

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

Δ/ντης – Καθηγητής: Δ. Αρβανίτης

Συγκριτική ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των
Πρωτεϊνών 70 και 90 του Θερμικού Σοκ-(Heat Shock
Proteins P70 & P90)- στις χοριακές λάχνες του
πλακούντα, στις παλίνδρομες και στις φυσιολογικές
τελειόμηνες κνήσεις.

Σωτήριος Χριστοφ. Σωτηρίου
Χειρουργός Μαιευτήρας Γυναικολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

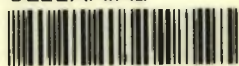
ΛΑΡΙΣΑ 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

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

Αριθ. Εισ.: 7688/1
Ημερ. Εισ.: 07-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
572.6
ΣΩΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083767

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ

Δ/ντης – Καθηγητής: Δ. Αρβανίτης

**Συγκριτική ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των
Πρωτεϊνών 70 και 90 του Θερμικού Σοκ-(Heat Shock
Proteins P70 & P90)- στις χοριακές λάχνες του
πλακούντα, στις παλίνδρομες και στις φυσιολογικές
τελειόμηνες κύσεις.**

Σωτήριος Χριστοφ. Σωτηρίου

Χειρουργός Μαιευτήρας Γυναικολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2005

‘ Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα ’ (Νόμος 5343/32, άρθρο 200, παρ2.).

**Με σεβασμό στους
πολυαγαπημένους γονείς μου.**

Περιεχόμενα :

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
ΑΙΤΙΕΣ ΑΥΤΟΜΑΤΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ	7
ΑΝΑΤΟΜΙΑ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΟΡΙΑΚΩΝ ΛΑΧΝΩΝ.	11
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	
ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK (HEAT-SHOCK PROTEINS) —ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	34
ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p70.....	40
ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p70 ΚΑΙ Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ.....	47
ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p90.....	51
ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p90 ΚΑΙ Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ.....	55

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	57
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	88
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	103
SUMMARY IN ENGLISH.....	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	110

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στις μέρες μας που η αποκρυπτογράφηση του DNA και οι νεότερες επιστημονικές ανακαλύψεις, ανοίγουν νέους ορίζοντες για τη μελέτη των μυστικών της ζωής και των πανάρχαιων «καλά κλειδωμένων» πληροφοριών στα διάφορα μέρη του κυττάρου, αποκτά ιδιαίτερη σημασία η μελέτη και συσχέτιση των κυτταρικών πρωτεϊνών με τα διάφορα κλινικά φαινόμενα-εκδηλώσεις.

Στα πλαίσια αυτής της καταιγίδας των νεοτέρων ανακαλύψεων, ιδιαίτερα δημοφιλείς είναι οι πρωτεΐνες που παράγονται σε συνθήκες θερμικού shock, που είναι ευρέως γνωστές ως **Heat Shock Proteins- HSP**.

Στην εργασία που ακολουθεί, γίνεται μια προσπάθεια ανίχνευσης και μελέτης αυτών των πρωτεϊνών στα κύτταρα του πλακούντα και περαιτέρω μια σύγκριση της έκφρασης των HSP των λαχνών του πλακούντα, στις φυσιολογικές τελειόμηνες και στις παλίνδρομες κυήσεις.

Πριν προχωρήσουμε στην παρουσίαση της μελέτης, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου για την πολυτιμότερη βοήθεια του καθηγητού Κου Αρβανίτη Δημήτριου, χωρίς τη συμβολή του οποίου, θα ήταν αδύνατη η επίτευξη αυτής της εργασίας, καθώς και στον πατέρα μου Κον Σωτηρίου Χριστόφορο, Μαιευτήρα-Γυναικολόγο, για την βοήθειά του στη συγκέντρωση του υλικού της έρευνας. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω θερμά τις Μονάδες Παθολογικής Ανατομίας και τα εργαστήρια Ανατομίας των Πανεπιστημίων Λάρισας και Αθηνών για την ουσιώδη συμβολή τους.

Η παρουσίαση της εργασίας θα γίνει σε δύο μέρη, το Γενικό, όπου περιγράφονται σύντομα οι αιτίες των αυτομάτων αποβολών, η ανατομία και η ιστολογία του πλακούντα και των χοριακών λαχνών, οι HSP 70 και 90 και οι μέχρι τώρα γνώσεις για την ύπαρξη αυτών των πρωτεϊνών στον πλακούντα. Ακολουθεί το ειδικό μέρος με την παρουσίαση του υλικού, μεθόδων, αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων της εργασίας μας.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΙΤΙΕΣ ΑΥΤΟΜΑΤΗΣ ΑΠΟΒΟΛΗΣ .

Αυτόματη αποβολή ονομάζεται η διακοπή της κύησης, που γίνεται χωρίς ιατρική επέμβαση πριν την 24η εβδομάδα, δηλαδή πριν την εποχή που το κύημα μπορεί να είναι βιώσιμο. Σε μερικές χώρες, όπως στις ΗΠΑ, ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει, εκτός από την βιωσιμότητα, και το βάρος του κυήματος το οποίο είναι μικρότερο των 500 gr (1) (2).

Η συχνότητα εμφάνισης αυτομάτων αποβολών κυμαίνεται από 15 έως 20% των διαπιστωμένων κύησης. Αν όμως χρησιμοποιηθεί η μέτρηση της ανθρωπίου χοριακής γοναδοτροπίνης, για την ανίχνευση πρώιμων υποκλινικών μορφών αποβολών, το ποσοστό φθάνει το 30%. Περίπου το 80% των αυτομάτων αποβολών συμβαίνουν κατά το πρώτο τρίμηνο.

Οι πιθανές αιτίες των αυτομάτων αποβολών μπορούν να διαχωριστούν σε προερχόμενες από το κύημα και σε εκείνες που οφείλονται στη μητέρα ή στον πατέρα.

Αίτια από το κύημα:

A). Πρώτου τριμήνου είναι τα εξής:

1). Ανώμαλη κατασκευή του πλακούντα (π.χ. υποπλασία ή ατροφία της τροφοβλάστης).

2). Εμβρυϊκές ανωμαλίες.(τοπική ανωμαλία εμβρύου).

3). Χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Πιο συχνές είναι η X- μονοσωμία, ο πολυπλοειδισμός, και η τρισωμία. (2)

4). Μεταλλάξεις.

5). Συγγενής απουσία του εμβρύου ή της αμνιακής κοιλότητας.

B). Δευτέρου τριμήνου:

6). Εμβρυϊκή σύφιλη.

7). Ερυθροβλάστωση ή άλλες εμβρυϊκές βλάβες (σπάνιες αιτίες σε αυτό το τρίμηνο).

8). Επιπόλαια (ρηχή) εμφύτευση του πλακούντα.

Αίτια από τη μητέρα:

Παρατηρούνται κυρίως στο δεύτερο τρίμηνο.

1). Αυξημένη μητρική ηλικία.

2). Ενδομητρικά σπειράματα.

3). Τερατογόνα.

4). Σοβαρές ασθένειες της μητέρας.

α. Μητρικές λοιμώξεις: Ερυθρά, Τοξοπλάσμωση, Απλός έρπητας,

Μυκοπλάσμωση, Νόσος των κυτταρομεγαλικών εγκλείστων.

β. Καρδιαγγειακές παθήσεις, υπέρταση, παθήσεις των νεφρών.

γ. Παθήσεις του θυρεοειδούς και άλλες ενδοκρινοπάθειες.

5). Ανωμαλίες της μήτρας (δίκερος, μονόκερος, διτράχηλος κ.ο.κ.),

ουλές και συμφύσεις του ενδομητρίου από προηγούμενες αποξέσεις,

τοπικές παραλλαγές (οπίσθια κλίση και κάμψη), όγκοι (κυρίως

ινομύματα) καθώς και άλλοι όγκοι των γεννητικών οργάνων (κύστεις των

ωοθηκών). (2)

6). Εκτεταμένο τραύμα της μητέρας.

