιήθηκαν αραιώσεις 10^{-4} έως 10^{-7} M. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σύγχρονη χορήγηση οιστραδιόλης και ταμοξιφαίνης σε συνδυασμό (10^{-4} M ταμοξιφαίνη με 10^{-5} M οιστραδιόλη και 10^{-4} M ταμοξιφαίνη με 10^{-4} M οιστραδιόλη).

Η δράση της προγεστερόνης ελέγχθηκε σε συγκεντρώσεις 10^{-4} έως 10^{-7} M. Για να δούμε την εμπλοκή υποδοχέα, χρησιμοποιήθηκε η μifeπριστόνη μόνη της σε συγκεντρώσεις 10^{-4} έως 10^{-8} M και σε συνδυασμό με προγεστερόνη σε συγκεντρώσεις 10^{-5} M προγεστερόνη με 10^{-5} M μifeπριστόνη, 10^{-4} M προγεστερόνη με 10^{-4} M μifeπριστόνη, 10^{-5} M προγεστερόνη με 10^{-4} M μifeπριστόνη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με συγχρόνηση 17β οιστραδιόλης και προγεστερόνης (προγεστερόνη 10^{-4} M με οιστραδιόλη 10^{-4} M και προγεστερόνη 10^{-6} M με οιστραδιόλη 10^{-6} M).

2. Λεπτίνη

Χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη ανασυνδυασμένη λεπτίνη (Sigma). Η διάλυση της έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας Εταιρείας σε

διάλυμα 15mM HCl και 7.5mM NaOH. Χορηγήθηκε σε δόσεις 1, 10, 20 και 100 ng/ml. Για να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο επίδρασης του HCl και του NaOH, έγιναν πειράματα με διάλυμα Krebs μαζί με HCl και NaOH, χωρίς παρουσία λεπτίνης (control). Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε, ήταν όμοια με τα προηγούμενα πειράματα.

3. VEGF

Χρησιμοποιήθηκε ο VEGF₁₂₁ (Sigma) μετά τον ανασυνδυασμό του σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας Εταιρείας με H₂O. Μετρήθηκε η R_{TE} σε δόσεις 1, 5, 10 και 20 ng/ml. Ως πειράματα control θεωρήθηκαν πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν με προσθήκη διαλύματος Krebs μαζί με H₂O, χωρίς παρουσία VEGF₁₂₁.

Στατιστική Επεξεργασία

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της παρούσης μελέτης εκφράζονται ως μέσος όρος ± σταθερό σφάλμα (SE). Η στατιστική ανάλυση των πειραμάτων έγινε με τα προγράμματα SPSS και NCSS. Η επίδραση μετά την προσθήκη κάθε συγκέντρωσης της εκάστοτε ουσίας, αρχικά ελέγχονταν με το ANOVA για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για να διαπιστωθούν αλλαγές μέσα στην ίδια την καμπύλη σε σχέση με το χρόνο. Στη συνέχεια, συγκρίνονταν με τη βοήθεια του pair t test οι τιμές όλων των χρονικών στιγμών με την αρχική τιμή προ της χορήγησης. Το t test για ανεξάρτητα δείγματα χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των διαφόρων συγκεντρώσεων με τα πειράματα αναφοράς καθώς και των συγκεντρώσεων μεταξύ τους. Ως επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς καθορίστηκε όταν το p ήταν μικρότερο από 0.05. Προς αποφυγή διαφορών, λόγω μεταβλητότητας των ιστών υπολογίστηκε η ΔR_{TE} και οι γραφικές παραστάσεις έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος Sigma Plot.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Διεπιθηλιακή αντίσταση εμβρυϊκών υμένων

Η τιμή της διεπιθηλιακής αντίστασης, η οποία μετρήθηκε πριν τη χορήγηση οποιασδήποτε υπό μελέτη ουσίας, ήταν $29.4 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Η τιμή αυτή δεν διέφερε από το μέσο όρο της R_{TE} , η οποία υπολογίσθηκε στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσία μόνο υγρού KRBS ($n=28$). Στα πειράματα αυτά η R_{TE} δεν μεταβλήθηκε κατά τη χρονική περίοδο μελέτης των 60 λεπτών, αλλά παρέμεινε σταθερή.

Όταν στο διάλυμα KRBS προστέθηκε αιθανόλη στην εμβρυϊκή και στη μητρική επιφάνεια, η R_{TE} ήταν $29.1 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=80$) και $29.2 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=80$) αντίστοιχα και δεν παρουσίασε καμία στατιστικώς σημαντική αλλαγή κατά τη στιγμή της χορήγησης της αιθανόλης και στη συνέχεια για όλη τη διάρκεια του πειράματος.

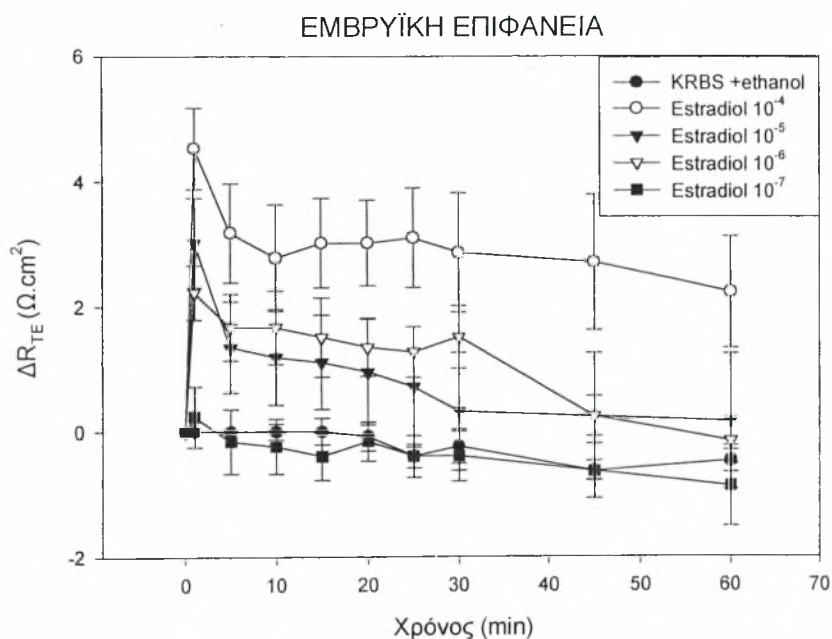
Σε όλα τα πειράματα, η επίδραση στην R_{TE} κάθε ουσίας που χρησιμοποιήθηκε υπολογίσθηκε ως η διαφορά της ευρεθείσας τιμής για κάθε χρονική στιγμή από την αρχική τιμή της R_{TE} , δηλαδή την τιμή πριν από τη χορήγηση της συγκεκριμένης ουσίας (ΔR_{TE}).

Επίδραση ορμονών

17β-οιστραδιόλη

Η προσθήκη οιστραδιόλης στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων είχε ως αποτέλεσμα μία στατιστικώς σημαντική αύξηση της R_{TE} σε σχέση με τη βασική τιμή προ της χορήγησης, η οποία είχε παρατεταμένη διάρκεια και παρουσίασε τάση δοσοεξάρτησης (Σχήμα 7). Η αύξηση ήταν άμεση, τύπου αιχμής, με μέγιστη τιμή κατά το 1^ο λεπτό αμέσως μετά τη χορήγηση. Η μέγιστη αύξηση σε σύγκριση με τη βασική τιμή παρατηρήθηκε με τις συγκεντρώσεις 10^{-4} M ($\Delta R_{TE}=4.5 \pm 0.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.018$) και 10^{-5} M ($\Delta R_{TE}=3.1 \pm 0.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.008$), ενώ με τη συγκέντρωση 10^{-6} M η ΔR_{TE} ήταν $2.2 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.004$). Οι τιμές της R_{TE} στο

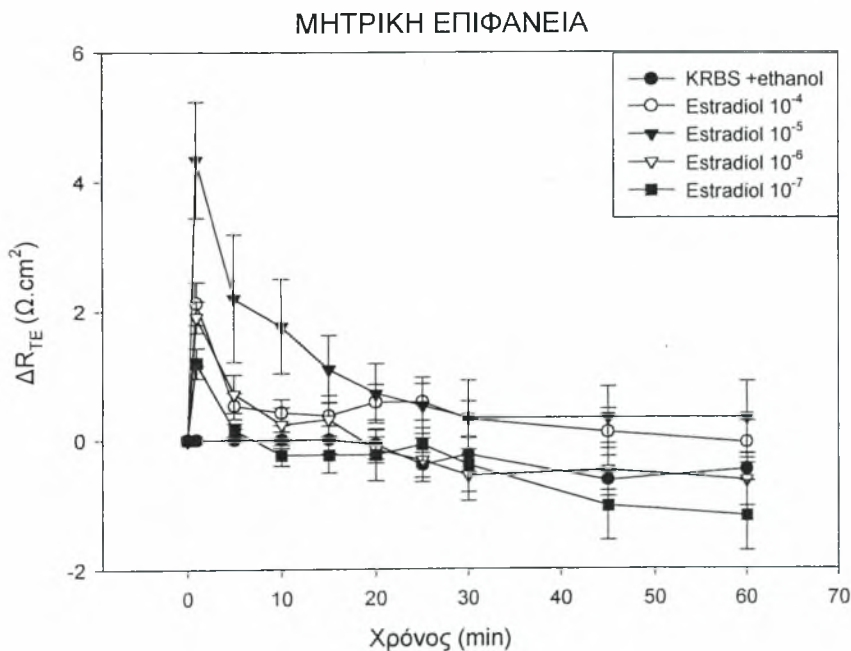
1^ο λεπτό και στις τρεις συγκεντρώσεις οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες από εκείνες στα πειράματα αναφοράς ($P < 0.05$). Μετά την αρχική αύξηση της, η R_{TE} παρέμεινε σημαντικά αυξημένη έως και το 30^ο λεπτό για τις συγκεντρώσεις 10^{-4} M και 10^{-6} M σε σχέση με την αρχική τιμή ($P < 0.05$) και έως το 45^ο λεπτό σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς ($P < 0.05$). Στη συγκέντρωση 10^{-5} M, η τιμή της R_{TE} παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη της βασικής τιμής έως το 20^ο λεπτό ($P < 0.05$). Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές της ΔR_{TE} ανάμεσα στις διάφορες συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση 10^{-7} M της οιστραδιόλης δεν επέφερε καμία μεταβολή στην R_{TE} .



Σχήμα 7. Επίδραση της 17β-οιστραδιόλης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στην εμβρυϊκή επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Όταν η οιστραδιόλη προστέθηκε στη μητρική επιφάνεια των υμένων και οι τέσσερις συγκεντρώσεις αύξησαν τη R_{TE} σε σύγκριση με τη βασική τιμή, η διάρκεια της επίδρασης, όμως, ήταν μικρότερη από ότι στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων. Η ΔR_{TE} στο 1^ο λεπτό ήταν $2.1 \pm 0.3 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P < 0.001$) για τη

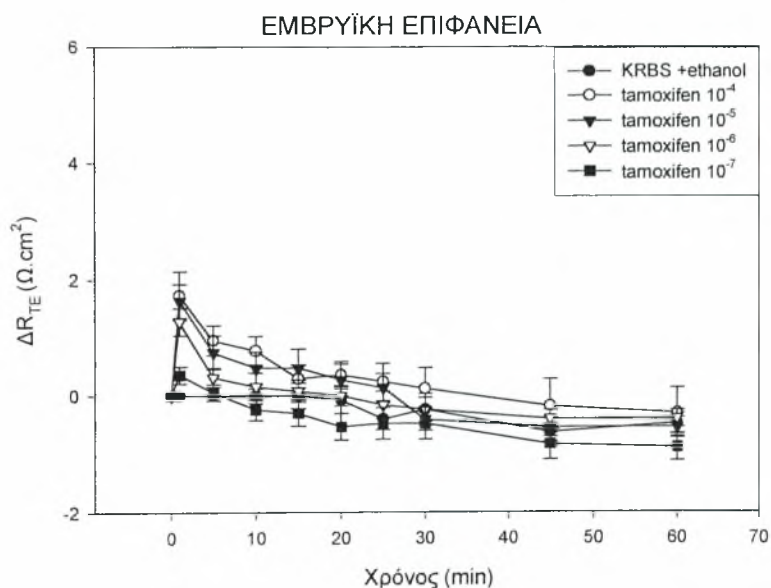
συγκέντρωση 10^{-4} M, $4.3 \pm 0.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P < 0.001$) για τη συγκέντρωση 10^{-5} M, $1.9 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.001$) για τη συγκέντρωση 10^{-6} M και $1.2 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.004$) για τη συγκέντρωση 10^{-7} M (Σχήμα 8). Η R_{TE} παρέμεινε σημαντικά αυξημένη έως και το 5^ο λεπτό για τη συγκέντρωση 10^{-4} M και έως το 15^ο λεπτό για τη συγκέντρωση 10^{-5} M. Για τις άλλες δύο συγκεντρώσεις ήταν αυξημένη μόνο στο 1^ο λεπτό. Για τα ίδια χρονικά σημεία, υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τα πειράματα αναφοράς ($P < 0.05$). Η ΔR_{TE} στο 1^ο λεπτό της συγκέντρωσης 10^{-5} M, η οποία ήταν και η μέγιστη στη μητρική επιφάνεια των υμένων διέφερε σημαντικά από τις ΔR_{TE} των υπόλοιπων συγκεντρώσεων ($P < 0.05$). Συγκριτικά με τη μέγιστη ΔR_{TE} στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων, η οποία παρατηρήθηκε στο 1^ο λεπτό με την συγκέντρωση 10^{-4} M, οι δύο τιμές δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους.



Σχήμα 8. Επίδραση της 17β-οιστραδιόλης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Ταμοξιφαίνη

Η χορήγηση της ταμοξιφαίνης στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων μετέβαλε την R_{TE} , προκαλώντας μία αύξηση στο 1^ο λεπτό μετά τη χορήγηση της. Η ΔR_{TE} ήταν $1.7 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.04$) για τη συγκέντρωση 10^{-4} M, $1.6 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.00.1$) για τη συγκέντρωση 10^{-5} M και $1.3 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.015$) για τη συγκέντρωση 10^{-6} M, ενώ η συγκέντρωση 10^{-7} M δεν επέφερε καμία σημαντική μεταβολή στην R_{TE} (Σχήμα 9). Η διάρκεια της αύξησης ήταν έως το 5^ο λεπτό για τη συγκέντρωση 10^{-4} M και 10^{-5} M. Μετά ακολούθησε σταδιακή επαναφορά των τιμών της R_{TE} προς την αρχική τιμή. Στη συγκέντρωση 10^{-6} M, από το 20^ο λεπτό και έως το τέλος των πειραμάτων εμφανίσθηκε μία πολύ μικρή μείωση της τάξης του $0.4 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, στατιστικά σημαντική ($P < 0.015$).

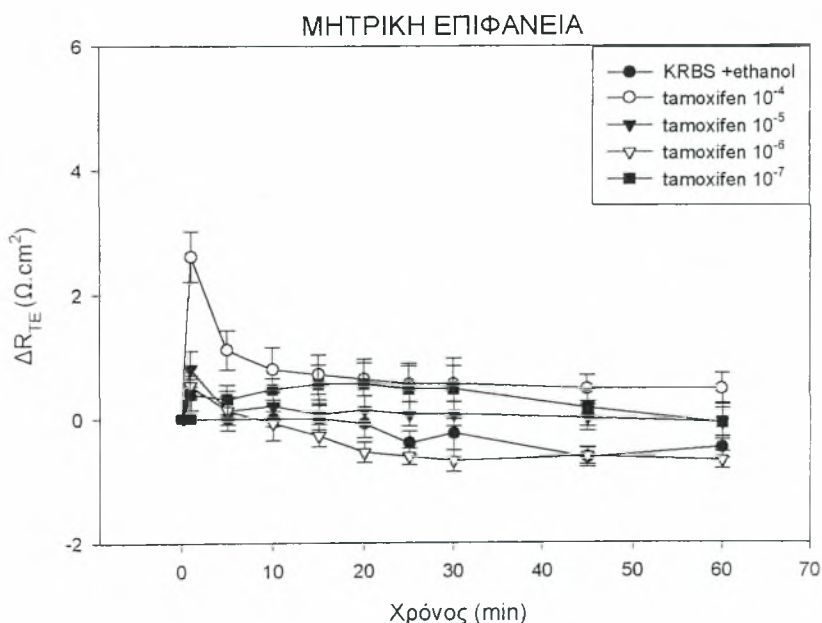


Σχήμα 9. Επίδραση της ταμοξιφαίνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στην εμβρυϊκή επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Συγκριτικά με τα πειράματα αναφοράς, η συγκέντρωση 10^{-4} M διέφερε σημαντικά στο 1^ο, 5^ο και 10^ο λεπτό, η 10^{-5} M στο 1^ο και 5^ο λεπτό, ενώ η 10^{-6} M

και η 10^{-7} M στο 1^ο λεπτό ($P < 0.05$). Συγκρινόμενες μεταξύ τους οι συγκεντρώσεις 10^{-4} M, 10^{-5} M και 10^{-6} M δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές ως προς την επίδρασή τους στην R_{TE} . Σε σχέση με την 10^{-7} M οι συγκεντρώσεις 10^{-4} M και 10^{-5} M διέφεραν σημαντικά από το 1^ο έως το 5^ο λεπτό ($P < 0.05$).