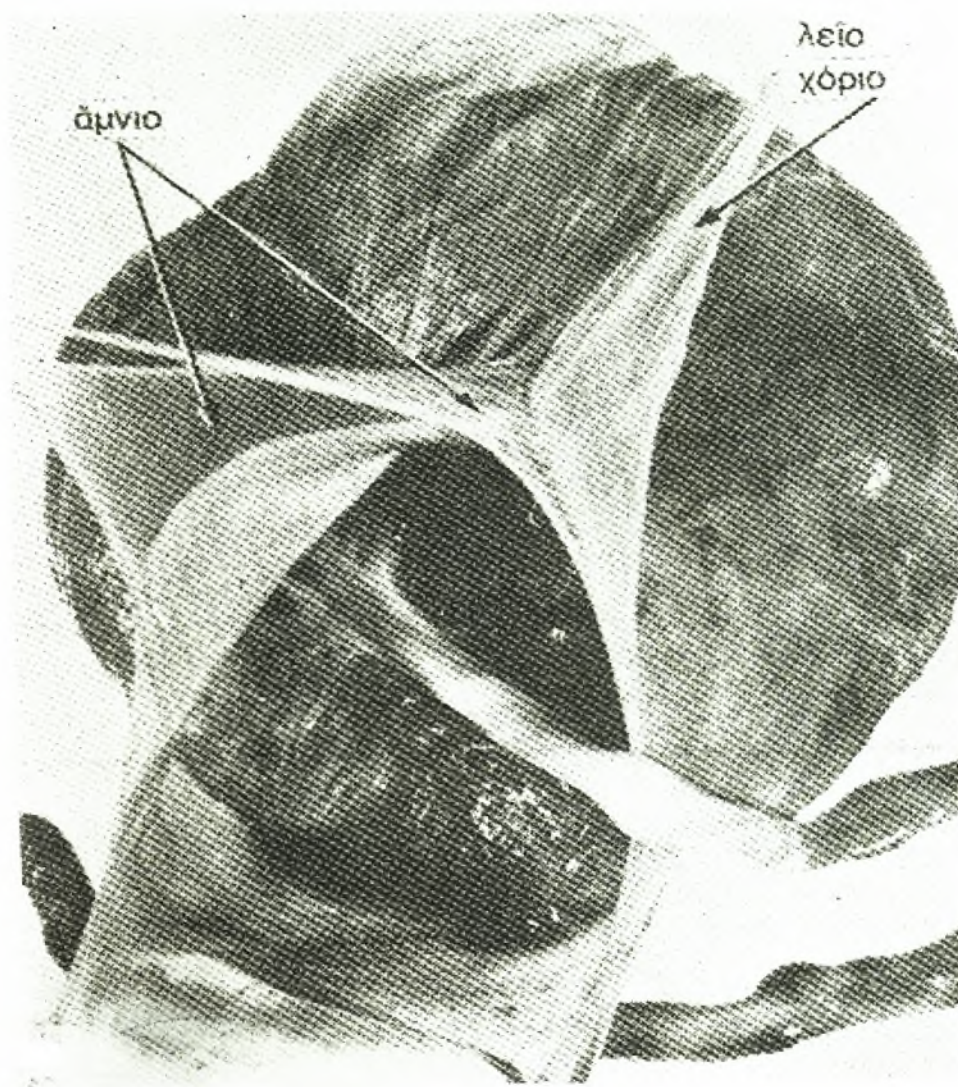
- 7). Παθολογικό ωάριο-κύηση χωρίς έμβρυο ή ανεπάρκεια του ωχρού σωματίου (κυρίως σε προκλητή ωοθυλακιορρηξία).
- 8). Ανοσοβιολογικές διαταραχές (ασυμβατότητες ABO, Rh, καθώς και δημιουργία αντισπερματικών αντισωμάτων στο σώμα της μήτρας).
- 9). Συγγενής ή επίκτητη (π.χ. από προηγηθείσες εκτρώσεις) ανεπάρκεια του έσω τραχηλικού στομίου.
- 10). Μητρικές χρωμοσωμιακές ανωμαλίες.
- 11). Ψυχοσωματικές διαταραχές, μέσω διαταραχών στο σύστημα υποθαλάμου-υποφύσεως και ανατροπής της απαιτούμενης, για μια φυσιολογική εγκυμοσύνη, ορμονικής ισορροπίας-αρμονίας.

Αίτια από τον πατέρα:

10. Χρωμοσωμιακές ανωμαλίες. (1) (4).

ΑΝΑΤΟΜΙΑ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΟΡΙΑΚΩΝ ΛΑΧΝΩΝ.

Ο πλακούντας (από την ελληνική λέξη πλακούς που σημαίνει επίπεδο δίσκο) είναι ένα προσωρινό όργανο που βρίσκεται μόνο στα θηλαστικά μαστοφόρα και στην περιοχή που γίνεται φυσιολογική ανταλλαγή μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Συχνά έχει τη μορφή ενός επίπεδου κυκλικού ή ωοειδούς δίσκου με διάμετρο 15 έως 20 εκ. και πάχος 2 έως 3 εκ. Ο πλακούντας ζυγίζει τις περισσότερες φορές 500 με 600 γραμμάρια, περίπου το 1/6 από το βάρος του εμβρύου. Τα χείλη του πλακούντα είναι σε συνέχεια με τους σάκους (αμνιακό και χοριακό).(Εικ.1.)(5) (6).



Εικόνα 1

Ο πλακούντας και οι υμένες του.

Ο πλακούντας είναι το μόνο όργανο που αποτελείται από κύτταρα προερχόμενα από δύο διαφορετικά άτομα. Τα όρια μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού ιστού χαράσσονται από εξωκυττάρια εναπόθεση προϊόντων νέκρωσης που αναφέρονται ως ινιδώδες.

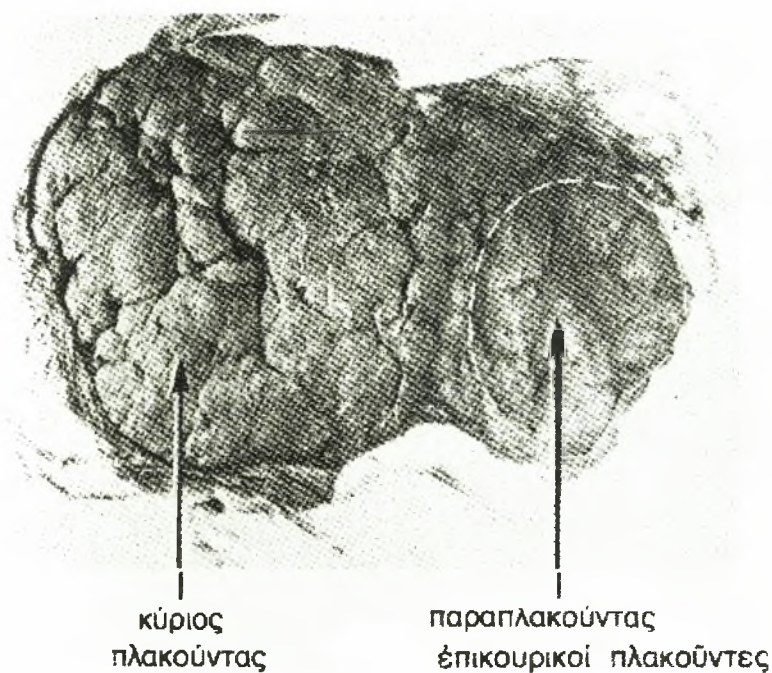
Μητρική επιφάνεια (Εικ.2).



Εικόνα 2.

Μητρική επιφάνεια του πλακούντα

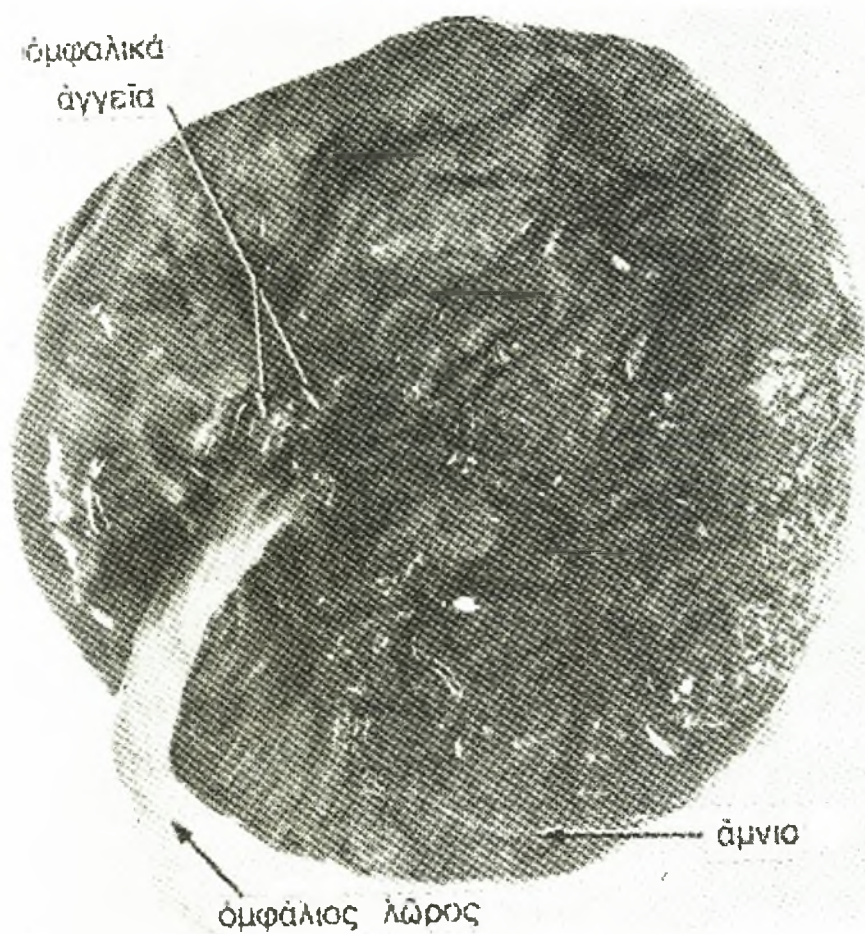
Η χαρακτηριστική στη μητρική επιφάνεια εμφάνιση, είναι αυτή του πλακόστρωτου δρόμου, και είναι αποτέλεσμα της υπέρξεως 15 έως 30 λοβών. Η επιφάνεια των τελευταίων καλύπτεται συνήθως από ένα γκρι στρώμα το οποίο αποτελεί υπόλειμμα του βασικού φθαρτού. Δεν αποτελεί ασυνήθιστο φαινόμενο η υπέρξη, εκτός του κύριου πλακούντα, και άλλων επικουρικών πλακούντων (παραπλακούντες), (Εικ.3), διδύμων, τριδύμων ή και διάχυτων πλακούντων. (6), (7).



Εικόνα 3.

Μητρική επιφάνεια πλακούντα τελειόμηνης κύησης μαζί με ένα παραπλακούντα.

Εμβρυϊκή επιφάνεια (Εικ.4). Ο ομφάλιος λώρος προσκολλάται σε αυτήν την επιφάνεια και το αμνιακό σκέπασμά του είναι σε συνέχεια με το άμνιο που είναι κολλημένο στην επιφάνεια του πλακούντα.



Εικόνα 4.

Εμβρυϊκή επιφάνεια του πλακούντα.

Τα αγγεία ξεκινούν ακτινοειδώς από τον λώρο και είναι εύκολα ορατά διαμέσου του ομαλού και διαφανούς αμνίου. Ο ομφάλιος λώρος στον τελειόμηνο πλακούντα ξεκινά συνήθως από το κέντρο του, αν και δεν είναι σπάνιες άλλες ανατομικές παραλλαγές, όπως φαίνεται στην Εικ.5.(6).



Εικόνα 5.

Πλακούντας με επιχείλιο έκφυση του λώρου (υμενώδης έκφυση).

Ανάπτυξη του πλακούντα και των χοριακών λαχνών. Το

ωάριο γονιμοποιείται συνήθως στην σάλπιγγα και εισέρχεται στη μητρική κοιλότητα ως μορίδιο (περίπου 16 κύτταρα), το οποίο γρήγορα αποβάλλει τη περιβάλλουσα διαφανή του ζώνη και στη συνέχεια, με την ανάπτυξη κοιλότητας στο εσωτερικό του, μετατρέπεται σε βλστοκύστη. Το εξωτερικό στρώμα αυτής, στη συνέχεια, πολλαπλασιάζεται για να σχηματίσει τη πρωτογενή τροφοβλαστική μάζα κυττάρων, από την οποία, κύτταρα διεισδύουν ανάμεσα σε αυτά του ενδομητρικού επιθηλίου. Τα τελευταία εκφυλίζονται, και έτσι τροφοβλαστικά κύτταρα έρχονται σε άμεση επαφή με το ενδομητρικό στρώμα, μια διαδικασία γνωστή ως εμφύτευση, η οποία τελειούται περίπου στις 10 με 11 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Την έβδομη ημέρα η τροφοβλάστη σχηματίζει μία περιφερική “πλάκα”, η οποία γρήγορα διαφοροποιείται σε δύο στρώματα, ένα εσωτερικό μεγάλων διαυγών μονοπύρηνων κυτταροτροφοβλάστης με καλώς αφορισμένες κυτταρικές μεμβράνες και ένα εξωτερικό στρώμα από πολυπύρηννα κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης. (8). Στις μέρες μας έχει αποδειχθεί-σύνθεση DNA και μιτωτική δραστηριότητα, συμβαίνει μόνον στον πυρήνα των

κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων-ότι η συγκυτιοτροφοβλάστη προέρχεται από την κυτταροτροφοβλάστη. Φαίνεται ότι η συγκυτιοτροφοβλάστη σχηματίζεται από την τήξη και ένωση των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, γι' αυτό και δεν παρατηρούνται κυτταρικές μεμβράνες μεταξύ των κυττάρων του συγκυτιακού στρώματος, παρ' όλο που υπολείμματα τέτοιων μεμβρανών παρατηρούνται περιστασιακά με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Μερικές φορές παρατηρούνται και “ενδιάμεσες” κυτταρικές μορφές από τις ήδη αναφερθείσες και οι οποίες αντιπροσωπεύουν τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα τα οποία αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε συγκυτιοτροφοβλαστικά, αλλά δεν έχουν χάσει ακόμη τις εξωτερικές τους κυτταρικές μεμβράνες.