Όταν η ταμοξιφαίνη προστέθηκε στη μητρική επιφάνεια των υμένων προκάλεσε ταχεία αύξηση της R_{TE} σε σύγκριση με την αρχική τιμή στις συγκεντρώσεις 10^{-4} και 10^{-5} M, μικρής διάρκειας. Συγκεκριμένα, η ΔR_{TE} στο 1^ο λεπτό ήταν $2.6 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.001$) για τη συγκέντρωση 10^{-4} M και $0.8 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.03$) για τη συγκέντρωση 10^{-5} M. Η συγκέντρωση 10^{-6} M δεν προκάλεσε αύξηση, αντίθετα από το 20^ο έως το 60^ο λεπτό παρατηρήθηκε μείωση στατιστικά σημαντική ($P < 0.005$) (Σχήμα 10). Συγκριτικά με τα πειράματα αναφοράς, η συγκέντρωση 10^{-4} M διέφερε σημαντικά στο 1^ο, 5^ο, 45^ο και 60^ο λεπτό, η 10^{-5} M στο 1^ο και η 10^{-6} M στο 1^ο λεπτό.



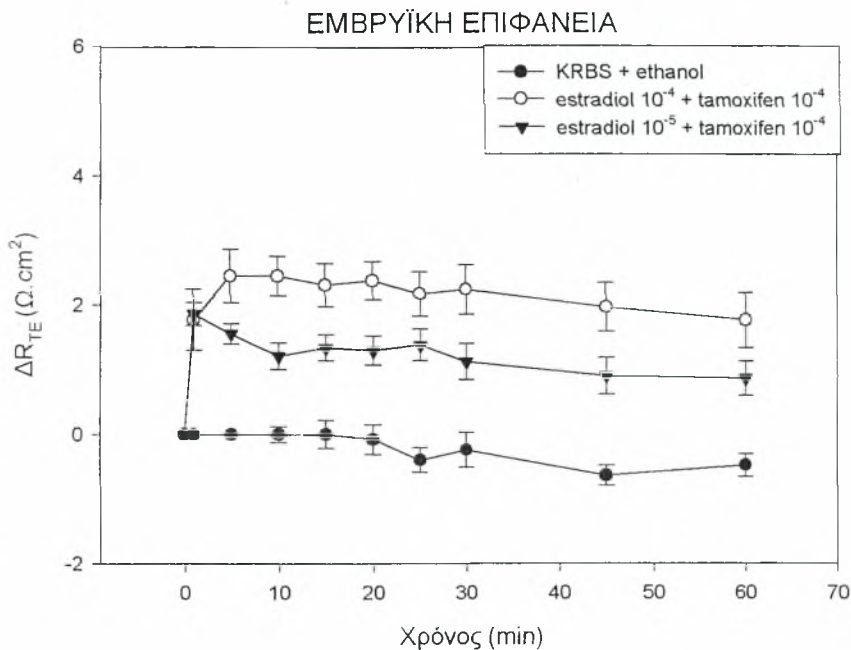
Σχήμα 10. Επίδραση της ταμοξιφαίνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Μεταξύ τους οι συγκεντρώσεις είχαν τις εξής διαφορές: η 10^{-4} M με τη 10^{-5} M στο 1° και 5° λεπτό και η 10^{-4} M με τη 10^{-6} M στο 1° λεπτό και από το 15° έως το 60° λεπτό ($P < 0.05$). Η ΔR_{TE} στο 1° λεπτό της συγκέντρωσης 10^{-4} M, η οποία ήταν και η μέγιστη στη μητρική επιφάνεια των υμένων δεν διέφερε σημαντικά από τη μέγιστη ΔR_{TE} της συγκέντρωσης 10^{-4} M στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων.

17β-οιστραδιόλη και ταμοξιφαίνη

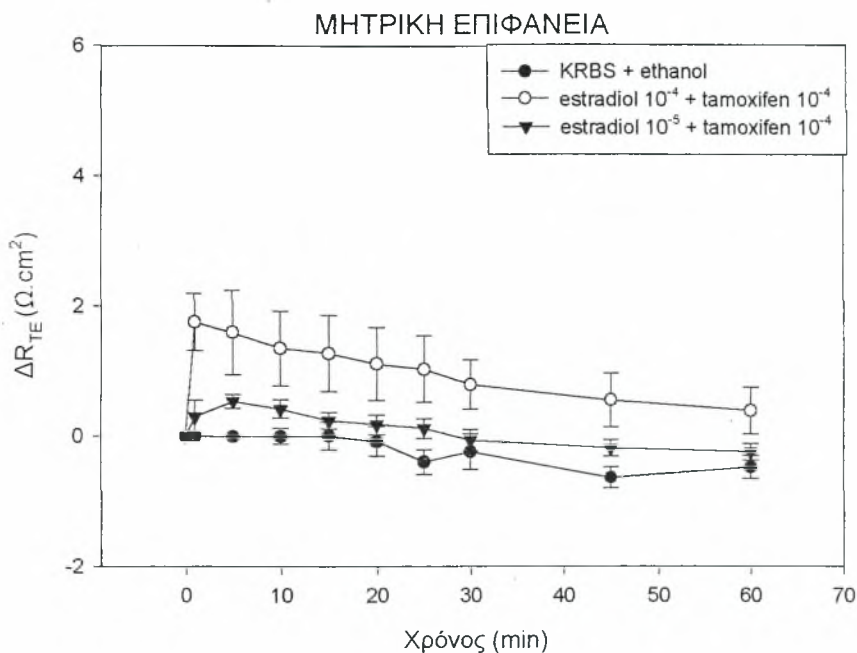
Η σύγχρονη χορήγηση των δύο ουσιών στην εμβρυϊκή επιφάνεια προκάλεσε σημαντική αύξηση της R_{TE} σε σχέση με την αρχική τιμή. Και οι δύο συνδυασμοί που χρησιμοποιήθηκαν (10^{-4} M οιστραδιόλη+ 10^{-4} M ταμοξιφαίνη και 10^{-5} M οιστραδιόλη+ 10^{-4} M ταμοξιφαίνη) αύξησαν την R_{TE} στο 1° λεπτό κατά $1.8 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P < 0.01$). Στη συνέχεια, ο πρώτος συνδυασμός προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της R_{TE} , με μέγιστη τιμή στο 5° λεπτό ($\Delta R_{TE} = 2.4 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P < 0.01$). Με αυτούς τους δύο συνδυασμούς, η R_{TE} παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη από τη βασική τιμή και από τις τιμές των πειραμάτων αναφοράς για όλη την περίοδο του πειράματος ($P < 0.05$), ενώ μεταξύ τους υπήρχε σημαντική διαφορά από το 10° έως το 45° λεπτό ($P < 0.05$) (Σχήμα 11).

Σε σχέση με τη μέγιστη ΔR_{TE} της 10^{-4} M οιστραδιόλης στο 1° λεπτό, η ΔR_{TE} του συνδυασμού 10^{-4} M οιστραδιόλη+ 10^{-4} M ταμοξιφαίνη ήταν σημαντικά μικρότερη ($P = 0.007$). Αντίθετα, δεν υπήρχε διαφορά με τη μέγιστη τιμή της ταμοξιφαίνης 10^{-4} M. Όσον αφορά όμως, τη διάρκεια του αποτελέσματος ο συνδυασμός των δύο ουσιών προκάλεσε παρατεταμένη αύξηση και δημιουργία οροπεδίου, όπως και η οιστραδιόλη.



Σχήμα 11. Επίδραση της ταμοξιφαίνης και της 17β-οιστραδιόλης, σε δύο συνδυασμούς, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη τους στην εμβρυϊκή επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Όταν οι ίδιοι συνδυασμοί χορηγήθηκαν στη μητρική επιφάνεια των υμένων προκάλεσαν επίσης μια αύξηση της R_{TE} . Η ΔR_{TE} ήταν $1.7 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.01$) για το συνδυασμό 10^{-4} M οιστραδιόλη και 10^{-4} M ταμοξιφαίνη. Ο συνδυασμός 10^{-5} M οιστραδιόλη και 10^{-4} M ταμοξιφαίνη προκάλεσε μία μικρή αύξηση της R_{TE} , η οποία εμφανίσθηκε το 5^ο λεπτό από τη χορήγηση των ουσιών ($\Delta R_{TE}=0.6 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.002$) και παρέμεινε έως το 10^ο λεπτό.



Σχήμα 12. Επίδραση της ταμοξιφαίνης και της 17β-οιστραδιόλης, σε δύο συνδυασμούς, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη τους στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

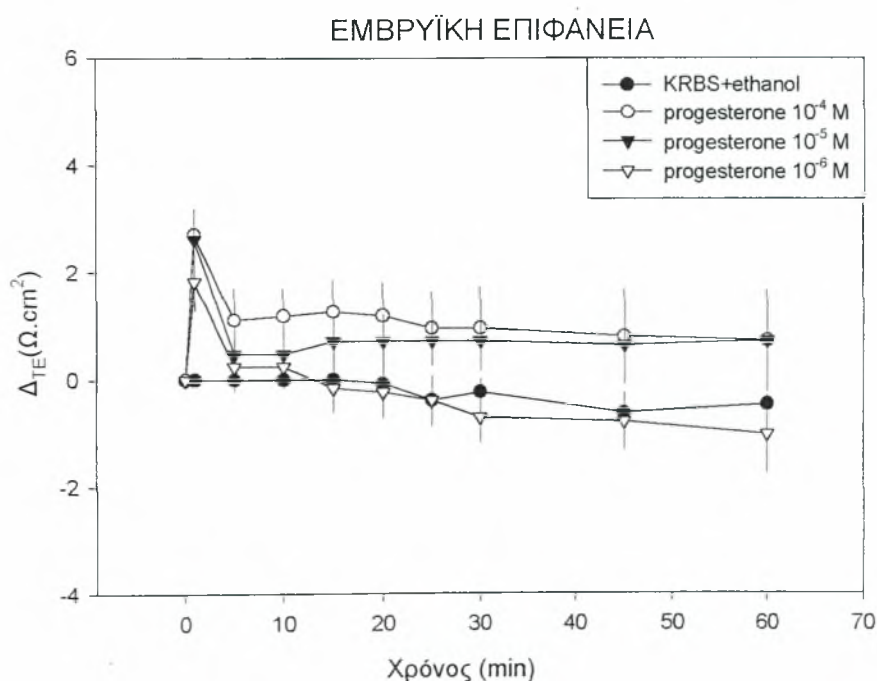
Σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς, η R_{TE} με τον πρώτο συνδυασμό διέφερε σημαντικά από το 1^ο έως το 10^ο λεπτό ($P < 0.05$) και με το δεύτερο συνδυασμό στο 5^ο και 10^ο λεπτό ($P < 0.05$) (Σχήμα 12). Μεταξύ τους οι δύο συνδυασμοί διέφεραν στο 1^ο λεπτό ($P = 0.02$). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις τιμές της ΔR_{TE} υπό την επίδραση του συνδυασμού 10^{-4} M οιστραδιόλη και 10^{-4} M ταμοξιφαίνη μεταξύ μητρικής και εμβρυϊκής επιφάνειας των υμένων.

Συγκριτικά με τη μέγιστη ΔR_{TE} του συνδυασμού οιστραδιόλης-ταμοξιφαίνης στη μητρική επιφάνεια στο 1^ο λεπτό υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά από τη μέγιστη ΔR_{TE} της οιστραδιόλης 10^{-5} M ($P < 0.01$), όχι όμως από τη μέγιστη τιμή της ταμοξιφαίνης 10^{-4} M, ενώ η διάρκεια του αποτελέσματος ήταν ανάλογη της οιστραδιόλης. Και στις δύο επιφάνειες των υμένων, οι μεγαλύτερες

αυξήσεις παρατηρήθηκαν με την οιστραδιόλη, ενώ η ταμοξιφαίνη και ο συνδυασμός οιστραδιόλης-ταμοξιφαίνης είχαν ανάλογα αποτελέσματα.

Προγεστερόνη

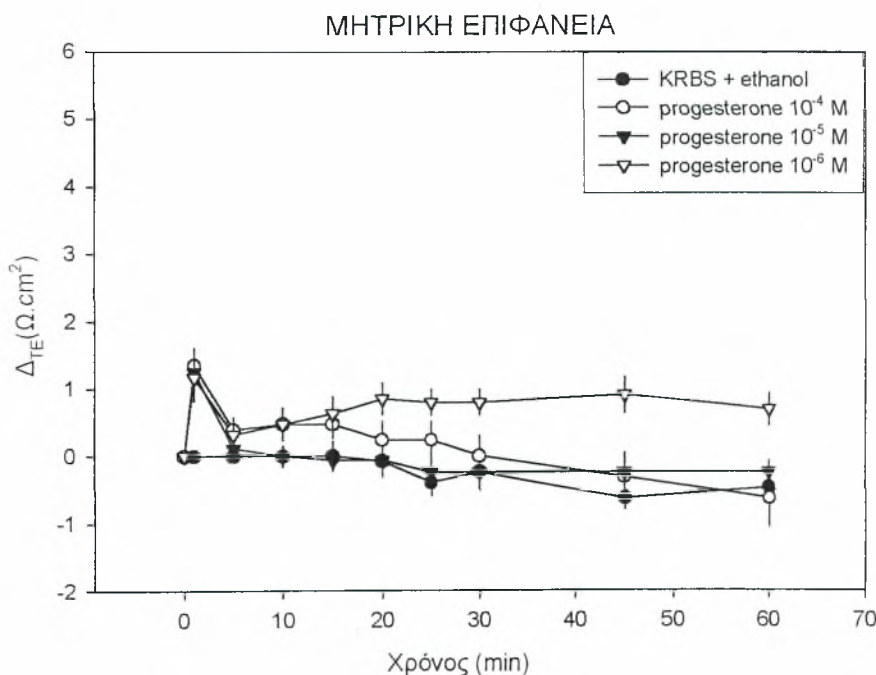
Η χορήγηση της προγεστερόνης στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων είχε ως αποτέλεσμα μία στατιστικώς σημαντική αύξηση της R_{TE} σε σχέση με τη βασική τιμή προ της χορήγησης (Σχήμα 13). Η αύξηση ήταν τύπου αιχμής, με μέγιστη τιμή κατά το 1^ο λεπτό από τη χορήγηση. Η μέγιστη αύξηση παρατηρήθηκε με τις συγκεντρώσεις 10^{-4} M ($\Delta R_{TE}=2.7\pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.002$) και 10^{-5} M ($\Delta R_{TE}=2.6\pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.006$), ενώ με τη συγκέντρωση 10^{-6} M η ΔR_{TE} ήταν $1.8\pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.018$). Αυτές οι τιμές στο 1^ο λεπτό και στις τρεις συγκεντρώσεις ήταν σημαντικά υψηλότερες από τα πειράματα αναφοράς ($P<0.05$).



Σχήμα 13. Επίδραση της προγεστερόνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στην εμβρυϊκή επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Στη συνέχεια η ΔR_{TE} επανήλθε σταδιακά σε επίπεδα πλησίον της βασικής τιμής για όλη την υπόλοιπη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές της ΔR_{TE} ανάμεσα στις διάφορες συγκεντρώσεις, καθώς και με τα πειράματα αναφοράς για το χρονικό διάστημα μεταξύ 5^{ου} και 60^{ου} λεπτού. Η συγκέντρωση 10^{-7} M της προγεστερόνης δεν επέφερε καμία μεταβολή στην R_{TE} .

Όταν η προγεστερόνη προστέθηκε στη μητρική επιφάνεια των υμένων, παρατηρήθηκε επίσης, μία άμεση αύξηση της R_{TE} στο 1^ο λεπτό από τη χορήγηση συγκριτικά με τη βασική τιμή. Η ΔR_{TE} ήταν $1.3 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.003$) για τη συγκέντρωση 10^{-4} M, $1.2 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.001$) για τη συγκέντρωση 10^{-5} M και $1.2 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.01$) για τη συγκέντρωση 10^{-6} M.