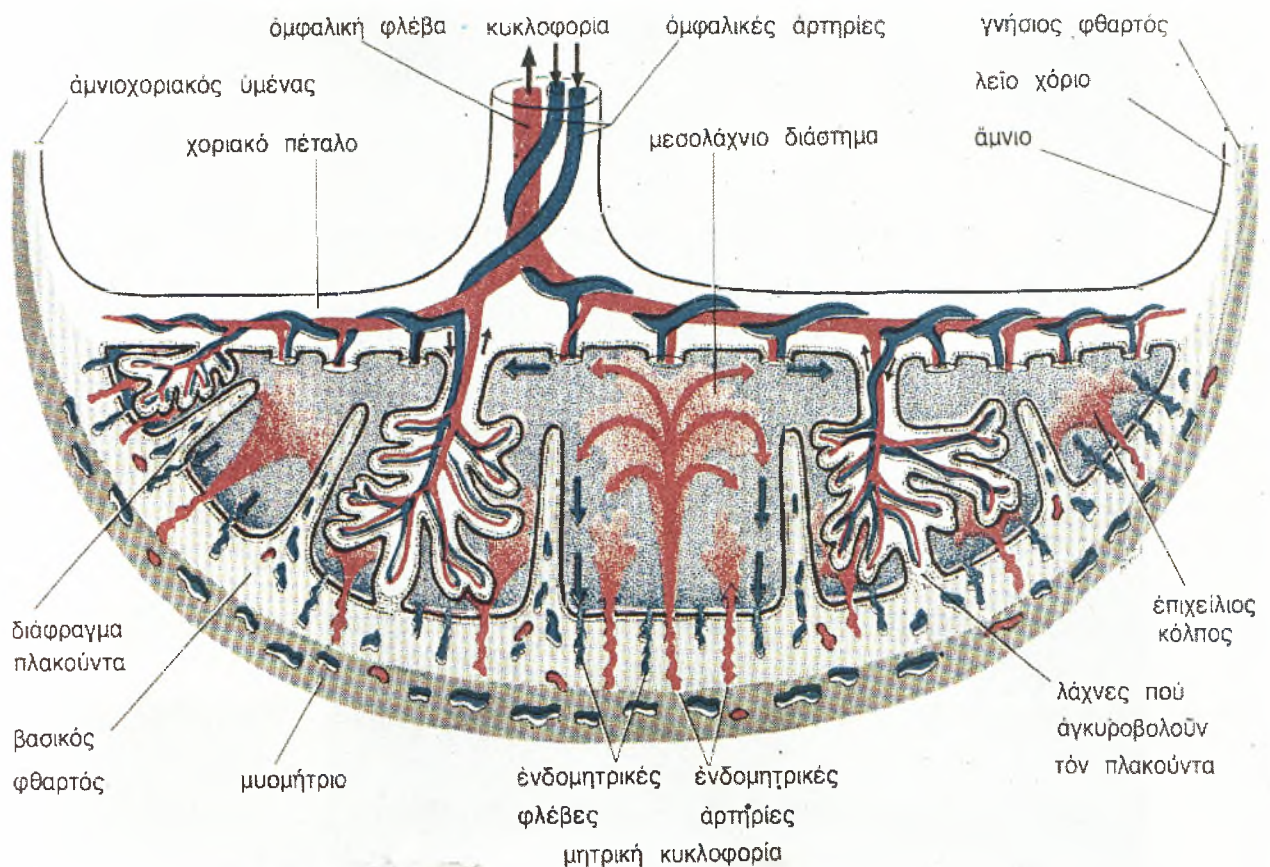
Μεταξύ της 10ης και 13ης μέρας της κύησης μία σειρά από “βοθρία-χάσματα” που επικοινωνούν μεταξύ τους, εμφανίζονται στην ταχέως αυξανόμενη τροφοβλάστη. Αυτό είναι το αποτέλεσμα της εγκόλπωσης των ενδομητρικών τριχοειδών μέσα στη τροφοβλάστη. Τα περιγραφέντα “βοθρία” συμβάλλουν στην δημιουργία της πρόδρομης μορφής των

μεσολάχων χώρων και καθώς όλο και περισσότερα μητριαία αγγεία διαβρώνονται, αυτοί οι χώροι γεμίζουν προοδευτικά με μητρικό αίμα. Σε αυτό το στάδιο τα “βοθρία” χωρίζονται ατελώς μεταξύ τους μέσω δοκίδων από κύτταρα συγκυτιοτροφοβλάστης, οι οποίες μεταξύ της 14ης και 21ης μέρας διατάσσονται ακτινοειδώς και φέρονται να κατέχουν ένα κεντρικό κυτταρικό πυρήνα ο οποίος παράγεται από τον πολλαπλασιασμό των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων στη χοριακή πλάκα. Αυτές οι στήλες δεν παριστούν πραγματικές λάχνες, αλλά αποτελούν το σκελετό από τον οποίο θα αναπτυχθούν αργότερα οι χοριακές λάχνες. Έτσι σ’ αυτό το στάδιο, ο πλακούντας αποτελεί ένα λαβυρινθώδες μάλλον, παρά λαχνωτό όργανο, και οι αναφερθείσες στήλες-δοκίδες περιγράφονται ως πρωτογενή στελέχη των χοριακών λαχνών. Συνεχιζόμενη αύξηση της κυτταροτροφοβλάστης, οδηγεί στην περιφερική της επέκταση στην περιοχή των κυττάρων του ενδομητρίου (τα οποία από την έναρξη της εγκυμοσύνης, μεγαλώνουν, παίρνουν πολυγωνικό σχήμα και εναποθηκεύουν γλυκογόνο και λιποειδή, δηλαδή μετατρέπονται στα κύτταρα του φθαρτού (7)) και την ίδια στιγμή ένας μεσεγγυματικός

πυρήνας εμφανίζεται μέσα στα πρωτογενή στελέχη των χοριακών λαχνών, ο οποίος σχηματίζεται από την περιφερική επέκταση του εξωεμβρυϊκού μεσεγγύματος. Αργότερα, τα αναφερθέντα πρωτογενή στελέχη, αποκτούν αγγεία, τα οποία προέρχονται από το μεσέγγυμα του πυρήνα και όχι, όπως μέχρι πρότινος πιστευόταν, από την επέκταση των χοριοαλλαντοεικών αρτηριών. (9).

Το περιφερικό τμήμα των χοριακών λαχνών σχηματίζεται σχεδόν ολοκληρωτικά από κυτταροτροφοβλάστη στην οποία δεν εισβάλλει μεσέγγυμα και δεν σχηματίζονται αγγεία, αλλά η οποία “αγκυροβολεί” στο φθαρτό της βασικής πλάκας. Αυτά τα κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν τις στήλες των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, πολλαπλασιάζονται και διασκορπώνται πλαγίως για να σχηματίσουν ένα συνεχόμενο κυτταροτροφοβλαστικό περίβλημα, το οποίο διαχωρίζει την συγκυτιοτροφοβλάστη σε δύο στρώματα, το τελικό συγκύτιο στην εμβρυϊκή επιφάνεια του περιβλήματος και το περιφερικό συγκύτιο ανάμεσα στο περίβλημα και στο φθαρτό. Το τελικό συγκύτιο εμμένει ως το περιοριστικό στρώμα του ενδολαχνιακού χώρου αλλά το περιφερικό

συγκύτιο εξαλείφεται και αντικαθίσταται από ένα στρώμα ινώδους υλικού (στρώμα του Nitabuch). Η εγκαθίδρυση του τροφοβλαστικού περιβλήματος είναι ένας μηχανισμός που επιτρέπει τη γρήγορη κυκλική ανάπτυξη του αναπτυσσομένου πλακούντα και το οποίο οδηγεί στην επέκταση του ενδολαχνιακού χώρου και στον οποίο εκτείνονται “βλαστοί” από τις πρωτογενείς λάχνες. Αυτά τα παρακλάδια αποτελούνται αρχικά από συγκυτιοτροφοβλάστη, αλλά καθώς μεγαλώνουν περνούν από τα αναγραφέντα στάδια της εισχώρησης της κυτταροτροφοβλάστης, του σχηματισμού ενός μεσεγχυματικού πυρήνα και τελικώς του σχηματισμού αγγείων. Τα κλαδιά αυτά αποτελούν τις πρωτογενείς λάχνες, και καθώς αυτές αποτελούν πραγματικές λάχνες, ο πλακούντας είναι από την 21η ημέρα της κύησης ένα όργανο με πλήρη αγγείωση. Οι πρωτογενείς λάχνες διαιρούνται και αυξάνονται για να φτιάξουν δευτερογενείς και τριτογενείς λαχνιακούς κορμούς και οι οποίοι τελικώς θα δώσουν το τελικό λαχνιακό δένδρο.(Εικ.6).(6)



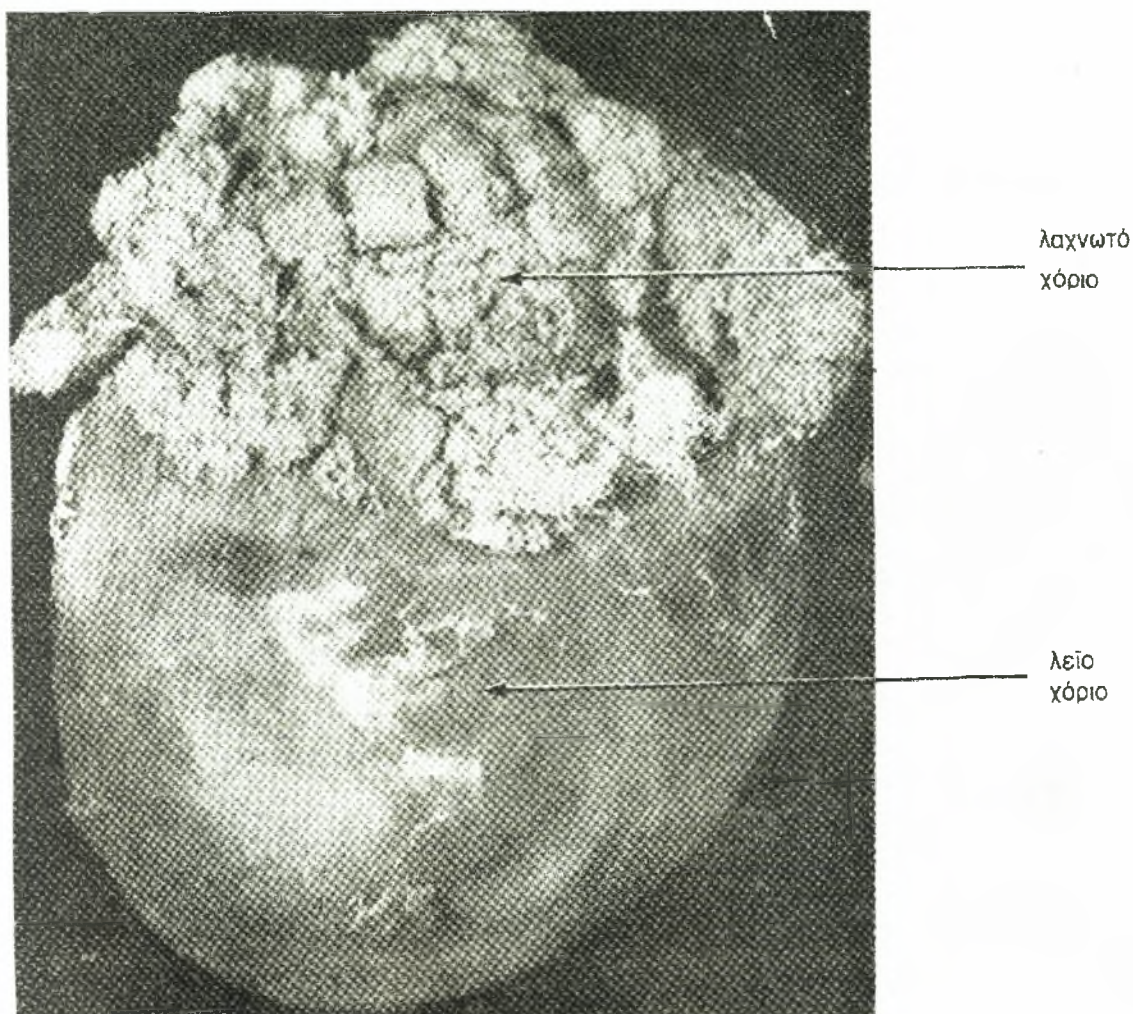
Εικόνα 6.

Σχηματική παράσταση μιας τομής δια μέσου ενός ώριμου πλακούντα. Μητρικό αίμα φτάνει στο μεσολάχινο διάστημα σα να αναβλύζει από πίδακα και η ανταλλαγή γίνεται με το εμβρυϊκό αίμα καθώς το μητρικό αίμα κυλάει γύρω από τις λάχνες. Το αρτηριακό αίμα που μπαίνει σπρώχνει το φλεβικό αίμα προς τις ενδομητρικές φλέβες, που διασκορπίζονται σε ολόκληρη την επιφάνεια του βασικού φθαρτού. Οι ομφαλικές φλέβες μεταφέρουν αποξυγονωμένο εμβρυϊκό (μπλε χρώμα) αίμα προς το πλακούντα και η ομφαλική φλέβα μεταφέρει οξυγονωμένο (κόκκινο χρώμα) προς το έμβryo.

Κατά τις πρώτες εβδομάδες της κύησης, κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα του περιβλήματος, διασπών το περιφερικό στρώμα της συγκυτιοτροφοβλάστης και διασκορπώνται στον υποκείμενο φθαρτό, πολλά δε από αυτά αποικίζουν το γειτονικό μυομήτριο όπου και ενώνονται για να σχηματίσουν τα τυπικά πολυπύρρηνα γιγαντιαία κύτταρα του πλακούντα, ο ρόλος των οποίων δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί πλήρως. Άλλες ομάδες κυτταροτροφοβλαστικών κύτταρων αναπτύσσονται εντός των μητριάων σπειροειδών αρτηριών και επεκτείνονται έως και το όριο φθαρτού-μυομητρίου. Αυτά τα κύτταρα σχηματίζουν την ενδαγγειακή τροφοβλάστη, αντικαθιστούν το τυπικό ενδοθήλιο και καταλαμβάνουν τα τοιχώματα του ενδοφθαρτικού μέρους των σπειροειδών αρτηριών, καταστρέφοντας έτσι τον μυϊκό και ελαστικό ιστό του μέσου χιτώνα τους και οδηγούν στην βαθμιαία αντικατάσταση του αγγειακού τοιχώματος από ινώδες υλικό και το οποίο προέρχεται κατά ένα μέρος του από ινωδογόνο του μητρικού αίματος, και κατά το υπόλοιπο από πρωτεΐνες που εκκρίνουν τα τροφοβλαστικά κύτταρα. Το αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η βαθμιαία εξασθένηση του τοιχώματος των ανωτέρω αρτηριών και κατόπιν η

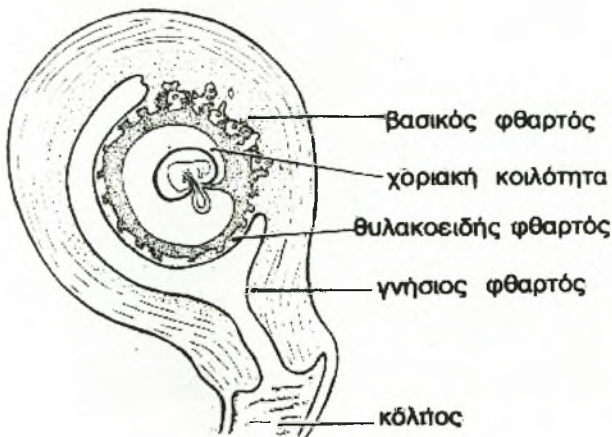
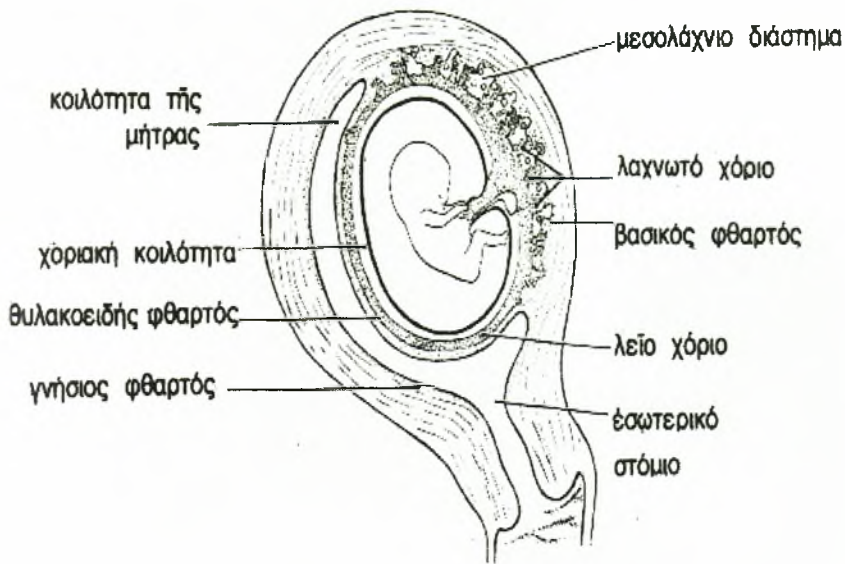
σημαντική διαστολή τους κάτω από την πίεση της μητρικής κυκλοφορίας. Αυτός είναι και ο σημαντικότερος παράγοντας που επιτρέπει την αύξηση της αιματικής ροής στον πλακούντα. (9).

Μεταξύ της 21ης ημέρας και του 4ου μήνα της κύησης, εκείνες οι λάχνες που βρίσκονται ακριβώς απέναντι από τη μητρική κοιλότητα και σε στενή σχέση με το θυλακοειδή φθαυτό, εκφυλίζονται και σχηματίζουν το λείο χόριο (Εικ.7, Εικ.8 και Εικ.9), ενώ η λεπτή στεφάνη του φθατού που καλύπτει αυτή τη περιοχή, προοδευτικά εκφυλίζεται, επιτρέποντας έτσι στο λείο χόριο την πλήρη επαφή του με τον τοιχωματικό φθαυτό, του απέναντι τοιχώματος της μητρικής κοιλότητας.