Σχήμα 14. Επίδραση της προγεστερόνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

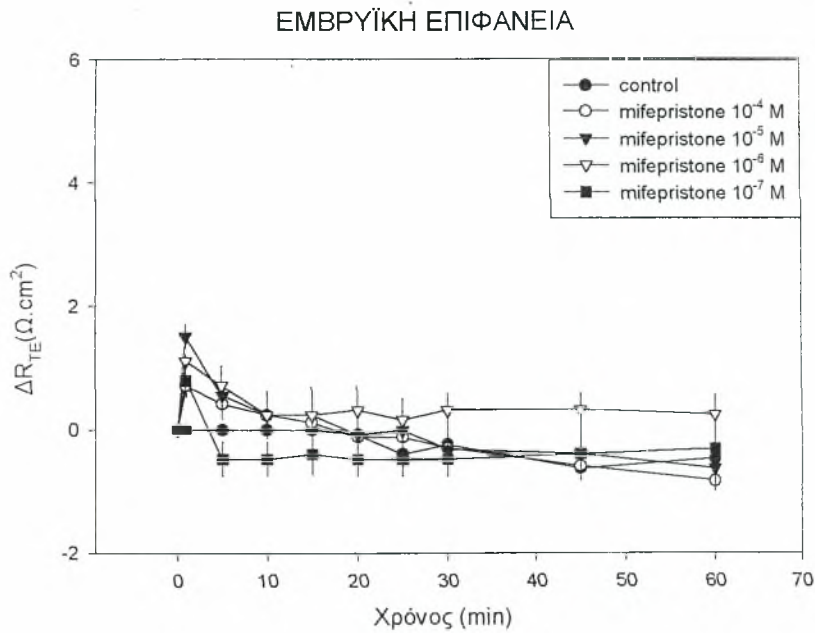
Στη συνέχεια, η R_{TE} επανερχόταν σταδιακά προς τα επίπεδα της βασικής τιμής. Η συγκέντρωση όμως 10^{-4} M διατήρησε σημαντικά υψηλότερες τιμές της

R_{TE} από τις αρχικές έως το 15^ο λεπτό ($P < 0.05$). Η συγκέντρωση 10^{-6} M προκάλεσε εκτός από την αρχική αύξηση της R_{TE} στο 1^ο λεπτό και μία δεύτερη προοδευτική αύξηση της R_{TE} από το 5^ο έως το 15^ο λεπτό ($P < 0.007$), η οποία ήταν στατιστικά σημαντική και τα επίπεδα παρέμειναν αυξημένα έως το τέλος του πειράματος. Σημαντικές διαφορές στη ΔR_{TE} από τα πειράματα αναφοράς ($P < 0.05$) υπήρχαν στο 1^ο λεπτό για όλες τις συγκεντρώσεις και από το 20^ο έως το 60^ο λεπτό για τη συγκέντρωση 10^{-6} M ($P < 0.05$). Η συγκέντρωση 10^{-7} M δεν μετέβαλε την R_{TE} (Σχήμα 14).

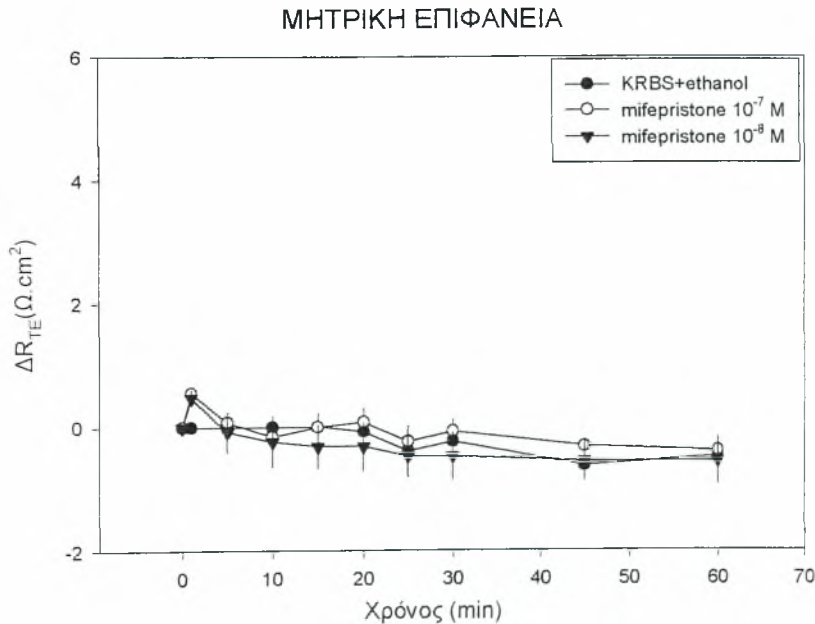
Μιφεπριστόνη

Η χορήγηση της μιφεπριστόνης στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων αύξησε την R_{TE} στο 1^ο λεπτό σημαντικά πάνω από τη βασική τιμή με όλες τις συγκεντρώσεις (με τη συγκέντρωση 10^{-4} M η ΔR_{TE} ήταν $0.7 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P = 0.001$, με τη 10^{-5} M $1.5 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P = 0.001$, με τη 10^{-6} M $1.1 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P < 0.001$ και με τη 10^{-7} M $0.8 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P = 0.031$). Οι τιμές της R_{TE} στο 1^ο λεπτό με όλες τις συγκεντρώσεις διέφεραν σημαντικά από τις τιμές των πειραμάτων αναφοράς ($P < 0.05$). Εν συνεχεία, η R_{TE} μειώθηκε σταδιακά, αλλά για τη συγκέντρωση 10^{-4} M η τιμή στο 5^ο λεπτό ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την τιμή των πειραμάτων αναφοράς ($P < 0.05$) (Σχήμα 15). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις τιμές της R_{TE} μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων.

Όταν η μιφεπριστόνη προστέθηκε στη μητρική επιφάνεια των υμένων στις υψηλές συγκεντρώσεις (10^{-4} - 10^{-6} M) δεν επηρέασε καθόλου την R_{TE} . Αντίθετα, στις συγκεντρώσεις 10^{-7} M ($P = 0.001$) και 10^{-8} M ($P = 0.012$) η μιφεπριστόνη αύξησε τη R_{TE} σημαντικά συγκριτικά με τη βασική τιμή στο 1^ο λεπτό. Οι τιμές στο σημείο αυτό διέφεραν σημαντικά από τις τιμές των πειραμάτων αναφοράς ($P < 0.05$) (Σχήμα 16).



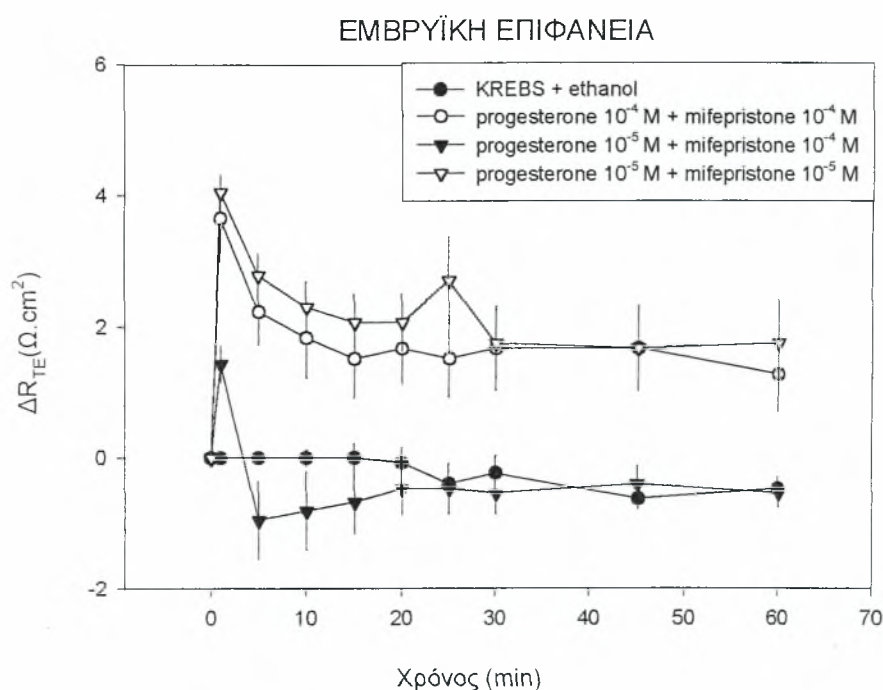
Σχήμα 15. Επίδραση της μιφεπριστόνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στην εμβρυϊκή επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.



Σχήμα 16. Επίδραση της μιφεπριστόνης, σε διάφορες συγκεντρώσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

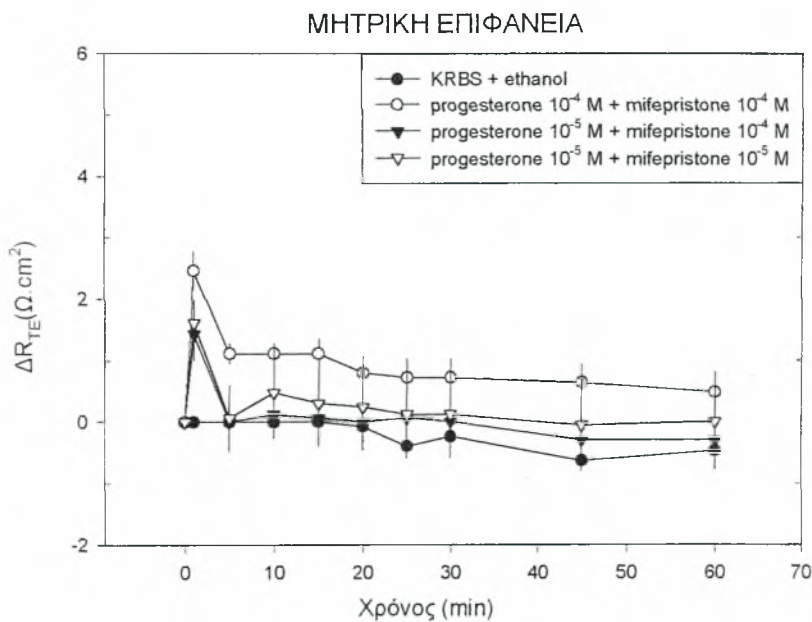
Προγεστερόνη και μιφεπριστόνη

Η σύγχρονη χορήγηση των δύο ουσιών στην εμβρυϊκή επιφάνεια προκάλεσε σημαντική αύξηση της R_{TE} σε σχέση με την αρχική τιμή, παρατεταμένης διάρκειας και αθροιστικής επίδρασης. Ο συνδυασμός 10^{-4} M προγεστερόνη και 10^{-4} M μιφεπριστόνη αύξησε την R_{TE} κατά $3.7 \pm 0.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.003$), ενώ όταν οι συγκεντρώσεις ήταν 10^{-5} M προγεστερόνη και 10^{-5} M μιφεπριστόνη $4.0 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P<0.001$). Με τους δύο αυτούς συνδυασμούς, η R_{TE} παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη από τη βασική τιμή και από τις τιμές αναφοράς για όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ($P<0.05$). Όταν η προγεστερόνη ήταν 10^{-5} M και η μιφεπριστόνη 10^{-4} M, παρατηρήθηκε μία αύξηση της R_{TE} μόνο στο 1^ο λεπτό ($\Delta R_{TE} = 1.4 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.002$), η οποία είχε διάρκεια μικρότερη των 5 λεπτών (Σχήμα 17).



Σχήμα 17. Επίδραση της προγεστερόνης και της μιφεπριστόνης, σε διάφορους συνδυασμούς, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη τους στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων.

Η χορήγηση των παραπάνω συνδυασμών στη μητρική επιφάνεια των υμένων προκάλεσε μία παρόμοια αύξηση. Ο συνδυασμός 10^{-4} M προγεστερόνη και 10^{-4} M μιφεπριστόνη οδήγησε σε μεταβολή της R_{TE} στο 1° λεπτό ($\Delta R_{TE} = 2.5 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.001$), η οποία παρέμεινε έως το 20° λεπτό ($P < 0.05$). Όταν οι συγκεντρώσεις ήταν 10^{-5} M προγεστερόνη και 10^{-5} M μιφεπριστόνη, η ΔR_{TE} ήταν $1.6 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.003$) στο 1° λεπτό, ενώ με το συνδυασμό 10^{-5} M προγεστερόνη και 10^{-4} M μιφεπριστόνη $1.4 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.012$). Η μεταβολή της R_{TE} είχε διάρκεια μικρότερη των 5 λεπτών. Ο συνδυασμός 10^{-4} M προγεστερόνη και 10^{-4} M μιφεπριστόνη διέφερε σημαντικά από τον συνδυασμό 10^{-5} M προγεστερόνη και 10^{-4} M μιφεπριστόνη ως προς τις τιμές της R_{TE} στα 5, 10, 15 και 45 λεπτά καθώς και από τα πειράματα αναφοράς στις ίδιες χρονικές στιγμές ($P < 0.05$) (Σχήμα 18).



Σχήμα 18. Επίδραση της προγεστερόνης με τη μιφεπριστόνη, σε διάφορους συνδυασμούς, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη τους στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Σε όλες τις περιπτώσεις (προγεστερόνη, μιφεπριστόνη, συνδυασμοί προγεστερόνης και μιφεπριστόνης) η μέγιστη μεταβολή της R_{TE} στο 1° λεπτό

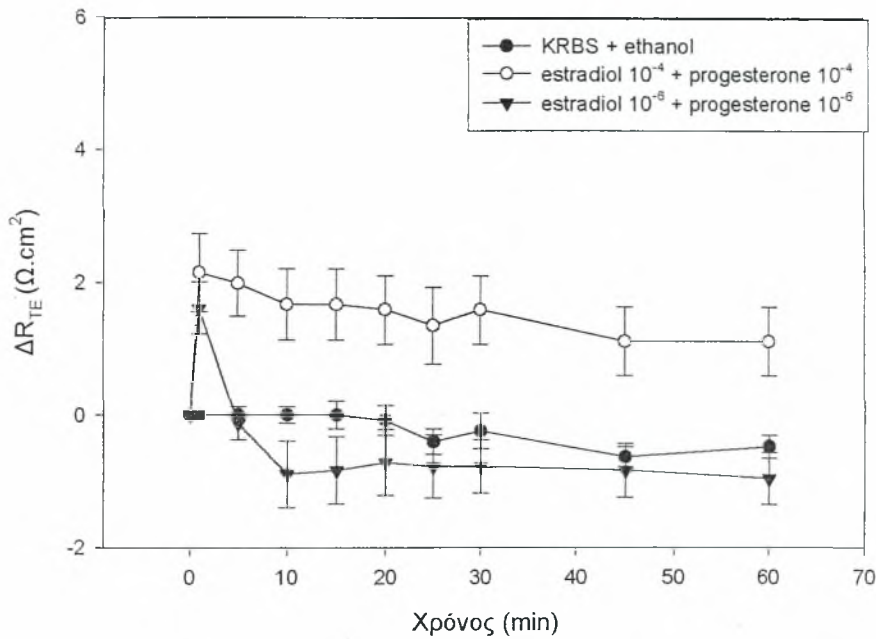
ήταν μεγαλύτερη στην εμβρυϊκή από εκείνη στη μητρική επιφάνεια ($P < 0.05$). Και στις δύο επιφάνειες, οι μεγαλύτερες αυξήσεις παρατηρήθηκαν με τους συνδυασμούς προγεστερόνης και μιφεπριστόνης (P+M) και οι μικρότερες με τη μιφεπριστόνη (M), ενώ η προγεστερόνη (P) είχε τιμές ενδιάμεσες. Οι διαφορές ήταν σημαντικές ανάμεσα σε P+M και M ($P < 0.001$), P+M και P ($P < 0.05$) και P και M ($P < 0.05$) και για τις δύο πλευρές των υμένων.

17β-οιστραδιόλη και προγεστερόνη

Η σύγχρονη χορήγηση των δύο στεροειδών ορμονών στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της R_{TE} . Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός 10^{-4} M οιστραδιόλη και 10^{-4} M προγεστερόνη προκάλεσε στο 1^ο λεπτό μία αύξηση της τάξης των $2.1 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.015$), ενώ ο συνδυασμός 10^{-6} M οιστραδιόλη και 10^{-6} M προγεστερόνη προκάλεσε μία αύξηση της τάξης των $1.6 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.005$). Για τον πρώτο συνδυασμό, η ΔR_{TE} παρέμεινε σημαντικά αυξημένη έως το 30^ο λεπτό ($P < 0.03$), ενώ για το δεύτερο συνδυασμό από το 5^ο λεπτό και μετά η τιμή της R_{TE} μειώθηκε σταδιακά προς την προ της χορήγησης τιμή. Συγκριτικά με τα αντίστοιχα πειράματα αναφοράς, οι τιμές της R_{TE} του πρώτου συνδυασμού διέφεραν σημαντικά σε όλες τις χρονικές περιόδους ($P < 0.03$), ενώ του δεύτερου συνδυασμού μόνο στο 1^ο λεπτό ($P = 0.005$). Οι δύο συνδυασμοί μεταξύ τους διέφεραν ως προς τις τιμές της R_{TE} από το 5^ο έως το 60^ο λεπτό της πειραματικής διαδικασίας ($P < 0.05$). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 19.

Η ΔR_{TE} στο 1^ο λεπτό του πρώτου συνδυασμού ήταν σημαντικά μικρότερη από τη ΔR_{TE} της 17β οιστραδιόλης 10^{-4} M ($P = 0.02$) (Σχήμα 7), δεν διέφερε όμως από εκείνη της 10^{-4} M προγεστερόνης (Σχήμα 13). Η διάρκεια του αποτελέσματος του συνδυασμού ήταν παρατεταμένη, ανάλογη του αποτελέσματος της οιστραδιόλης. Στο δεύτερο συνδυασμό δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές από τις τιμές ΔR_{TE} της προγεστερόνης 10^{-6} M σε κανένα χρονικό σημείο, αλλά σε σχέση με την οιστραδιόλη 10^{-6} M υπήρχε διαφορά από το 5^ο έως το 60^ο λεπτό ($P < 0.02$).

ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ

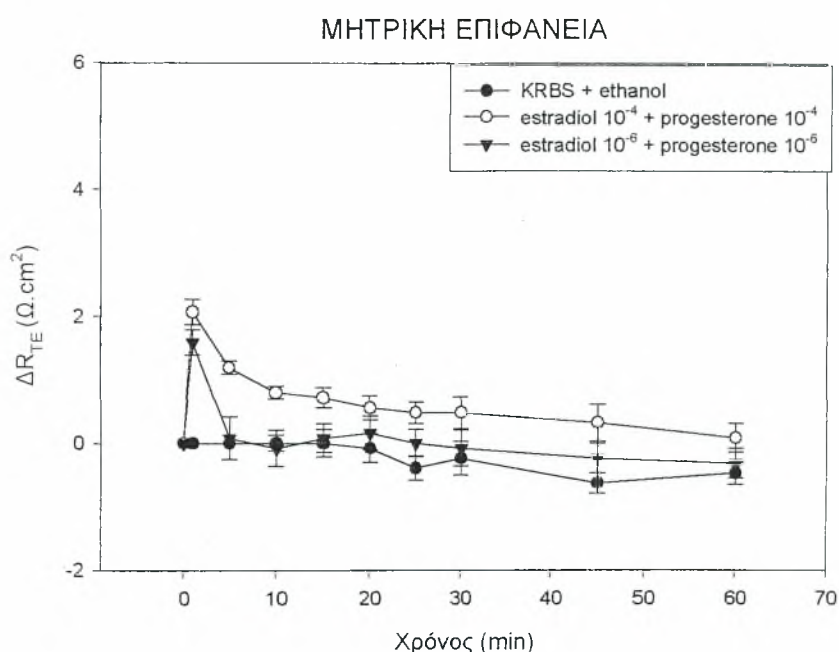


Σχήμα 19. Επίδραση της προγεστερόνης με την 17β-οιστραδιόλη, σε δύο συνδυασμούς, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη τους στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων.

Όταν οι ίδιοι συνδυασμοί χορηγήθηκαν στη μητρική επιφάνεια των υμένων, προκάλεσαν επίσης μία σημαντική αύξηση της R_{TE} ($\Delta R_{TE}=2.1\pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P<0.001$ για το συνδυασμό 10^{-4} M οιστραδιόλη και 10^{-4} M προγεστερόνη και $\Delta R_{TE}=1.6\pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.001$ για το συνδυασμό 10^{-6} M οιστραδιόλη και 10^{-6} M προγεστερόνη), η οποία εμφανίστηκε στο 1^ο λεπτό και η διάρκεια της ήταν έως το 25^ο λεπτό για τον πρώτο συνδυασμό ($P<0.05$). Για το δεύτερο συνδυασμό, η διάρκεια ήταν βραχύτερη και η ΔR_{TE} , μετά την αρχική αύξηση, επανήλθε σε επίπεδα παρόμοια με αυτά προ της χορήγησης. Οι δύο συνδυασμοί διέφεραν μεταξύ τους ως προς τις τιμές της R_{TE} στο 5^ο, 10^ο, και 15^ο λεπτό ($P<0.05$), ενώ σε σχέση με τα πειράματα αναφοράς υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά έως το 30^ο λεπτό για το συνδυασμό 10^{-4} M οιστραδιόλη και 10^{-4} M

προγεστερόνη και στο 1^ο λεπτό για το συνδυασμό 10⁻⁶ M οιστραδιόλη και 10⁻⁶ M προγεστερόνη (Σχήμα 20).

Η μέγιστη ΔR_{TE} , η οποία εμφανίστηκε με το συνδυασμό 10⁻⁴ M οιστραδιόλη και 10⁻⁴ M προγεστερόνη στο 1^ο λεπτό, διέφερε σημαντικά από τη μέγιστη τιμή της οιστραδιόλης 10⁻⁵ M στην αντίστοιχη επιφάνεια (P=0.009) (Σχήμα 8), δεν διέφερε όμως από εκείνη της προγεστερόνης 10⁻⁴ M (Σχήμα 14).



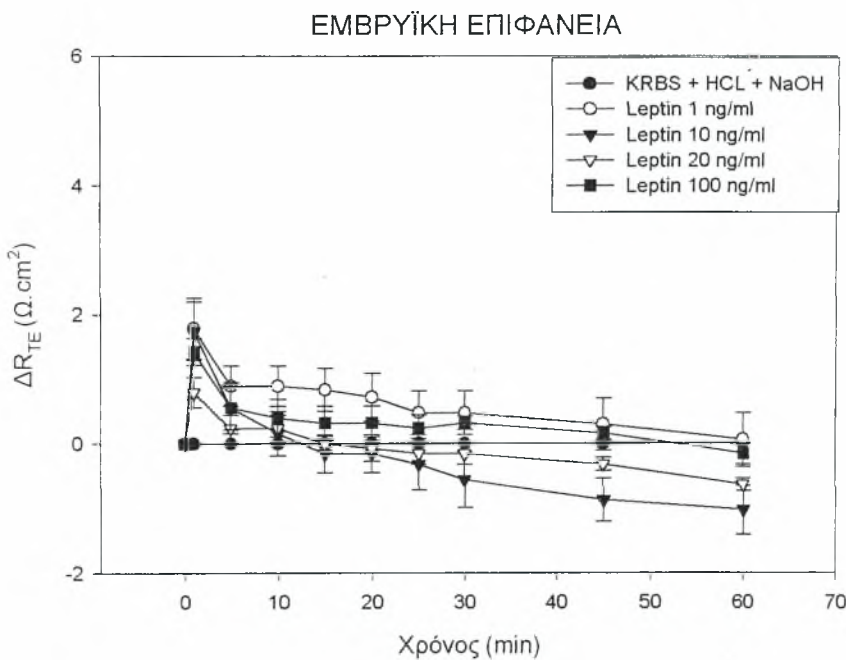
Σχήμα 20. Επίδραση της προγεστερόνης με την 17β-οιστραδιόλη, σε δύο συνδυασμούς, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη τους στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Και στις δύο επιφάνειες των υμένων ο συνδυασμός 10⁻⁴ M οιστραδιόλη και 10⁻⁴ M προγεστερόνη προκάλεσε το ίδιο αποτέλεσμα, ανάλογο της προγεστερόνης ως προς το μέγεθος και ως προς την οιστραδιόλη ως προς τη διάρκεια. Επίσης, και στις δύο επιφάνειες η μέγιστη αύξηση ΔR_{TE} εμφανίστηκε μετά την προσθήκη της οιστραδιόλης, η οποία ήταν σημαντικά υψηλότερη από

την αύξηση που προκάλεσε η προγεστερόνη ($P=0.02$ για την εμβρυϊκή επιφάνεια και $P=0.009$ για τη μητρική επιφάνεια).

Λεπτίνη

Η προσθήκη λεπτίνης στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικώς σημαντική αύξηση της R_{TE} σε σύγκριση με τη βασική τιμή όπως φαίνεται στο Σχήμα 21. Η ΔR_{TE} στο 1^ο λεπτό ήταν $1.8 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.007$) για τη δόση 1ng/ml, $1.7 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.012$) για τη δόση 10 ng/ml, $0.8 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.02$) για τη δόση 20 ng/ml και $1.4 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.001$) για τη δόση 100 ng/ml. Οι τιμές αυτές διέφεραν σημαντικά από τις τιμές στα πειράματα αναφοράς ($P<0.05$). Στη δόση 1ng/ml, η αύξηση στην R_{TE} παρέμεινε έως το 15^ο λεπτό ($P<0.05$).



Σχήμα 21. Επίδραση της λεπτίνης, σε διάφορες δόσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη της στην εμβρυϊκή επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Στις δόσεις 10 και 20 ng/ml στο 45° και 60° λεπτό παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση ($P < 0.05$). Μεταξύ των διαφόρων δόσεων δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ως προς τη ΔR_{TE} .

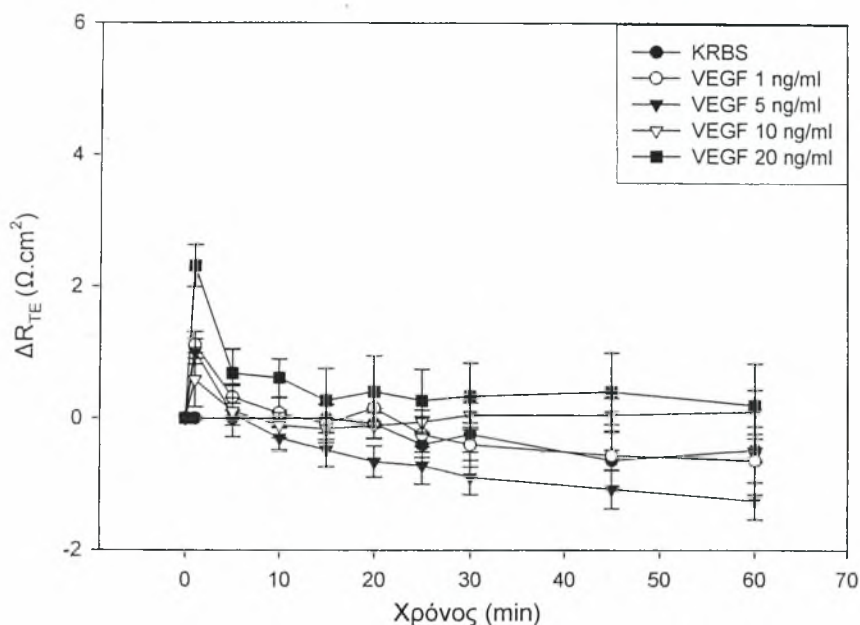
Η προσθήκη της λεπτίνης στη μητρική επιφάνεια των υμένων προκάλεσε αύξηση της R_{TE} στο 1° λεπτό, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικώς σημαντική σε καμία δόση.

VEGF

Όταν ο VEGF προστέθηκε στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων είχε ως αποτέλεσμα μία σημαντική αύξηση της R_{TE} στο 1° λεπτό. Η ΔR_{TE} για τη δόση 1 ng/ml ήταν $1.1 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.03$), για τη δόση 5 ng/ml $1.0 \pm 0.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P = 0.01$) και για τη δόση 20 ng/ml $2.3 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P < 0.001$). Η δόση 10 ng/ml δεν είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο Σχήμα 22. Οι τιμές αυτές της ΔR_{TE} διέφεραν σημαντικά από εκείνες στα πειράματα αναφοράς ($P < 0.05$). Συγκρινόμενες μεταξύ τους οι διάφορες δόσεις, στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς τις τιμές της ΔR_{TE} βρέθηκε ανάμεσα στη δόση 20 ng/ml και τις τρεις υπόλοιπες δόσεις στο 1° λεπτό ($P < 0.05$). Μετά το 1° λεπτό η τιμή της R_{TE} επανήλθε στα βασικά επίπεδα.

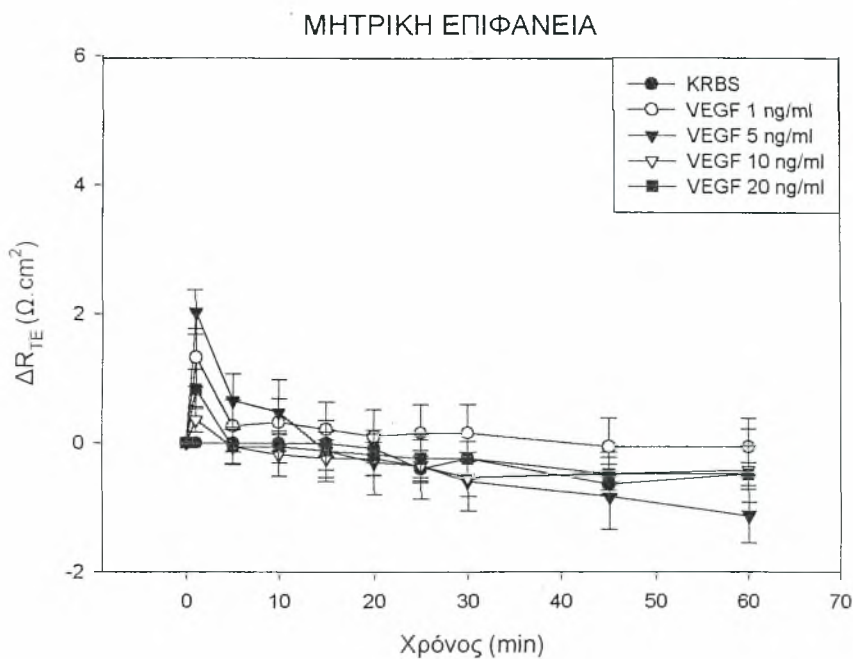
Η δόση 5 ng/ml μετά την αρχική αύξηση του 1^{ου} λεπτού και την επαναφορά στη βασική τιμή προκάλεσε την εμφάνιση περαιτέρω μείωσης στατιστικά σημαντικής, από το 20° λεπτό έως το πέρας της πειραματικής διαδικασίας ($P < 0.04$).

ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ



Σχήμα 22. Επίδραση του VEGF, σε διάφορες δόσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη του στην εμβρυϊκή επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

Στη μητρική επιφάνεια των υμένων ο VEGF είχε ανάλογο αποτέλεσμα. Η μέγιστη αύξηση της R_{TE} παρατηρήθηκε στο 1^ο λεπτό με τις δόσεις 5 ng/ml ($\Delta R_{TE} = 2.0 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.01$) και 1 ng/ml ($\Delta R_{TE} = 1.3 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $P=0.018$), ενώ με τη δόση 20 ng/ml η ΔR_{TE} ήταν $0.8 \pm 0.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($P=0.03$). Η δόση 10 ng/ml δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Οι τιμές τις ΔR_{TE} στο 1^ο λεπτό και στις τρεις δόσεις ήταν σημαντικά υψηλότερες από εκείνες στα πειράματα αναφοράς ($P < 0.05$). Συγκρινόμενες μεταξύ τους, οι τιμές τις ΔR_{TE} διέφεραν σημαντικά μεταξύ της δόσης 5 ng/ml και των δόσεων 10 και 20 ng/ml στο 1^ο λεπτό. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 23.



Σχήμα 23. Επίδραση του VEGF, σε διάφορες δόσεις, στη διεπιθηλιακή αντίσταση μετά από προσθήκη του στη μητρική επιφάνεια των εμβρυϊκών υμένων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί υμένες έχουν τα χαρακτηριστικά πορώδους μεμβράνης. Η διεπιθηλιακή διαφορά δυναμικού είναι πολύ μικρή, πλησίον του μηδενός (Welsch, 1981, Hardy et al, 1989), ενώ η διεπιθηλιακή αντίσταση, η οποία υπολογίσθηκε στην παρούσα μελέτη, ήταν $29.4 \pm 0.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Η τιμή αυτή ήταν πολύ χαμηλή, κυμαινόμενη μεταξύ των τιμών, οι οποίες αναφέρονται για εξαιρετικά διαπερατές μεμβράνες ($4-400 \Omega \cdot \text{cm}^2$), όπως είναι το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο και η χοληδόχος κύστη του κουνελιού (Fromter and Diamond, 1972). Σε μετρήσεις, οι οποίες έγιναν σε πειραματόζωα και συγκεκριμένα σε υμένες χοιριδίων, η R_{TE} παρουσίασε μια διακύμανση από $84 \Omega \cdot \text{cm}^2$ κατά μέσον όρο σε υμένες μικρής ηλικίας κύησης έως $162 \Omega \cdot \text{cm}^2$ σε τελειόμηνους υμένες (Rice et al, 1991). Η ανατομία όμως των υμένων είναι διαφορετική από τους ανθρώπινους, αφού αποτελούνται από άμνιο και αλλαντοϊκή μεμβράνη. Σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς υμένες, μετρήθηκε η αγωγιμότητα (G) των υμένων, η οποία βρέθηκε πολύ υψηλή (Hardy et al, 1989). Δεδομένου ότι η αντίσταση και η αγωγιμότητα είναι μεγέθη αντιστρόφως ανάλογα, μπορούμε να πιθανολογήσουμε την ύπαρξη μικρής αντίστασης στους ανθρώπινους υμένες.