Εικόνα 7.

Φωτογραφία ενός ανθρωπίνου χοριακού σάκου που περιέχει ένα έμβρυο 13 εβδομάδων που δείχνει το λείο και το λαχνωτό χόριο.



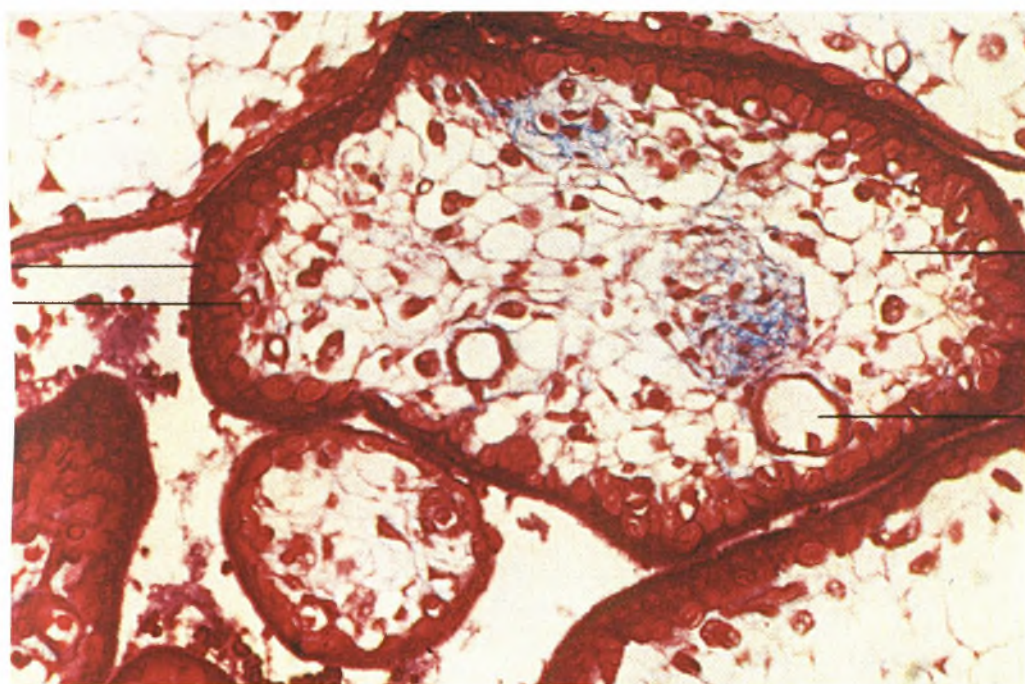
Εικόνες 8 και 9.

Σχέδια οβελιαίων τομών μήτρας 12^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας που δείχνουν τις σχέσεις των εμβρυϊκών υμένων προς το φθαρτό.

Οι λάχνες που βρίσκονται στη μεριά του βασικού φθαρτού

πολλαπλασιάζονται και προοδευτικά διακλαδώνονται για να σχηματίσουν

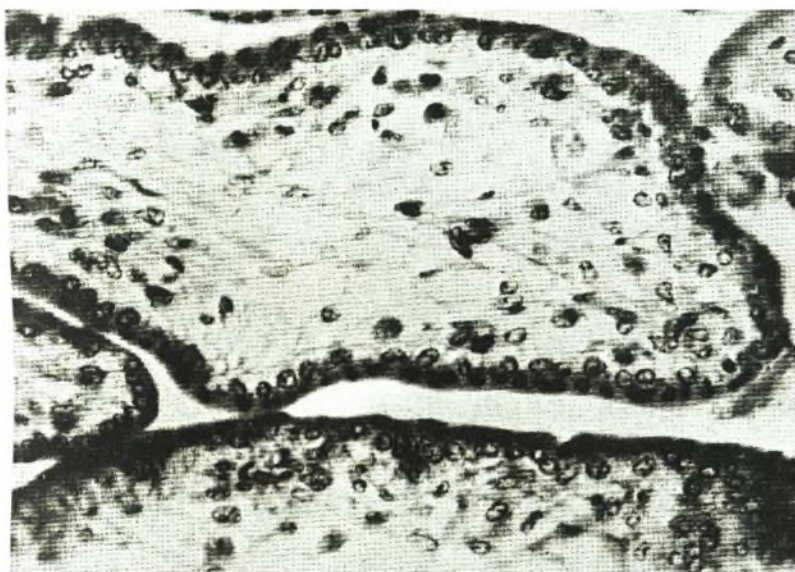
το λαχνωτό χόριο το οποίο και αναπτύσσεται στον οριστικό πλακούντα. Στη διάρκεια αυτής της περιόδου, λαμβάνει χώρα μερική μείωση των κυτταροτροφοβλαστικών στοιχείων του χοριακού πετάλου και του τροφοβλαστικού περιβλήματος, όπου κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης εκφυλίζονται και σε μεγάλο βαθμό αντικαθίστανται από ινώδες υλικό (στρώμα του Rohr). Οι συστάδες των κυττάρων που παραμένουν δημιουργούν νησίδια κυτταροτροφοβλάστης. Εικ.10 (10), και Εικ.11. (5).



Εικόνα 10.

Εγκάρσια διατομή της χοριονικής λάχνης πλακούντα στον 4^ο μήνα της κύησης. Η χοριονική λάχνη αποτελείται από χαλαρό εμβρυϊκό συνδετικό ιστό (χοριονικό

μεσόδερμα) και ένα εξωδερμικό τροφοβλαστικό περίβλημα. Στο χοριονικό μεσόδερμα υπάρχουν τριχοειδή και ηωσινόφιλα, κοκκιώδη ή κενοδοπιώδη, στρογγυλά κύτταρα, τα κύτταρα Hofbauer. Το τροφοβλαστικό περίβλημα μέχρι το τέλος του 4^{ου} μήνα της κύησης έχει δύο στιβάδες: την έσω επιθηλιακή στιβάδα (κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα του Langhans), που έχει σαφή όρια μεταξύ των μάλλον κυβοειδών κυττάρων και την έξω συγκυτιοτροφοβλαστική στιβάδα, που αποτελείται από πολυπύρρηνα στοιχεία, χωρίς κυτταρικά όρια. Οι μεσολάχνιοι χώροι περιέχουν μεμονωμένα μητρικά κύτταρα του αίματος και πήγματα ινώδους.



Εικόνα 11.

Μικροφωτογραφία χοριακής λάχνης στο δεύτερο στο δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης. Η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελεί συνεχή στιβάδα στην επιφάνεια. Τα κύτταρα της

κυτταροτροφοβλάστης σχηματίζουν μια ασυνεχή ακριβώς κάτω από τη συγκυτιοτροφοβλάστη.

Σε αντίθεση με την μείωση των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης του βασικού χοριακού πετάλου, κατά τον 4ο μήνα της κύησης, συμβαίνει ένα κύμα πολλαπλασιασμού των ενδαγγειακών κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, ένα μέρος των οποίων μετακινείται σε ανάστροφη κατεύθυνση, δηλαδή προς την μεριά του ενδομυομητρικού τμήματος των σπειροειδών αρτηριών, όπου και πάλι αντικαθιστά το ενδοθήλιο καταστρέφοντας τον μέσο αγγειακό χιτώνα και τον ελαστικό ιστό, οδηγώντας έτσι στην εναπόθεση ινώδους στο αγγειακό τοίχωμα. Αυτές οι αλλαγές πραγματοποιούνται σχεδόν ως την έκφυση των σπειροειδών αρτηριών από τις ακτινοειδείς μητριαίες αρτηρίες, και με την ολοκλήρωσή τους, μετατρέπουν τις ελικοειδείς-σπειροειδείς αρτηρίες του πλακουντιακού στρώματος, σε διατεταμένες χωνοειδείς, χωρίς αντίσταση, μητριαιοπλακουντιακές αρτηρίες, οι οποίες και αντικατοπτρίζουν την ολοένα αυξανόμενη αιματική ροή του πλακούντα. (Εικ.6).

Τα διαφραγμάτια του πλακούντα αρχίζουν να εμφανίζονται στον 3ο μήνα της κύησης. Σχηματίζονται κυρίως λόγω του διαφορετικού ρυθμού ανάπτυξης στις διάφορες περιοχές του πλακούντα, αλλά και λόγω των προεξοχών του βασικού χοριακού πετάλου στο μεσολάχινο χώρο από αγκυροβολούσες στήλες κυττάρων με χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης, και ως φυσικό επακόλουθο, τα διαφραγμάτια, έχουν την ίδια σύσταση με αυτή του βασικού χοριακού πετάλου, δηλαδή αποτελούνται από υπολείμματα κυττάρων κυτταροτροφοβλάστης και εναποθέσεις ινών. Γι' αυτό μπορούμε να πούμε ότι τα διαφραγμάτια αποτελούν τυχαίο δευτερεύων προϊόν της ανάπτυξης του πλακούντα και ως εκ τούτου, δεν έχουν κάποια ιδιαίτερη μορφολογική ή λειτουργική σημασία. Με αυτό το τρόπο, η μητρική επιφάνεια του πλακούντα χωρίζεται σε 15 με 20 λοβούς. (Εικ.2).

Το ρόλο της λειτουργικής και μορφολογικής υπομονάδος του πλακούντα παίζουν τα λοβίδια. Κάθε ένα απ' αυτά παράγεται από ένα και μόνο κορμό δευτερογενούς λάχνης, ο οποίος διασπάται ακριβώς κάτωθι του βασικού πετάλου, σε τριτογενείς λάχνες, οι οποίες με τη σειρά τους, σαρώνουν την περιοχή προς τη μεριά του βασικού πετάλου, σχηματίζοντας

το τελικό λαχνιακό δένδρο. Ο όρος κοτυληδόνα, αναφέρεται σ' εκείνο το μέρος του λαχνιακού δένδρου που έχει παραχθεί από μία και μόνη πρωτογενή λάχνη, με αποτέλεσμα ο αριθμός των λοβιδίων σε κάθε κοτυληδόνα να διαφέρει από 2 έως και 5. (11).

Ο πλακούντας έχει πάρει την οριστική του μορφή από το τέλος του 4ου μήνα της κύησης και δεν υπόκειται σε περαιτέρω ανατομική διαφοροποίηση. Η ανάπτυξή του, όμως, συνεχίζεται ως το τέρμα της κύησης και αυτή η ανάπτυξη αναφέρεται κυρίως στο σχηματισμό καινούργιων (φρέσκων) λαχνών και στη διακλάδωση του λαχνιακού δένδρου. Αυτή η ανάπτυξη συνοδεύεται συχνά από μία προοδευτική μεταβολή στην μορφολογική εμφάνιση των πιο περιφερικών λαχνών του δένδρου, που είναι και οι επιφορτισμένες, για την μητροεμβρυϊκή μεταφορά, λάχνες. Στο πρώτο τρίμηνο, οι λάχνες είναι μεγάλες, περιβάλλονται από ένα μανδύα τροφοβλάστης, ο οποίος εσωτερικά αποτελείται από κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, ενώ εξωτερικά υπάρχει ένα στρώμα συγκυτιοτροφοβλάστης. Το στρώμα της λάχνης σχηματίζεται από μεσεγγυματικό ιστό, στο κέντρο του οποίου-κατά το τέλος του 1ου

τριμήνου-διακρίνουμε τα εμβρυϊκά αγγεία. Κατά τη διάρκεια του 2ου τριμήνου, οι λάχνες είναι μικρότερες, το τροφοβλαστικό περίβλημα είναι λιγότερο ομαλό και τα τροφοβλαστικά κύτταρα είναι μικρότερα σε αριθμό. Περισσότερο κολλαγόνο ανευρίσκεται στο στρώμα, τα εμβρυϊκά αγγεία είναι μεγαλύτερα σε διάμετρο και αρχίζουν να παίρνουν θέση στην περιφέρεια της λάχνης. Στο 3ο τρίμηνο, οι λάχνες είναι σαφώς μικρότερες σε διάμετρο, το τροφοβλαστικό περίβλημα είναι πολύ λεπτό και τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα είναι ελάχιστα και δύσκολα διακρίνονται. Αυτή η εικόνα της τροφοβλάστης, οφείλεται -κυρίως- στο σχηματισμό λεπτών απύρηνων περιοχών συγκυτιοτροφοβλάστης. Είναι αυτή ακριβώς η αγγειο-συγκυτιακή μεμβράνη, η περιοχή, η κατάλληλα διαφοροποιημένη, για την μεταφορά των αερίων. Τα αγγεία του στρώματος έχουν μετατραπεί σε διατεταμένους αιματικούς κόλπους που έχουν μετακινηθεί προς την περιφέρεια και βρίσκονται ακριβώς κάτω από τη τροφοβλάστη. Αυτές οι αλλαγές αντιπροσωπεύουν τη λειτουργική ωρίμανση της λάχνης και αποτελούν ένδειξη της ηλικίας του πλακούντα. Το τελικό τους αποτέλεσμα είναι η αύξηση της επιφάνειας της τροφοβλάστης που βρίσκεται σε επαφή

με το μητρικό αίμα στο μεσολάχνιο διάστημα, η συμπλησίαση της μητρικής και εμβρυϊκής κυκλοφορίας, η αύξηση του κλάσματος της μητρο-εμβρυϊκής συγκέντρωσης των αερίων και η δημιουργία των πλέων ευνοϊκών συνθηκών μητρο-εμβρυϊκής μεταφοράς. (9) (11).

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK (HEAT-SHOCK PROTEINS) — ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.

Οι δομικές πρωτεΐνες μέσα στα κύτταρα, είναι παρούσες στη φυσική τους μορφή, σε αναδιπλούμενη κατάσταση. Μερικές φορές όμως, ζωτικά στάδια της πρωτεϊνικής βιογένεσης, τέτοια όπως η πρωτεϊνική σύνθεση και η μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, απαιτούν την προσωρινή ύπαρξη αυτών των πρωτεϊνών, σε μη αναδιπλούμενη μορφή ή σε μερικώς αναδιπλούμενη διαμόρφωση (διάταξη). Ως φυσική συνέπεια, τμήματα “θαμμένα” μέσα σε ένα πολυπεπτίδιο όταν αυτό βρίσκεται στη

φυσική του διαμόρφωση, εκτίθενται και αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες, προκαλώντας πρωτεϊνική συνάθροιση, η οποία με τη σειρά της είναι ιδιαίτερος επιβλαβής για το ίδιο το κύτταρο. Για να εμποδιστεί αυτή η πρωτεϊνική συνάθροιση που προκαλεί το “ξεδίπλωμα” των πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες του θερμικού shock προστατεύουν τις αναδυόμενες αλληλεπιδρώσεις πρωτεϊνικές επιφάνειες, με το να συνδέονται σ’ αυτές και διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την αναδίπλωση (περιέλιξη) των μη αναδιπλούμενων αλλά και των νεοδημιουργηθέντων πρωτεϊνών. Επιπλέον, η σύνδεση των πρωτεϊνών του θερμικού shock με τις αλληλεπιδρώσεις επιφάνειες των ολοκληρωτικά περιελιγμένων πρωτεϊνών, αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην ρύθμιση-διαμόρφωσή τους. Καθώς το θερμικό shock, αλλά και άλλες μορφές stress, προκαλούν τη μερική λύση της ελικοειδούς διαμόρφωσης των κυτταρικών πρωτεϊνών, η ικανότητα των πρωτεϊνών του θερμικού shock να προστατεύουν τα κύτταρα από τις βλαβερές συνέπειες του stress, τις καθιστά μοριακούς συνοδούς.