Η επίδραση ορμονών στη διαπερατότητα των εμβρυϊκών υμένων έχει δειχθεί σε μελέτες σε πειραματόζωα. Διάφορες εργασίες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της προγεστερόνης και των οιστρογόνων στο αμνιακό και το αλλαντοϊκό υγρό επηρέασε τη διαπερατότητα των υμένων καθώς και τον όγκο του αμνιακού και του αλλαντοϊκού υγρού (Knight et al, 1977), ενώ και ο λόγος προγεστερόνη προς οιστραδιόλη είχε σχέση με τον όγκο του αλλαντοϊκού υγρού (Bazer et al, 1981, Wintour et al, 1986). Σε υμένες χοιριδίων τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη του αμνιακού υγρού ρύθμισαν τη διαπερατότητα των υμένων σε ηλεκτρολύτες (Rice et al, 1993).

Στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά εξετάσθηκε η επίδραση ορμονών στην R_{TE} ανθρώπινων υμένων *in vitro*.

1. 17β-οιστραδιόλη και Ταμοξιφαίνη

Τα πειράματα μας έδειξαν ότι η οιστραδιόλη αύξησε την R_{TE} όταν προστέθηκε και στις δύο επιφάνειες τελειόμηνων ανθρώπινων υμένων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μελέτες σε πειραματόζωα, οι οποίες έδειξαν αύξηση της R_{TE} στο τέλος της κύησης και αντίστοιχη μείωση της διαπερατότητας των υμένων (Rice et al, 1993).

Η επίδραση της οιστραδιόλης ήταν άμεση και δεν ανεστάλη πλήρως από την ταμοξιφαίνη. Το αποτέλεσμα της εμφανίσθηκε στο 1^ο λεπτό, η αύξηση δηλαδή της R_{TE} ήταν τύπου αιχμής και η διάρκεια της κυμάνθηκε έως τα 30 λεπτά. Τα χαρακτηριστικά αυτά υποδεικνύουν ένα μη γενομικό τρόπο δράσης της οιστραδιόλης στους υμένες. Ανάλογα αποτελέσματα μη γενομικής δράσης της οιστραδιόλης έχουν περιγραφεί και σε άλλους ιστούς, όπως τα κύτταρα του μυομητρίου (Pietras and Szego, 1975) και της υπόφυσης (Duffy et al, 1979), τα ωκύτταρα (Tesarik et al, 1995), οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες (Somjen et al, 1997), τα κύτταρα του υπεζωκότα, όπου και σε αυτά η οιστραδιόλη προκάλεσε ταχεία αύξηση της R_{TE} (Hatzoglou et al, 2002), τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου (McNamara et al, 2000) κ.α. Στα κύτταρα του αμνιακού επιθηλίου έχει ήδη αναφερθεί ταχεία επίδραση των οιστρογόνων στην έκκριση του αραχιδονικού οξέος από αυτά μέσω δέσμευσης μεμβρανικών υποδοχέων, όμοιων αν όχι ίδιων με τους υποδοχείς "β" (Fiorini et al, 2003).

Ο τρόπος δράσης της οιστραδιόλης στα κύτταρα αυτά μπορεί να ερμηνευθεί μέσω πέντε πιθανών μηχανισμών:

- α. Των κλασσικών ενδοκυττάρων υποδοχέων.
- β. Διαμεμβρανικών υποδοχέων.
- γ. Υποδοχέων νευροδιαβιβαστών, όπως είναι ο υποδοχέας του γ-αμινο-βουτυρικού οξέος.
- δ. Μεταβάλλοντας τις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών της. Αυτό συμβαίνει συνήθως στις μεγάλες συγκεντρώσεις, όπως αυτές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της

μελέτης αυτής. Λόγω της μεγάλης λιποφιλίας τους, οι στεροειδείς ορμόνες μεταβάλουν τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και τη διάταξη των πρωτεϊνών, επηρεάζοντας έτσι τη διαπερατότητα των υμένων.

ε. Ενεργοποιώντας δεύτερους διαβιβαστές (Schmidt et al, 2000, Falkenstein et al, 2000).

Ο τρόπος με τον οποίο η οιστραδιόλη προκάλεσε ταχείες αλλαγές στην R_{TE} των εμβρυϊκών υμένων δεν είναι γνωστός. Μία πιθανή οδός είναι η ρύθμιση των ιόντων Ca^{++} . Μεταβολές στη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου Ca^{++} έχουν αναφερθεί σε κύτταρα του μυομητρίου, καρκινικά κύτταρα του μαστού, οστεοβλάστες και κύτταρα του κοιλιακού επιθηλίου. Οι μεταβολές προκαλούνται από αλλαγές στη λειτουργία των καναλιών Ca^{++} (Schmidt et al, 2000). Στο ανθρώπινο εντερικό επιθήλιο, η οιστραδιόλη προκαλεί ταχεία αλκαλοποίηση του ενδοκυττάριου χώρου, μεταβάλλοντας τη μεταφορά K^+ και η δράση της αυτή εξαρτάται από την ανταλλαγή των ιόντων Na^+/H^+ και από την πρωτεϊνική κινάση C (McNamara et al, 2000). Επίσης, ελέγχει την κίνηση των ιόντων Cl^- και τους διαύλους K^+/Ca^{++} μέσω του συστήματος των πρωτεϊνικών κινασών A και C (Harvey et al, 2001 και 2002).

Ένας άλλος τρόπος είναι μέσω της αύξησης του cAMP, λόγω ταχείας ενεργοποίησης της μεμβρανικής αδενοκυκλάσης και μεταβολής της πρόσληψης Ca^{++} , ρύθμισης της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (Moreno and Franci, 2004), της ενδοθηλίνης-1 και των εικοσανοειδών (White et al, 1995). Ο ρόλος του NO στη διαπερατότητα διαφόρων ιστών έχει προκαλέσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον (Lemancewicz et al, 2000). Έχει βρεθεί ότι το NO μεταβάλλει τη διαπερατότητα ενδοθηλιακών κυττάρων της ομφαλικής και της πνευμονικής αρτηρίας μειώνοντας την, ενώ αντίθετα αυξάνει τη διαπερατότητα της ομφαλικής φλέβας (Westendorp et al, 1994). Η 17β οιστραδιόλη έχει βρεθεί ότι διεγείρει ταχέως την παραγωγή NO από τα κύτταρα της πνευμονικής εμβρυϊκής αρτηρίας, μέσω ενός Ca^{++} -εξαρτώμενου μηχανισμού και της τυροσινικής κινάσης (Cho et al, 1999).

Τέλος, τα οιστρογόνα επιδρούν και στην παρακυττάρια οδό, μεταβάλλοντας το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων και επιφέροντας

αντίστοιχες αλλαγές στους μεσοκυττάριους χώρους και τη διαπερατότητα τους. Σε κύτταρα κοιλιακού επιθηλίου προκάλεσαν αλλαγές στον κυτταροσκελετό των κυττάρων, μειώνοντας το μέγεθος τους και αυξάνοντας την ελαστικότητα τους (Gorodeski, 2001). Ένας άλλος τρόπος μεταβολής της ίδιας οδού είναι η τροποποίηση των αποφρακτικών συνδέσεων των κυττάρων μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C και της αντίστασης των βασικών μεσοκυττάρων διαστημάτων, σύμφωνα με μελέτες σε κύτταρα ανθρώπινου ενδοθηλίου (Ye et al, 2003) και κοιλιοτραχηλικού επιθηλίου (Gorodeski, 2001, 2005).

Η ταμοξιφαίνη ανέστειλε μερικώς τη δράση της οιστραδιόλης, όταν οι δύο ουσίες συγχωρηγήθηκαν. Η ίδια η ταμοξιφαίνη μόνη της αύξησε την R_{TE} των υμένων, όταν προστέθηκε και στις δύο επιφάνειες των υμένων. Το αποτέλεσμα της ήταν γρήγορο, βραχείας διάρκειάς και μικρότερο από αυτό της οιστραδιόλης. Ήταν δραστική μόνο στις μεγάλες συγκεντρώσεις και η μητρική επιφάνεια ήταν πιο ευαίσθητη στη συγκεκριμένη ουσία σε σχέση με την εμβρυϊκή. Μία μικρή μείωση παρουσιάστηκε μετά την παρέλευση 20 λεπτών από τη χορήγηση στη συγκέντρωση 10^{-6} M, χωρίς να υπάρχει αντίστοιχο αποτέλεσμα σε καμία άλλη συγκέντρωση. Το αποτέλεσμα αυτό εμφανίστηκε και από τις δύο επιφάνειες των υμένων.

Η αγωνιστική δράση της ταμοξιφαίνης, η οποία είναι ανεξάρτητη της ύπαρξης υποδοχέων οιστρογόνων, έχει αναγνωρισθεί σε διάφορα είδη κυττάρων. Έτσι, έχει βρεθεί ότι η ταμοξιφαίνη επηρεάζει την ευαισθησία κυττάρων σε φάρμακα, αναστέλλει την οστική απορρόφηση και την οστεοπόρωση και επηρεάζει τη διαπερατότητα βιολογικών μεμβρανών και τη διεγερσιμότητα των κυττάρων, μεταβάλλοντας τη λειτουργία ιοντικών καναλιών της κυτταρικής μεμβράνης, όπως είναι οι δίαυλοι Cl^- και Ca^{++} . Τα αποτελέσματα αυτά οφείλονται σε αναστολή της P-γλυκοπρωτεΐνης, της καλμοδουλίνης και απευθείας δράσης στα ίδια τα κανάλια των ιόντων (Chen et al, 1999).

Ο τρόπος δράσης της ταμοξιφαίνης, όπως και στην περίπτωση της οιστραδιόλης μπορεί να είναι, εκτός από τον κλασσικό μέσω υποδοχέων,

άμεσος μη γενομικός. Τέτοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε κύτταρα του μαζικού αδένου, σε κύτταρα της υπόφυσης και του υπεζωκότα (Hatzoglou et al, 2001, Kallio et al, 2005).

Ο μηχανισμός δράσης της ταμοξιφαίνης στους υμένες είναι άγνωστος. Η ταμοξιφαίνη έχει την ιδιότητα να αλληλεπιδρά με τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα των κυτταρικών μεμβρανών και τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με μη ειδικό τρόπο. Η σύνδεση αυτή προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία και τη δομή των κυττάρων. Αυτό έχει δειχθεί σε καρκινικά κύτταρα μαζικού αδένου και σε ανθρώπινα ερυθροκύτταρα, όπου επιφέρει ρήξη της κυτταρικής τους μεμβράνης και αιμόλυση (Cruz- Silva et al, 2001). Εκτός από τις δομικές αλλαγές, η ταμοξιφαίνη μεταβάλλει, όπως ήδη αναφέρθηκε, την κίνηση διαφόρων ιόντων, όπως του K^+ , Ca^{++} , Cl^+ , OH^- καθώς και την εισροή πρωτονίων στα κύτταρα. Με τον τρόπο αυτό, η ταμοξιφαίνη επηρεάζει το διαμεμβρανικό pH (Chen et al, 1999). Οι αλλαγές στο pH επηρεάζουν την παρακυττάρια διαπερατότητα (Porta et al, 1989).

Ο συνδυασμός οιστραδιόλης και ταμοξιφαίνης προκάλεσε μερική αναστολή του αποτελέσματος της οιστραδιόλης. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή ενός οιστρογονικού υποδοχέα (ενδεχομένως διαμεμβρανικού), ο οποίος ενεργοποιείται από την οιστραδιόλη και αναστέλλεται από την ταμοξιφαίνη. Η μη πλήρης όμως αναστολή του αποτελέσματος της οιστραδιόλης κάνει φανερή την ύπαρξη και άλλων μηχανισμών, οι οποίοι κινητοποιούνται και από τις δύο ουσίες. Επιπλέον, η διάρκεια της επίδρασης του συνδυασμού των δύο ουσιών ήταν παρατεταμένη, ανάλογη της οιστραδιόλης. Διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ διαφορετικών μεμβρανικών υποδοχέων έχει περιγραφεί σε διάφορους ιστούς (Hatzoglou et al, 1995).

2. Προγεστερόνη και Μιφεπριστόνη

Στην παρούσα εργασία, η προγεστερόνη αύξησε την R_{TE} όταν προστέθηκε στην εμβρυϊκή και μητρική επιφάνεια των υμένων. Η επίδραση

της ορμόνης αυτής ήταν άμεση, μέσα στο 1^ο λεπτό και προκάλεσε αύξηση της R_{TE} τύπου αιχμής. Η χορήγηση μιφεπριστόνης είχε και αυτή ανάλογα αποτελέσματα με την προγεστερόνη, αλλά μικρότερης έντασης και διάρκειας. Έχει αποδειχθεί σε διάφορους ιστούς ότι η μιφεπριστόνη είναι ανταγωνιστής της προγεστερόνης μέσω δράσης της στους υποδοχείς της προγεστερόνης. Στην παρούσα μελέτη, η συγχορήγηση των δύο ουσιών δεν ανέστειλε τη δράση της προγεστερόνης, αντίθετα ενίσχυσε το αποτέλεσμα της. Με βάση την ταχύτητα δράσης και την αδυναμία αναστολής του αποτελέσματος με τη χρήση του ανταγωνιστή, το αποτέλεσμα της προγεστερόνης δεν μπορεί να ερμηνευθεί με τον κλασικό τρόπο δράσης μέσω των ενδοκυττάρων υποδοχέων της, αλλά μέσω μιας μη γενομικής οδού.

Η μη γενομική δράση της προγεστερόνης είναι γνωστή σε διάφορους ιστούς, αλλά πρώτη φορά ανιχνεύθηκε σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς υμένες. Όσον αφορά στη μιφεπριστόνη, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την αγωνιστική της δράση σε διάφορους ιστούς, ενώ μη γονιδιακές δράσεις έχουν βρεθεί και για την ουσία αυτή σε μακροφάγα κύτταρα και σε κύτταρα ανθρώπινου μυομητρίου, μέσω ενεργοποίησης συστήματος δεύτερων διαβιβαστών (πρωτεϊνικές κινάσες και cAMP) (Nordeen et al, 1993 και 1995, Roberts et al, 1995, Lobaccaro-Henri et al, 1996).

Οι πιθανοί μηχανισμοί, οι οποίοι ενεργοποιούνται από αυτές τις ουσίες, όπως και στην περίπτωση της οιστραδιόλης μπορεί να είναι: μέσω ειδικών υποδοχέων, διαμεμβρανικών ή ενδοκυττάρων (Schmidt et al, 2000), αλληλεπιδρώντας με τα λιπίδια ή/και τις πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών, ενεργοποιώντας δεύτερους διαβιβαστές (Falkenstein et al, 2000) ή μεταβάλλοντας την παραγωγή του NO (Westendorp et al, 1994, Dennes et al, 1997, Shi et al, 2003, Vaisanen-Tommiska et al, 2006).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η προγεστερόνη και η μιφεπριστόνη είχαν συνεργική δράση, όταν χορηγήθηκαν μαζί και στις δύο επιφάνειες των υμένων. Το αποτέλεσμα του συνδυασμού τους ήταν σχεδόν το άθροισμα του αποτελέσματος κάθε ουσίας χωριστά. Αυτό υποδεικνύει ότι οι ουσίες έδρασαν μέσω διαφορετικών μηχανισμών, που ο ένας δεν ανέστειλε

τον άλλο. Το γεγονός ότι η μιφεπριστόνη δεν ανέστειλε το αποτέλεσμα της προγεστερόνης δείχνει ότι δεν ήταν πιθανή η εμπλοκή κλασικών υποδοχέων της προγεστερόνης, ενώ η ενδεχόμενη ενεργοποίηση διαμεμβρανικού υποδοχέα από την προγεστερόνη δεν μπόρεσε να ανασταλεί από τη μιφεπριστόνη.

Επίσης, οι δύο πλευρές των υμένων δεν αντέδρασαν με τον ίδιο τρόπο στις δύο ουσίες. Η εμβρυϊκή επιφάνεια ήταν πιο ευαίσθητη, κυρίως στην προγεστερόνη και λιγότερο στη μιφεπριστόνη. Από την άλλη μεριά, η μητρική επιφάνεια παρουσίασε καλύτερη απάντηση στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις και για τις δύο ουσίες. Ο λόγος για τον οποίο παρατηρήθηκε αυτό είναι άγνωστος. Πιθανόν, οι υψηλές συγκεντρώσεις να προκάλεσαν κορεσμό των υπεύθυνων μηχανισμών σε αυτή την επιφάνεια των υμένων.

Ο τρόπος με τον οποίο η προγεστερόνη αύξησε την R_{TE} δεν είναι γνωστός. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η μεταβολή στο σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ταχεία μεταφορά ύδατος, η οποία συνοδεύει συνήθως μεταφερόμενα ιόντα (Na^+-Cl^-), ή σε οξείες αλλαγές του κυτταροσκελετού. Η προγεστερόνη ρυθμίζει τη Na^+-K^+ -ΑΤΡαση, τη μεταφορά K^+ (Davis et al, 1978) και τη λειτουργία των καναλιών Ca^{++} . Στα χοιρίδια, η προγεστερόνη επάγει τη λειτουργία της αντλίας Na^+-K^+ -ΑΤΡάση στη αλλαντοχοριακή μεμβράνη και ρυθμίζει την ενεργητική μεταφορά του Na^+ προς τα εκτός του αλλαντοϊκού χώρου (Rice et al, 1993). Σε υπεζωκότα προβάτου, επίσης, προκαλεί αύξηση της R_{TE} ταχέως, πιθανών μέσω μεταβολής της παραγωγής NO (Hatzoglou et al, 2001). Και η μιφεπριστόνη πιθανόν να έδρασε μέσω του NO, αφού έχει βρεθεί ότι ελέγχει την παραγωγή του και διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Roberts et al, 1995). Ο ρόλος του NO στη διαπερατότητα των εμβρυϊκών υμένων χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

3. Προγεστερόνη και Οιστραδιόλη

Όταν οι δύο στεροειδείς ορμόνες χορηγήθηκαν μαζί, η αύξηση την οποία προκάλεσαν στην R_{TE} δεν ήταν το αθροιστικό αποτέλεσμα της δράσης των δύο ορμονών. Αντίθετα, το αποτέλεσμα και των δύο μαζί ήταν μικρότερο σε σχέση με αυτό της κάθε ορμόνης χωριστά στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων και μικρότερο της οιστραδιόλης αλλά μεγαλύτερο της προγεστερόνης στη μητρική επιφάνεια των υμένων. Ο λόγος για τον οποίο συνέβη αυτό είναι άγνωστος. Είναι πιθανό η παρουσία και των δύο ορμονών σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις να προκάλεσε κορεσμό της οδού δράσης ή η μία ορμόνη να ανταγωνίσθηκε την άλλη. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι ο λόγος τους (προγεστερόνη/οιστραδιόλη) ήταν αυτός ο οποίος επηρέασε τη διαπερατότητα των υμένων (Rice et al, 1993), ενώ αντίθετη δράση των δύο ορμονών έχει βρεθεί στους εμβρυϊκούς υμένες σε ό,τι αφορά στη δέσμευση της ωκυτοκίνης και την ευαισθησία των υποδοχέων της σε αυτή. Συγκεκριμένα, η οιστραδιόλη αυξάνει την παραγωγή ωκυτοκίνης από τους υμένες και τους υποδοχείς της (Chibbar et al, 1995), ενώ η προγεστερόνη αναστέλλει τη δέσμευση της ωκυτοκίνης στους υποδοχείς της στους υμένες, μέσω μη γενομικού μηχανισμού (Dunlap and Stormshak, 2004). Επίσης, σε υμένες κουνελιού έχει βρεθεί ότι ενώ τα οιστρογόνα επάγουν το σχηματισμό υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, η προγεστερόνη αναστέλλει το σχηματισμό των οιστρογονικών υποδοχέων (Khan-Dawood and Dawood, 1984).

4. Λεπτίνη

Η λεπτίνη δεν προκάλεσε σημαντική μεταβολή στην R_{TE} όταν προστέθηκε στη μητρική επιφάνεια των υμένων. Η προσθήκη της στην εμβρυϊκή επιφάνεια είχε ως αποτέλεσμα μία αύξηση της R_{TE} στο 1^ο λεπτό, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της R_{TE} μετά την παρέλευση 45 λεπτών στις

δόσεις 10 και 20 ng/ml. Αυτό σημαίνει ότι η λεπτίνη είχε επίδραση μόνο στο αμνιακό επιθήλιο και ο τρόπος δράσης της είναι διπλός.

Η λεπτίνη είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη διαπερατότητα διαφόρων επιθηλίων και τη λειτουργία διαφόρων πρωτεϊνών-φορέων (Anim-Nyame et al, 2003). Στο κροσσωτό εντερικό επιθήλιο αυξάνει την απορρόφηση ολιγοπεπτιδίων μέσω ειδικών πρωτεϊνών-φορέων, ενώ μειώνει τη ενεργητική απορρόφηση γλυκόζης, αναστέλλοντας την αντλία νατρίου-γλυκόζης (SGLT-1). Επίσης, μειώνει τη μεταφορά τριγλυκεριδίων αναστέλλοντας την απολιποπρωτεΐνη AIV. Αντίθετα, σε καλλιέργεια κυτταρικής σειράς CaCO-2 αυξάνει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης-φορέα μονοκαρβοξυλάσης (Ducroc et al, 2005).

Στους ανθρώπινους εμβρυϊκούς υμένες είναι η πρώτη ένδειξη ότι τροποποιεί τη R_{TE} . Η γρήγορη εμφάνιση αποτελέσματος υποδηλώνει άμεσο τρόπο δράσης, ανάλογο με των υπολοίπων ουσιών. Ο μηχανισμός τον οποίο ενεργοποίησε δεν είναι γνωστός, αλλά σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, η δράση παρατηρήθηκε μόνο στο αμνιακό επιθήλιο, το οποίο και έρχεται σε επαφή με το αμνιακό υγρό, που περιέχει ανάλογα επίπεδα της ορμόνης. Επίσης, παρουσιάζει και καθυστερημένο αποτέλεσμα, υποδεικνύοντας διπλό τρόπο δράσης. Το γεγονός ότι η λεπτίνη δεν είχε αποτέλεσμα στη μητρική επιφάνεια των υμένων *in vitro* δεν αποκλείει τη δράση της και *in vivo*. Επιπλέον, δεν αποκλείει τη δράση της λεπτίνης και την εμφάνιση αποτελέσματος μετά την παρέλευση 60 λεπτών. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν εξετάστηκε στη παρούσα μελέτη.

5. VEGF

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF προκάλεσε και αυτός μία ταχεία αύξηση της R_{TE} , όταν χορηγήθηκε στην εμβρυϊκή και μητρική επιφάνεια των υμένων. Το αποτέλεσμα αυτό εμφανίσθηκε στις δόσεις 1 και 5 ng/ml, καθώς και στην υψηλή δόση 20 ng/ml. Στην εμβρυϊκή επιφάνεια το μεγαλύτερο αποτέλεσμα διαπιστώθηκε με το πυκνότερο διάλυμα (20 ng/ml), ενώ

η μητρική επιφάνεια ήταν πιο ευαίσθητη στις πιο μικρές δόσεις (1 και 5 ng/ml). Εκτός όμως από την αύξηση της R_{TE} στο 1^ο λεπτό, ο VEGF στην δόση 5 ng/ml στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων οδήγησε σε μείωση της R_{TE} από το 20^ο λεπτό και μετά και συνεπώς, σε αύξηση της διαπερατότητας.

Μία από τις κύριες δράσεις του VEGF είναι και η ρύθμιση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου των αγγείων αλλά και άλλων ιστών (Anim-Nyame et al, 2003). Σε χοιρίδια έχει βρεθεί ότι προκαλεί ταχεία εξαγγείωση ύδατος και πρωτεϊνών διαμέσου του εμβρυϊκού δέρματος (Houck et al, 1992), ενώ αυξάνει και τη διαπερατότητα του μεσεντερίου στο βάτραχο (Bates et al, 1996).

Ο VEGF έχει μελετηθεί επισταμένως σε πειραματόζωα για το ρόλο, τον οποίο διαδραματίζει στην ομοιόσταση του αμνιακού υγρού. Σε υμένες προβάτου, ο VEGF είναι ο κύριος ρυθμιστής της ενεργητικής μεταφοράς υγρού και διαλυτών διαμέσου των υμένων (Daneshmand et al, 2003). Οι πιθανοί τρόποι με τους οποίους ο VEGF ρυθμίζει τη διαπερατότητα σε ζωικούς υμένες είναι οι εξής:

- Αυξάνει την επιφάνεια ανταλλαγής και συγκεκριμένα του αμνίου, δρώντας ως μιτογόνο στα κύτταρα του αμνιακού επιθηλίου. Μεγαλύτερη επιφάνεια ανταλλαγής επιτρέπει γρηγορότερη μετακίνηση υγρών και ουσιών (Cheung, 2004).

- Αυξάνει τη ροή αίματος στα διαμεμβρανικά αγγεία και τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου τους. Στον άνθρωπο, όμως, οι υμένες είναι ανάγγειοι και συνεπώς ο μηχανισμός αυτός δεν αφορά στους ανθρώπινους υμένες (Cheung, 2004).

- Αυξάνει την παθητική διάχυση μέσω των υμένων (Cheung, 2004).

- Επάγει την ενεργητική μεταφορά μέσω κυστιδίων ύδατος και διαλυτών. Τέτοια κυστίδια έχουν βρεθεί στα ενδοθηλιακά κύτταρα, σε υμένες προβάτων αλλά και σε κύτταρα ανθρώπινου αμνίου (King, 1982). Τα κυστίδια μπορούν να απορροφούν και να εκκρίνουν αμνιακό υγρό. Τα κυστίδια αυτά ονομάζονται καβεόλια και η πρωτεΐνη που τα σχηματίζει, η καβεολίνη-1 ανιχνεύεται σε υψηλά επίπεδα στον ανθρώπινο πλακούντα και το ενδοθήλιο των αγγείων του (Lyden et al, 2002).

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός ταχείας δράσης του VEGF είναι μέσω ρύθμισης της τοπικής παραγωγής του NO, ο οποίος με τη σειρά του επηρεάζει το σχηματισμό των καβεολίων, ενώ τέλος, ο VEGF μπορεί να προκαλέσει αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Κάτι τέτοιο έχει βρεθεί σε φλεβίδια μεταβάλλοντας τη μεταφορά μακρομορίων (Cheung, 2004).

Τέλος, στο ενδοθήλιο ο VEGF ρυθμίζει και την παρακυττάρια οδό προκαλώντας διάσπαση των χαλαρών συνδέσεων ανάμεσα στα κύτταρα ταχέως, μέσω έκκρισης ATP (Thuringer, 2004), ενώ έχει και εξωκυττάρια πρωτεολυτικές ιδιότητες μέσω του συστήματος της ουροκινάσης και των υποδοχέων της (Behzadian et al, 2003).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι ο VEGF δεν είχε επίδραση στη δόση 10 ng/ml, ενώ στη δόση 20 ng/ml εμφάνισε αποτέλεσμα. Ο λόγος για τον οποίο η δόση 10 ng/ml δεν έχει αποτέλεσμα υποδεικνύει κάποιο πιθανό μηχανισμό, ο οποίος εμφανίζει πιθανόν όριο κορεσμού καθώς αυξάνει η πυκνότητα του διαλύματος, ενώ η επανεμφάνιση αποτελέσματος στην αραιώση 20 ng/ml, μπορεί να σημαίνει την ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών, που ο ένας απαιτεί μικρές και ο άλλος μεγάλες δόσεις.

Ένα ακόμα ενδιαφέρον σημείο είναι ότι ο VEGF προκάλεσε μείωση της R_{TE} στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων, η οποία δεν εμφανίσθηκε άμεσα, αλλά μετά την παρέλευση χρονικού διαστήματος 20 λεπτών. Μια πιθανή ερμηνεία αυτής της συνδυασμένης δράσης του VEGF είναι η ενεργοποίηση δύο διαφορετικών οδών.

Ο ρόλος του VEGF στη διαπερατότητα των ανθρώπινων εμβρυϊκών υμένων μελετήθηκε για πρώτη φορά, ο δε τρόπος δράσης του, καθώς και η διερεύνηση του μηχανισμού με τον οποίο προκάλεσε μεταβολή της αντίστασης των υμένων χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

Συμπερασματικά, από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η ευρεθείσα ηλεκτρική αντίσταση του ανθρώπινου αμνιοχορίου επιβεβαιώνει την ήδη γνωστή πορώδη δομή του. Παρόλα αυτά, *in vitro* η διεπιθηλιακή αντίσταση αυτής της μεμβράνης μπορεί να ρυθμιστεί από ορμονικούς παράγοντες. Μεταβολές στην ηλεκτρική αντίσταση αντικατοπτρίζουν αλλαγές στη

διαπερατότητα των υμένων, την κίνηση των ιόντων με συνοδό μετακίνηση ύδατος και συνεπώς, αλλαγή στο μικροπεριβάλλον του κυττάρου. Η εμβρυϊκή και μητρική επιφάνεια των υμένων συμπεριφέρθηκαν διαφορετικά στην επίδραση των διαφόρων ορμονών. Αυτό σημαίνει και διαφορετική συμμετοχή της κάθε επιφάνειας στην ομοιόσταση του αμνιακού υγρού, η διατήρηση του οποίου είναι καίριας σημασίας για την επιτυχή έκβαση της κύησης και την καλή υγεία του νεογνού. Οι ορμόνες μπορούν να μεταβάλουν τόσο τη διακυτταρική ενεργητική οδό, όσο και την παρακυτταρική οδό μεταφοράς. Οι μεταβολές τις οποίες προκαλούν είναι άμεσες και υποδεικνύουν μη γενομικό τρόπο δράσης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης μπορούν να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Οι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί υμένες είναι μία πορώδης μεμβράνη, η ηλεκτρική αντίσταση της οποίας είναι πολύ χαμηλή και συμβαδίζει με τη χαμηλή, σχεδόν μηδενική διαφορά δυναμικού που έχει βρεθεί από άλλους ερευνητές στους υμένες.
2. Η ηλεκτρική αντίσταση των υμένων επηρεάζεται *in vitro* από την παρουσία ορμονικών παραγόντων.
3. Η 17β-οιστραδιόλη και η προγεστερόνη αύξησαν την ηλεκτρική αντίσταση των υμένων όταν χορηγήθηκαν και από στις δύο επιφάνειες των υμένων.
4. Ο τρόπος με τον οποίο έδρασαν οι στεροειδείς ορμόνες έχει τα χαρακτηριστικά του άμεσου, μη γενομικού τρόπου.
5. Οι ανταγωνιστές των συγκεκριμένων ορμονών ταμοξιφαίνη και μιφεπριστόνη αντίστοιχα είχαν και οι ίδιες άμεση αγωνιστική δράση στους υμένες και αύξησαν την αντίσταση των υμένων.
6. Η μη πλήρης αναστολή του αποτελέσματος των στεροειδών ορμονών, όταν συγχρηγήθηκαν μαζί με τους ανταγωνιστές τους, υποδεικνύει ότι η δράση τους δεν εμπλέκει τους κλασσικούς ενδοκυττάρους υποδοχείς τους.
7. Η λεπτή αύξησε άμεσα την ηλεκτρική αντίσταση των υμένων, όταν χορηγήθηκε στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων. Αντίθετα, όταν χορηγήθηκε στη μητρική επιφάνεια των υμένων δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην αντίσταση.
8. Ο αγγειακός αυξητικός ενδοθηλιακός παράγοντας μετέβαλε την αντίσταση των ανθρώπινων υμένων όταν χορηγήθηκε και στις δύο επιφάνειες των υμένων.
9. Η εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων έδειξε μεγαλύτερη αντίδραση στις παραπάνω ουσίες (εκτός από την ταμοξιφαίνη) σε σχέση με τη μητρική επιφάνεια.

10. Οι αλλαγές αυτές στην ηλεκτρική αντίσταση των εμβρυϊκών υμένων από τους ορμονικούς παράγοντες είναι πιθανό να ρυθμίζουν τη διαπερατότητα των υμένων *in vivo* και να συμμετέχουν στην ομοίωση του όγκου και της σύστασης του αμνιακού υγρού στη διάρκεια της κύησης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί υμένες, το άμνιο και το χόριο, αποτελούν τον αμνιακό σάκο μέσα στον οποίο περικλείεται το έμβρυο και το αμνιακό υγρό. Η διατήρηση και η ρύθμιση του όγκου και της σύστασης του αμνιακού υγρού είναι καθοριστικής σημασίας για τη συνέχιση της κύησης και την υγεία του εμβρύου. Οι παράγοντες οι οποίοι συμμετέχουν στην ομοιοστάση του αμνιακού υγρού δεν έχουν πλήρως αποσαφηνισθεί. Αν και οι υμένες αποτελούν μία ημιδιαπερατή, πορώδη μεμβράνη, η διακίνηση ύδατος και διαλυτών διαμέσου της παρακυττάριας και της διακυτταρικής οδού μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους παράγοντες. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να διερευνήσει την επίδραση ορμονικών παραγόντων στην ηλεκτρική αντίσταση (R_{TE}) ανθρώπινων εμβρυϊκών υμένων.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ακέραια τμήματα ανθρώπινων εμβρυϊκών υμένων από τελειόμηνες φυσιολογικές κυήσεις, τα οποία τοποθετήθηκαν σε μία αντλία τύπου Ussing, όπου οξυγονονόταν συνεχώς με 95% O_2 και 5% CO_2 . Με την εν λόγω πειραματική διάταξη μετρήθηκε η αναπτυσσόμενη διαφορά δυναμικού κατά μήκος των υμένων, όταν και από τις δύο πλευρές τους υπήρχε διάλυμα KRBS και με βάση το νόμο του Ohm υπολογίσθηκε η ηλεκτρική αντίσταση των υμένων R_{TE} . Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της οιστραδιόλης (10^{-4} - 10^{-7} M), της ταμοξιφαίνης (10^{-4} - 10^{-7} M) και του συνδυασμού τους, της προγεστερόνης (10^{-4} - 10^{-7} M), της μφεπριστόνης (10^{-4} - 10^{-8} M) και του συνδυασμού τους, της λεπτίνης (1, 10, 20 and 100 ng/ml) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF (1, 5, 10 και 20 ng/ml) στην R_{TE} . Η R_{TE} υπολογίσθηκε πριν και 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 και 60 λεπτά μετά από την προσθήκη της κάθε ουσίας. Όλες οι μετρήσεις έγιναν στους 37° C.

Η τιμή της R_{TE} πριν από τη χορήγηση των υπό μελέτη ουσιών υπολογίσθηκε ότι ήταν $29.1 \pm 0.4 \Omega \cdot cm^2$. Η οιστραδιόλη προκάλεσε αμέσως μετά τη χορήγησή της ταχεία αύξηση της R_{TE} στο 1^ο λεπτό, όταν προστέθηκε και από τις δύο επιφάνειες των υμένων. Ο ανταγωνιστής ταμοξιφαίνη είχε και αυτός άμεση αγωνιστική δράση όταν χορηγήθηκε μόνος του. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών δεν ανέστειλε πλήρως τη δράση της οιστραδιόλης, αλλά

επέφερε αποτέλεσμα και στις δύο πλευρές των υμένων. Η προγεστερόνη είχε ανάλογο αποτέλεσμα με την οιστραδιόλη, όπως επίσης, η μιφεπριστόνη και ο συνδυασμός τους, που σε αυτή την περίπτωση το αποτέλεσμά τους ήταν συνεργικό. Η λεπτίνη προκάλεσε και αυτή αύξηση της R_{TE} όταν προστέθηκε στην εμβρυϊκή επιφάνεια των υμένων. Αντίθετα, στη μητρική επιφάνεια δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Ο VEGF μετέβαλε και αυτός την R_{TE} αυξάνοντας την στο 1^ο λεπτό.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η R_{TE} των ανθρώπινων εμβρυϊκών υμένων επηρεάζεται από την επίδραση των στεροειδών ορμονών, της λεπτίνης και του VEGF. Οι αλλαγές αυτές στην αντίσταση των υμένων *in vitro* είναι πιθανόν να επηρεάζουν τη διαπερατότητα των υμένων *in vivo* κατά τη διάρκεια της κύησης.

SUMMARY

The factors that regulate human fetal membranes transport mechanisms are not known. The aim of this study was to investigate the effect of 17β estradiol, tamoxifen, progesterone, mifepristone, leptin and VEGF on transepithelial electrical resistance (R_{TE}) on human amniochorion. Fetal membranes from uncomplicated term pregnancies were obtained immediately after vaginal or cesarean deliveries. Intact pieces were mounted as planar sheets separating an Ussing chamber. Progesterone (10^{-4} - 10^{-7} M), mifepristone (10^{-4} - 10^{-8} M) and combinations of progesterone plus mifepristone, estradiol (10^{-4} - 10^{-7} M), tamoxifen (10^{-4} - 10^{-7} M) and combinations of estradiol plus tamoxifen, leptin (1, 10, 20 and 100 ng/ml) and VEGF (1, 5, 10 and 20 ng/ml) were applied to the chambers facing fetal or maternal side of the membranes. R_{TE} was measured before and 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 minutes after the addition of each solution at 37° C. R_{TE} was calculated in $\Omega.cm^2$ according to Ohm's law. Mean (\pm SEM) basal value of R_{TE} before the application of any substance of all experiments was $29.1\pm 0.4 \Omega.cm^2$. The net change of R_{TE} (ΔR_{TE}) in relation to basal value was calculated in each experiment. Progesterone, mifepristone and their combinations induced a rapid, surge-type increase in R_{TE} at first minute on both sides of the membranes. Estradiol and tamoxifen had a same rapid effect, but their combinations had a smaller effect than the effect of estradiol. Leptin induced an increase when applied to the fetal side, but it had no effect on the maternal side. VEGF altered the R_{TE} . The present results demonstrate that R_{TE} of human fetal membranes increased rapidly in response to hormones. It is possible that changes in R_{TE} may play a role in the control of membranes permeability during pregnancy.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams E, Choi HM, Cheung C, Brace R. Comparison of amniotic and intramembranous unidirectional permeabilities in late-gestation sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 2005;193:247-55
- Ahmed A, Li XF, Dunk C, Whittle MJ, Rushton DI, Rollason T. Colocalisation of vascular endothelial growth factor and its Flt-1 receptor in human placenta. *Growth Factors*, 1995;12:235-43
- Akerman F, Lei ZM, Rao CV. Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol*, 2002; 16:299-306
- Anim-Nyame N, Gamble J, Sooranna S, Johnson M, Steer P. Microvascular permeability is related to circulating levels of tumour necrosis factor- α in pre-eclampsia. *Cardiovascular Research*, 2003;58:162-169
- Aparicio T, Kermorgant S, Darmoul D, Guilmeau S, Hormi K, Mahieu-Caputo D, Lehy T. Leptin and Ob-Rb receptor isoform in the human digestive tract during fetal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005;90:6177-84
- Baker PN, Krasnow J, Roberts JM, Yeo KT. Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 1995;86:815-21
- Baldi E, Luconi M, Muratori M, Forti G. A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Mol Cell Endocrinol*, 2000;161:31-5
- Banks RE, Forbes MA, Searles J, Pappin D, Canas B, Rahman D, Kaufmann S, Walters CE, Jackson A, Eves P, Linton G, Keen J, Walker JJ, Selby PJ. Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor: Flt-1. *Molecular Human Reprod*, 1998;4:377-386
- Barton TC, Baker C. Permeability of human amnion and chorion membrane. *Am J Obstet Gynec*, 1967;98:562-7

- Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol*, 1996;271:2520-8
- Battaglia FC, Hellegers AE, Mescha G, Barron DH. In vitro investigations of the human chorion as a membrane system. *Nature*, 1962; 15:1061-1063
- Bausero P, Cavaille F, Meduri G, Freitas S, Perrot-Applanat M. Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. *Angiogenesis*, 1998;2:167-82
- Bazer F, Goldstein M, Barron D. Water and electrolyte transport by pig chorioallantois. In *Fertilization and Embryonic Development in vitro*, 1981. Edited by Mastroianni L and Biggers J, Plenum Publishing, NY;229-321
- Behzadian MA, Windsor LJ, Ghaly N, Liou G, Tsai NT, Caldwell RB. VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *FASEB J*, 2003;17:752-4
- Blondeau JP, Baulieu EE. Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J*, 1984; 219:785-792
- Bogic LV, Ohira RH, Yamamoto SY, Okazaki KJ, Millar K, Bryant-Greenwood G. Tissue plasminogen activator and its receptor in the human amnion, chorion, and deciduas at preterm and term. *Biol Reprod*, 1999;60:1006-12
- Bourne G. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *Am J Obstet Gynec*, 1960;79:1070-73
- Bourne G. The volume and circulation of the liquor amnii. The anatomy of the human amnion and chorion. *Sec Obstet Gynaecol*, 1966;59:1127-8

- Brace RA. Current Topic: Progress toward understanding the regulation of amniotic fluid volume: Water and solute fluxes in and through the fetal membranes. *Placenta* 1995; 16:1-18
- Brace RA. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol*, 1997;40:280-9
- Bryant-Greenwood G, Millar L. Human fetal membranes: Their preterm Premature Rupture. And its references. *Biol Reprod*, 2000;63:1575-79
- Bukovsky A, Caudle MR, Cecanova M, Fernando RL, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant— comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen dependent cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003;15:1:36
- Cagnacci A, Arangino S, Caretto S, Mazza V, Volpe A. Sexual dimorphism in the levels of amniotic fluid leptin in pregnancies at 16 weeks of gestation: relation to fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006;124:53-7
- Carson-Jurika MA, Schrader WT, O'Malley B. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr. Rev*, 1990;11:201-220
- Casanueva F, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol*, 1999;20:317-63
- Castellucci M, De Mateis R, Meisser A, Cncello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproeinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod*, 2000;6:951-8
- Cervar M, Blaschitz A, Dohr G, Desoye G. Paracrine regulation of distinct trophoblast gunctions in vitro by placental macrophages. *Cell Tissue Res*, 1999;295:297-305

- Chan TF, Su JH, Chung YF, Hsu YH, Yeh YT, Yuan SS. Elevated amniotic fluid leptin level in pregnant women who are destined to develop preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2006;85:171-4
- Chen Y, Schindler M, Simon SM. A mechanism for tamoxifen-mediated inhibition of acidification. *J Biol Chem*, 1999;274(26):18364-73
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest*, 1999;103:401-406
- Cheung C. Vascular endothelial growth factor: Possible role in fetal development and placental function. *J Soc Gynecol Invest*, 1997; 4:169-177
- Cheung C. Vascular endothelial growth factor activation of intramembranous ossification: a critical pathway for amniotic fluid volume regulation. *J Soc Gynecol Invest* 2004; 11:63-74
- Chibbar R, Wong S, Miller FD, Mitchell BF. Estrogen stimulates oxytocin expression in human choriondecidua. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995;80:567-72
- Cho MM, Ziats NP, Pal D, Utian WH, Corodeski GI. Estrogen modulates paracellular permeability of human endothelial cells by eNOS- and iNOS-related mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1999; 276: 337-349
- Christian HC, Morris JF. Rapid actions of 17 β -oestradiol on a subset of lactotrophs in the rat pituitary. *J Physiol*, 2002;539:557-66
- Cinque B, Navarreta V, Benedetto MT, Maniccia E, Dell Asqua S. Labor in humans: 1. Progesterone, 20 α -dihydroprogesterone, estrone and 17 β -estradiol in near placental and

most distant human amnion and chorion leave in various stages of labor at term. *J Endocrinol Invest*, 1986;9:487-90

- Collins P, Goldfien A, Roberts J. Exposure of human amnion to amniotic fluid obtained before labor causes a decrease in chorion/decidual prostaglandin release. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992;74:1198-205
- Cooke SF, Craven DJ, Symonds EM. Osmolarity changes can enhance the release of rennin from human chorion. *Am J Obstet Gynecol*, 1985;151:819-21
- Cruz Sillva MM, Madeira VMC, Almeida LM, Custodio JBA. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocyte membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. *Toxicol In Vitro*, 2001;15:615-22
- Cunningham G, Leveno K, Bloom S, Hauth J, Gilstrap L, Wenstrom K. *Williams Obstetrics*. McGraw Hill Professional, 22nd Edition, 2005,56-68
- Daneshmand SS, Cheung CY, Brace RA. Regulation of amniotic fluid volume by intramembranous absorption in sheep: role of passive permeability and vascular endothelial growth factor. *Am J Obstet Gynecol*, 2003;188:786-93
- Davis RA, Kern F, Showalter JR, Sutherland E, Sinensky M, Simon FR. Alterations of hepatic Na⁺, K⁺-ATPase and bile flow by estrogen: effects on liver surface membrane lipid structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 4130-4134
- de Bakker-Teunissen OJ, Arts NF, Mulder GH. Fluid transport across human fetal membranes affected by human amniotic fluid: an in vitro study. *Placenta*, 1988;9:533-45
- Dennes WJB, Sluter DM, Bennet PR. Nitric oxide synthase mRNA expression in human fetal membranes; a possible role in parturition. *Biochem Biophys Res Com*, 1997; 233: 276-278

- Dickey RP, Gasser RF, Hower JF, Matulich EM, Brown GT. Relationship of uterine blood flow to chorionic sac and embryo growth rates. *Hum Reprod*, 1995;10:2676-9
- Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, Bado A. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes*, 2005;54:348-54
- Dufy B, Vincent JD, Fleury H, Du Pasquier P, Gourdji D, Tixier-Vidal A. Membrane effects of thyrotropin-releasing hormone and estrogen shown by intracellular recording from pituitary cells. *Science*, 1979;204:509-511
- Dunlap KA, Stormshak F. Nongenomic inhibition of oxytocin binding by progesterone in the ovine uterus. *Biol Reprod*, 2004;70: 65-69
- Eis A, Mitchell MD, Myatt L. Endothelin transfer and endothelin effects on water transfer in human fetal membranes. *Obstet Gynecol*, 1992; 79, 3:411-415
- Falkenstein E, Norman AW, Wheeling M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 2072-2075
- Fiorelli G, Gori F, Frediani U, Franceschelli F, Tanini A, Tosti-Guerra C, Benvenuti S, Gennari L, Becherini L, Brandi ML. Membrane binding sites and non-genomic effects of estrogen in cultured human preosteoclastic cells. *J. Steroid. Molec. Biol*, 1996;59:233-240
- Fiorini S, Ferreti ME, Biondi C, Pavon B, Lunghi L, Paycnetto G, Abell L. 17 β estradiol stimulates arachidonate release from human amniotic like WISH cells through a rapid mechanism involving a membrane receptor. *Endocrinology*, 2003;144:3359-67

- Fromter I, Diamond JM. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature New Biol*, 1972;235:9-13
- Garby L. Studies on transfer of matter across membranes with special reference to the isolated human amniotic membrane and the exchange of amniotic fluid. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1957; 40:1-84
- Ghosb D, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Dhawan L, Smith SK, Sengupta J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) in conceptus and endometrium during implantation in the rhesus monkey. *Mol Hum Reprod*, 2000;6:935-41
- Goldhawk D, Hodkirk Transfer of [³H] estrone-[³⁵S] sulphate across guinea pig fetal membranes. *J Steroid Biochem*, 1998;67:33-40
- Gorodeski G, Goldfarb J. Seminal fluid factor increases the resistance of the tight junctional complex of cultured human cervical epithelium CaSki cells. *Fertility and Srerility*, 1998;69,2:309-17
- Gorodeski G. Estrogen biphasic regulation of paracellular permeability of cultured human vaginal-cervical epithelia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86:4233-4243
- Gorodeski G. Aging and estrogen effects on transcervical-transvaginal epithelial permeability. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005;90:345-51
- Greb RR, Kiesel L, Selbmann AK, Wehrmann M, Hodgen GD, Goodman AL, Wallwiener D. Disparate actions of mifepristone (RU 486) on glands and stroma in the primate endometrium. *Human Reprod*, 1999; 14, 1:198-206
- Guiet-Bara A, Bara M. Comparative study of the human amnion, chorion and chorioamnion permeability to monovalent cations. *Europ J Obstet Gynec Reprod Biol* 1983; 16:1-7

- Hardy MA, Leonardi RT, Scheide JI. Cellular permeation pathways in a leaky epithelium: the human amniochorion. *Biol of Cell*, 1989; 66:149-153
- Harvey B, Condliffe S, Doolan C. Sex and salt hormones: rapid effects in epithelia. *NIPS*, 2001;16:174-77
- Harvey B, Alzamora R, Healy V, Renard C, Doolan C. Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. *Ahomage to Hans Ussing. Biochim Biophys Acta*, 2002;1566:116-128
- Hatzoglou A, Ouafik L, Bakogeorgou E, Thermos K, Castanas E. Morphine cross-peaks with somatostatin receptor SSTR2 in the T47D human breast cancer cell line and decreases cell growth. *Cancer Res*, 1995;55:5632-5635
- Hatzoglou C, Gourgoulianis KI, Hatzoglou A, Castanas E, Molyvdas PA. Rapid effects of 17beta-estradiol and progesterone on sheep visceral and parietal pleurae via a nitric oxide pathway. *J Appl Physiol*, 2002; 93:752-758
- Healy DL. Polyhydramnios. In: Brace RA, Ross MG, Robilliard JE, eds. *Fetal and neonatal body fluids: The scientific basis for clinical practice*. Perinatology Press, 1989;175-85
- Hildebrandt V, Babischkin J, Koos R, Pepe G, Albrecht E. Developmental regulation of vascular endothelial growth/permeability factor messenger ribonucleic acid levels in and vascularization of the villous placenta during baboon pregnancy. *Endocrinology*, 2001;142:2050-2057
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 1992;267:26031-7

- Jauniaux E, Gulbis B. In vivo investigation of placental transfer early in human pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000;92:45-9
- Jones SA, Challis JR. Steroid, corticotrophin-releasing hormone, ACTH and prostaglandin interactions in the amnion and placenta of early pregnancy in man. *J Endocrinol*, 1990;125:153-9
- Kalenga MK, De Herrtogh R, Whitebread S, Vankrieken L, Thomas K, De Gasparo M. Distribution of concentrations of angiotensin II (AII), A II receptors, hPL, prolactin, and steroids in human fetal membranes. (Abstract) *Rev Fr Gynecol Obstet*, 1991;86:585-91
- Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Harkonen P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*, 2005;10:1395-410
- Ke FC, Ramirez VD. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalami in vitro. *Neuroendocrinology*, 1987; 45: 514-517
- Khan-Dawood FS, Dawood MY. Estrogen and progesterone receptor and hormone levels in human myometrium and placenta in term pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1984;150:501-5
- King BF. Cell surface specializations and intercellular junctions in human amniotic epithelium: An electron microscopic and freeze-fracture study. *Anat Rec*, 1982;203:73-8
- Knight J, Bazer F, Thatcher W, Franke D, Wallace H. Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: Interrelations between hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *J Anim Sci*, 1977;44:620-637
- Koay ES, Bryant-Greenwood GD, Yamamoto SY, Greenwood FC. The human fetal membranes: a target tissue for relaxin. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986;62:513-21

- Konduri GG, Fewell JE. Oligohydramnios. In: Brace RA, Ross MG, Robilliard JE, eds. Fetal and neonatal body fluids: The scientific basis for clinical practice. Perinatology Press, 1989; 157-74
- Lahenkari P, Parikka V, Rautiala TJ, Weckstrom M, Dahllund J, Harkomen HK: The effects of tamoxifen and toremifene on bone cells involve changes in plasma membrane ion conductance. *J Bone Miner Res*, 2003;18:473-81
- Lemancewicz A, Laudanska H, Laudanski T, Karpiuk A, Barta S. Permeability of fetal membranes to calcium and magnesium: possible role in preterm labour. *Hum Reprod*, 2000;15:2018-2022.
- Lenz T, Sealey JE, August P, James GD, Laragh JH. Tissue levels of active and total rennin, angiotensinogen, human chorionic gonadotropin, estradiol, and progesterone in human placentas from different methods of delivery. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989;69:31-37
- Leontic EA, Tyson JE. Prolactin and fetal osmoregulation: water transport across isolated human amnion. *Am J Physiol*, 1977; 232: 124-127
- Leontic EA, Schrufer JJ, Andreassen B, Pinto H, Tyson JE. Further evidence for the role of prolactin on human fetoplacental osmoregulation. *Am J Obstet Gynecol*, 1979;133:435-8
- Li H, Sheppard D, Hug M. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cystic Fibros*, 2004;3:123-126
- 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; 59:63-73
- Loganath A, Peh KL, Wong YC, Ng SC. Evidence for de novo cholesterol synthesis by term human fetal amnion and chorio: a

comparative study using the reverse-isotope dilution technique. *Horm Res*, 2000;53:125-8

- Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, DeMets DL. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med*, 1992;326:852-856
- Lyden TW, Anderson CL, Robinson JM. The endothelium but not the syncytiotrophoblast of human placenta expresses caveolae. *Placenta*, 2002;23:640-52
- Madsen G, Zaccar T, Manuelpillai U, Wallace E, Kwek K, Yeo G, Smith R, Mesiano S. Intracrine control of estrogen action in human gestational tissues at parturition. *J Soc Gynecol Investig*, 2004;11:213-19
- Makrydimas G, Vandecruys H, Sotiriadis A, LaKasing L, Spencer K, Nicolaidis KH. Coelomic fluid leptin concentration in normal first-trimester pregnancies and missed miscarriages. *Fetal Diagn Ther*, 2005;20:406-9
- Mann S, Nijland M, Ross M. Mathematic modeling of human amniotic fluid dynamics. *Am J Obstet Gynecol*, 1996;175:937-44
- Marvin KW, Keelan JA, Eykholt RL, Sato TA, Mitchell MD. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the human amnion and choriondecidua. *Am J Obstet Gynecol*, 2002;187:728-734
- Matsumoto LC, Bogic L, Brace RA, Cheung CY. Fetal esophageal ligation induces expression of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 2001;184:175-84
- Matsumoto LC, Bogic L, Brace RA, Cheung CY. Prolonger hypoxia upregulates vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in ovine fetal membranes and placenta. *Am J Obstet Gynecol*, 2002;186:303-10

- McMillan J, Fatehi-Sedeh S, Sylvia V, Bingham V, Zhong M, Boyan B, Schwartz Z. Sex-specific regulation of growth plate chondrocytes by estrogen is via multiple MAP kinase signalling pathways. *Biochim Biophys Acta*, 2006;1763:381-392
- McNamara B, Winter DC, Cufi J, Taylor C, O'Sullivan GS, Harvey BJ. Rapid activation of basolateral potassium transport in human colon by oestradiol. *Br J Pharmacol*, 2000;131:1373-8
- Messinis I, Milingos S. Leptin in human reproduction. *Hum Reprod*, 1999; 5: 52-63
- Messinis IE, Milingos SD, Alexandris E, Kariotis I, Kollios G, Seferiadis K. Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. *Hum Reprod*, 1999;14:913-918
- Messinis IE, Kariotis I, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K. Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy. *Human Reprod*, 2000;15:2383-2387
- Messinis IE, Papageorgiou I, Milingos S, Asproдини E, Kollios G, Seferiadis K. Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Human Reprod*, 2001;16:1827-1832
- Μεσσήνης ΙΕ. Επιτομή: Μαιευτική και Γυναικολογία. *MD Communications*, 2005;79-86
- Misfeldt DS, Hamamoto S, Pitelka D. Transepithelial transport in cell culture. *Cell Biology*, 1976; 73:1212-1216
- Mitchell BF, Crulckshimk B, McLean D, Challs J. Local modulation of progesterone production in human fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab*, 1982;55:1237-9
- Mitchell BF, Powell WA. Progesterone production by human fetal membranes: an in vitro incubation system for studying hormone production and metabolism. *Am J Obstet Gynecol*, 1984;148:303-309

- Mitchell BF, Cross J, Hodkirk R, Challis JR. Formation of unconjugated estrogens from estrone sulfate by dispersed cells from human fetal membranes and deciduas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984;58:845-9
- Mize AL, Alper RH. Rapid uncoupling of serotonin-1A receptors in rat hippocampus by 17beta-estradiol in vitro requires protein kinases A and C. *Neuroendocrinology*, 2002;76:339-47
- Modena AB, Fieni S. Amniotic fluid dynamics. *Acta Biomed Ateneo Parmense*, 2004;75:11-3
- Moore WMO, Word BS. Permeability of chorion laeve in case of normal and retarded fetal growth. *Am J Obstetr Gynecol* 1972; 114: 904-907
- Moreno AS, Franci CR. Estrogen modulates the action of nitric oxide in the medial preoptic area on luteinizing hormone and prolactin secretion. *Life Sci*, 2004;74:2049-59
- Nishimoto S, Hirato K, Saitoh H, Yanaihara T, Nakayama T. Steroid metabolism in fetal membranes. (Abstract) *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1983;35:1749-58
- Nordeen SK, Bona BJ, Moyer ML. Latent agonist activity of steroid antagonist, RU486, is unmasked in cells treated with activators of protein kinase A. *Mol Endocrinol*, 1993; 7:731-741
- Nordeen SK, Bona BJ, Beck CA, Edwards DP, Borrer KC, DeFranco DB. The two faces of a steroid antagonist: when an antagonist isn't. *Steroids*, 1995; 60, 1: 97-104
- Oh SY, Kim CJ, Park I, Romero R, Sohn YK, Moon KC, Yoon BH. Progesterone receptor isoforms (A/B) ratio of human fetal membranes increases during term parturition. *Am J Obstet Gynecol*, 2005;193:1156-60
- Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Pharmac Biotec* 1999, 10:528-535

- Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS*, 2005; 579:295-301
- Padayachi T, Pegorano RJ, Hofmeyr J, Joubert SM, Norman RJ. Decreased concentration and affinities of oestrogen and progesterone receptors of intrauterine tissue in human pregnancy. *J Steroid Biochem*, 1987;26:473-9
- Patel FA, Clifton VL, Chwalisz K, Challis JR. Steroid regulation of prostaglandin dehydrogenase activity and expression in human term placenta and chorio-decidua in relation to labor. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999;84:291-9
- Perni SC, Kalich RB, Hutson JM, Karasahim E, Bongiovanni AM, Ratushny V, Chasen ST, Witkin SS. Differential expression of immune system-related components in midtrimester amniotic fluid from singleton and twin pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:942-6
- Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani A. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine and endocrine mechanisms. *Endocrin Soc*, 1996; 17:156-186
- Pietras RJ, Szego CM. Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature*, 1975;253:357-359
- Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*, 1977;265:69-72
- Porta M, Capurro C, Parisi M. Water permeability in the human amnion: pH regulation of the paracellular pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1989;980:220-4
- Putman CD, Brann DW, Kolbeck RC, Machesh VB. Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: mediation by progesterone and gamma amino butyric acid_A receptor systems. *Biol Reprod*, 1991; 43: 266-272

- Rice GE, Dantzer V, Madsen MT, Skadhauge E. Gestational changes in electrolyte transport, electrical activity, and permeability of the porcine placenta. *J Comp Physiol [B]*, 1991;161: 189-98
- Rice GE, Hoter R, Christensen P, Dantzer V, Skadhauge E. Endocrine correlates of placental permeability during gestation in pig. *Com Biochem Physiol* 1993; 105A, 1: 111-117
- Roberts CP, Parthasarathy S, Gulati R, Horowitz I, Murphy AA. Effect of RU-486 and related compounds on the proliferation of cultured macrophages. *Am J Reprod Immunol*, 1995; 34:248-256
- Romano WM, Lukash LA, Challis JR, Mitchell BF. Substrate utilization for estrogen synthesis by human fetal membranes and deciduas. *Am J Obstet gynecol*, 1986;155:1170-5
- Romero R, Lafreniere D, Duff GW, Kadar N, Durum S, Hobbins JC. Failure of endotoxin to cross the chorioamniotic membranes in vitro. *Am J Perin*, 1987; 4, 4:360-362
- Ross MG, Brace RA. National institute of health and development conference summary: amniotic fluid biology—basic and clinical aspects. *J Matern Fetal Med*, 2001;10:2-19
- Schmidt B, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. Rapid, nongenomic steroid actions: a new age? *Fron Neuroendocrinol*, 2000;21:57-94
- Schmidt W, Pfaller K, Schwarzfurtner H. Light- and electron microscope studies of human fetal membranes. 1. Amnion and intermediate layer. (Abstract) *Zentralbl Gynecol*. 1982; 104:385-96
- Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J, Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: regulation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrin Metab*, 1997; 82:1480-1483

- Seeds AE. Water transfer across the human amnion in response to osmotic gradients. *Am J Obstet Gynec*, 1967; 98: 568-571
- Seeds AE, Schruete JJ, Reinhard JA, Garlid KD. Diffusion mechanisms across human placental tissue. *Gynecol Invest*, 1973; 4: 31-37
- Seeds AE, Eichhorst BC, Stolee A. Factors determining human chorion leave permeability in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, 1977; 128:13-21
- Shi L, Shi SQ, Given RL, von Hertzen H, Garfield RE. Synergistic effects of antiprogestins and iNOS or aromatase inhibitors on establishment and maintenance of pregnancy. *Steroid* 2003; 68, 10-13:1077-84
- Simon M, Grone HJ, Jöhren O, Kullmer J, Plate KH, Risau W, Fuchs E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney. *Am J Physiol*. 1995; 268:F240-50
- Sinha MK, Caro JF. Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm*, 1998; 54:1-30
- Soh Eb, Mitchell Md, Keelan JA. Does leptin exhibit cytokine-like properties in tissues of pregnancy? *Am J Reprod Immunol*, 2000; 43:292-8
- Somjen D, Kohen F, Lieberherr M. Nongenomic effects of an anti-idiotypic antibody as an estrogen mimetic in female human and rat osteoblasts. *J Cell Biochem*, 1997; 65:53-66
- Sperelakis N. Origin of resting membrane potentials. In Sperelakis N. *Cell Physiology Sourcebook 3rd edition*. Academic press, 2001; 219-236
- Sperelakis N. Review of electricity and cable properties. In Sperelakis N. *Cell Physiology Sourcebook 3rd edition*. Academic press, 2001; 1205-1213

- Stefanidis I, Zarogiannis S, Hatzoglou C, Liakopoulos V, Kourti P, Poultsidi A, Mertens PR, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA. Enhancement of the transmesothelial resistance of the parietal sheep peritoneum by epinephrine in vitro: using-type chamber experiments. *Artif Organs*, 2005; 29:919-922
- Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Fimiani C, Welters I, Gadet P, Breton C, Pestel J, Salzet M, Bilglinger TV. Estradiol coupling to human nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: Evidence for an estrogen surface receptor. *J Immunol*, 1999;163:3758-3763
- Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 2005;109:227-241
- Taylor AH, McParland PC, Taylor DJ, Bell SC. The progesterone receptor in human term amniochorion and placenta is isoform C. *Endocrinology*, 2006;147:687-93
- Tesarik J, Mendoza C. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: Relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995;80:1438-1443
- Thuringer D. The vascular endothelial growth factor-induced disruption of gap junctions is relayed by an autocrine communication via ATP release in coronary capillary endothelium. *Ann N Y Sci*, 2004;1030:14-27
- Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic levels of vascular endothelial growth factor and nitric oxide at the second trimester in Down's syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med*.2003; 13:28-31
- Tyson JE, Mowat GC, McCoshen JA. Simulation of a probable biologic action of decidual prolactin on fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 1984;148:296-300

- Tyson JE, McCoshen JA, Dubin NH. Inhibition of fetal membrane prostaglandin production by prolactin: relative importance in the initiation of labor. *Am J Obstet Gynecol*, 1985;151:1032-8
- Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in short-circuit isolated frog skin. *Acta Phy Scandinau*, 1951;23:110-127
- Vaisanen-Tommiska M, Butzow R, Ylikorkala O, Mikkola TS. Mifepristone-induced nitric oxide release and expression of nitric oxide synthases in the human cervix during early pregnancy. *Hum Reprod* 2006; 9:1-5
- Vuorele-Vepsalainen P, Alfthan H, Oprana A, Alitalo K, Stenman Y, Halmesmaki E. Vascular endothelial growth factor is bound in amniotic fluid and maternal serum. *Human Reprod*, 1998;14:1346-135
- Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K, Weich H, Halmesmaki E. Amniotic fluid-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000;95:353-7
- Waldegger S, Beisse F, Apfel H, Breit S, Kolb HA, Haussinger D, Lang F. Electrophysiological effects of progesterone on hepatocytes. *Biochm Biophys Acta*, 1995; 1266:186-190
- Wang T, Schneider J. Fine structure of human chorionic membrane. Ultrastructural and histochemical examinations. *Arch Gynecol*, 1983;233:187-98
- Welsch F. Human fetal membrane: investigations on membrane potentiaks and membrane ²⁴Na permeability in vitro and the possible involvement of acetylcholine. *Gynecol Obstet Invest*, 1981;12:113-122
- Westendorp RG, Draijer R, Meinders AE, Van Hinsbergh VW. Cyclin-GMP-mediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Vasc Res*, 1994; 31: 42-51

- White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, Moore LG. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: Potential cellular mechanisms. *Endocr Rew*, 1995;16:739-751
- Williams P, Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, Gerguson M. *Gray' Anatomy 38th edition*. Churchill Livingstone, 1995, 158-173
- Wintour EM, Laurence BM, Lingwood BE. Anatomy, physiology and pathology of the amniotic and allantoic compartments in the sheep and cow. *Aust Vet J*, 1986; 63, 7: 216-221
- Woelfer B, Hafner E, Metzendauer M, Schuchter K, Philipp K. The influence of leptin on placental and fetal volume measured by three-dimensional ultrasound in the second trimester. *Placenta*, 2005;26:124-8
- Yamazaki Y, Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*, 2006;14;[epub ahead of print]
- Ye L, Martin TA, Parr C, Harrison GM, Mansel RE, Jiang WG. Biphasic effects of 17-beta-estradiol on expression of occluding and transendothelial resistance and paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*, 2003;196:362-9
- Zhang D, Trudeau V. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Com Bioch Physiol*, 2006; 144:306-15
- Zhou SY, Chen JQ, Liu ZG, Huang T, Chen LS. A clinical study of amniotic membrane transplantation for severe eye burns at the acute stage. (Abstract) *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2004;40:97-100
- Zicari A, Ticconi C, Realacci M, Cela O, Santangelo C, Pietropoli A, Russo MA, Piccione E. Hormonal regulation of cytokine release by human fetal membranes at term gestation: effects of oxytocin, hydrocortisone and progesterone on tumor necrosis factor-alpha

and transforming growth factor-beta 1 output. J Reprod Immunol, 2002;56:123-36

 <p>ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ</p> <p>ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ 75% ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ 25% ΕΘΝΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ</p> <p>ΠΑΙΔΕΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ 2^ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης</p>	 <p>ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ</p> <p>ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ 75% ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ 25% ΕΘΝΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ</p> <p>ΠΑΙΔΕΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ 2^ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης</p>	 <p>ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ</p> <p>ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ 75% ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ 25% ΕΘΝΙΚΟΙ ΠΟΡΟΙ</p> <p>ΠΑΙΔΕΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ 2^ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης</p>
 <p>ΜΕΤΡΟ 2.2.</p> <p>ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΠΡΑΞΗΣ 2.2.3B ΠΡΟΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ : 32.640 Euro</p>	<p>ΕΡΓΟ: «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ- ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΕΡΕΥΝΑΣ του ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»</p> <p>Τίτλος: «Η επίδραση της 17β- οιστραδιόλης, της προγεστερόνης, του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα και της λεπτίνης στη διαπερατότητα των εμβρυϊκών υμένων στην κύηση.»</p>	 <p>ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ</p>