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, απαντούν στα περιβαντολογικά ερεθίσματα του stress, συμπεριλαμβανομένων και των αυξήσεων της

θερμοκρασίας και κατά συνέπεια και της κυτταρικής υπερθερμίας, συνθέτοντας ένα σύνολο από πρωτεΐνες που καλούνται **πρωτεΐνες του θερμικού shock (Heat Shock Proteins - HSP)**. Επιπροσθέτως, τα επιφορτισμένα για τη δημιουργία των HSPs γονίδια, είναι ιδιαιτέρως ανθεκτικά στις συνθήκες που προαναφέρθηκαν. Πολλοί οργανισμοί κατέχουν οικογένειες γονιδίων που δομικώς ομοιάζουν με τις HSP, αλλά διαφέρουν λειτουργικά από αυτές. Απαντούν σε πλήθος ζωντανών οργανισμών, από βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. (12) (13) (14) (15). Οι πρωτεΐνες του θερμικού shock, διαχωρίζονται σε υποομάδες βάση της μοριακής τους μάζας σε kilo Daltons. **Οι HSP των ομάδων 70, 90 και 60,** είναι οι πιο συχνά συναντούμενες. Εκτός από την προστασία του κυττάρου έναντι του stress, υπάρχουν ενδείξεις, ότι οι HSP είναι απαραίτητες για την κυτταρική ανάπτυξη και σε φυσιολογικές συνθήκες, καθώς επίσης αποτελούν μέρος της κυτταρικής απάντησης έναντι εξωγενών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων οξειδωτικών παραγόντων, τραυματισμού, χειρουργικής επέμβασης και τοξινών. (16) (17). Στον άνθρωπο, HSP έχουν ανεβρεθεί σε πολλούς κατεστραμμένους ιστούς, όπως αρθρικό υγρό σε

ρευματοειδείς αρθρώσεις, αθηρωματικές πλάκες και στον θυρεοειδή πασχόντων από αυτοάνοσες θυρεοειδίτιδες. (18) (19). Γονίδια με μεγάλο βαθμό ομοιότητας με τις HSP, τα οποία εκφράζονται κατασκευαστικώς και πιθανώς δεν είναι παρακινούμενα από το stress έχουν ονομαστεί *συγγενή γονίδια του θερμικού shock*. Επειδή όλες οι πρωτεΐνες μιας τάξης είναι σχεδόν όμοιες, και μερικές από αυτές είναι και κατασκευαστικώς εκφραζόμενες αλλά και παρακινούμενες από τη θερμότητα, θα τις συμπεριλάβουμε γενικά κάτω από τον όρο, πρωτεΐνες του θερμικού shock.

Παρ'όλο που το φαινόμενο της αυξανόμενης σύνθεσης των πρωτεϊνών του θερμικού shock κάτω από την επίδραση του stress, έχει γίνει γνωστό εδώ και 30 χρόνια τώρα, οι λειτουργίες των HSP έχουν για καιρό μείνει δυσνόητες. Στα περασμένα χρόνια, παρόλα αυτά, έχει γίνει προφανές, ότι οι HSP είναι άμεσα εμπλεκόμενες στα ζωτικά στάδια της πρωτεϊνικής βιογέννησης. Εξ' αιτίας αυτής της ανάμιξης έχουν χαρακτηριστεί "Μοριακοί σύμμαχοι - συνοδοί". Συγκεκριμένα **οι HSP της οικογένειας 70**, εμφανίζονται να πραγματοποιούν μια ποικιλία από συνοδευτικές λειτουργίες: Σταθεροποιούν μη αναδιπλούμενες πρόδρομες μορφές

πρωτεϊνών, προγενέστερα της συναρμολογήσεως τους σε πολυμοριακά συμπλέγματα μέσα στο κυτταρόπλασμα και της μεταφοράς τους στο κυτταροπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια, διατηρούν τις μετακινηθείσες πρωτεΐνες σε μη αναδιπλούμενη μορφή πριν την αναδίπλωση και συναρμολόγηση στα οργανίδια, και παίζουν ρόλο στην αναδιάταξη των πρωτεϊνικών ολιγομερών και στην λύση των πρωτεϊνικών συναθροισμάτων. **Η οικογένεια των HSP της ομάδος 60**, άλλη μια κύρια τάξη των πρωτεϊνών των οποίων η έκφραση εντείνεται από το θερμικό shock, εμφανίζει συνοδό δραστηριότητα. Παρ'όλο που δομικώς διαφέρουν από τις HSP 70, μοιράζονται γενικά λειτουργικά γνωρίσματα, καθώς και αυτές δεσμεύουν μη αναδιπλούμενα πολυπεπίδια. Οι HSP 60 παίζουν ένα κρίσιμο ρόλο στην κατάλυση της αναδίπλωσης των μη αναδιπλουμένων πρωτεϊνών και συναρμολογούν μεγαλύτερες πρωτεϊνικές κατασκευές. Νεότερες εργαστηριακές μελέτες, στις οποίες αύξηση της θερμοκρασίας από 42° σε 46°C οδήγησε σε πενταπλασιασμό των HSP 60 σε στελέχη *Escherichia coli* και σε τριπλασιασμό των μιτοχονδριακών HSP 60 της ζύμης, υποθέτουν την ύπαρξη συνέργιας μεταξύ των HSP 60 και 70, η

οποία είναι αναγκαία για την προστασία των πρωτεϊνών από την αποδόμηση που προκαλεί το θερμικό stress. (20). Ένας τέτοιος εναλλακτικός μηχανισμός δράσης των HSP 60 και 70, έχει περιγραφεί σε de novo αναδίπλωση των πρωτεϊνών. (21). **Οι HSP της ομάδος 90** διαφέρουν από τις HSP 60 και 70 στο ότι ρυθμίζουν την λειτουργία των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών με το να δεσμεύονται σ' αυτές, αλλά μπορούν και το πραγματοποιούν αυτό, μέσω ενός ATP-εξαρτώμενου μηχανισμού (22) (23). Είναι όμως εμφανές, ότι απαιτούνται περαιτέρω εργαστηριακές και κλινικές μελέτες, για την πλήρη διαλεύκανση του ρόλου αλλά και του μηχανισμού δράσης αυτών των πρωτεϊνών. Στον πίνακα που ακολουθεί, περιλαμβάνονται οι διάφορες ομάδες των HSP σε διάφορους οργανισμούς, καθώς και η ενδοκυττάρια κατανομή τους (22).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

HSP	Οργανισμοί	Κυτταρόπλασμα	Ενδοπλασματικό δίκτυο	Μιτοχόνδρια	Χλωροπλάστες
p 70	E.coli	Dnak			
	S.cerevisiae	Ssa1-4p Ssb1/2p	Kar2p	Ssc1p	
	Θηλαστικά	HSP72 (HSP 70) HSP73 (HSP70)	Bip	mtp70	
	Φυτά				ctHSP70
p 60	E.coli	GroEL			
	S.cerevisiae	Tcp1p		HSP60	
	Θηλαστικά	TRiC		HSP58	
	Φυτά	TCP1			cpn60
p 90	E.coli	HtpG			
	S.cerevisiae	HSP82p Hsc82p			
	Φυτά	HSP90	grp90		

ΟΙ πρωτεΐνες ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p70.

Οι πρωτεΐνες αυτής της ομάδος ζυγίζουν περί τα 70 Kilo Daltons. Τις ανευρίσκουμε σε όλα σχεδόν τα κυτταρικά συστατικά των ευκαρυωτικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των πυρήνων, μιτοχονδρίων, ενδοπλασματικού δικτύου, χλωροπλαστών, κυτταροπλάσματος όπως φαίνεται και στον πίνακα 1. Επιπροσθέτως, έχουν βρεθεί και σε αρκετές ομάδες βακτηριδίων. Όλες οι πρωτεΐνες αυτής της ομάδας δεσμεύουν ισχυρώς ATP και κατέχουν δραστηριότητα ATPάσης, η οποία και διεγείρεται με την δέσμευσή τους σε πρωτεΐνες που έχουν χάσει την ελικοειδή διαμόρφωσή τους, και σε συνθετικά πεπτίδια. (24). Μέσω περιορισμένης πρωτεόλυσης, βρέθηκε ότι η ικανότητα των HSP 70 να δεσμεύονται με πεπτίδια, εδρεύει στο C-τελικό άκρο του πρωτεϊνικού τμήματος, αφού το N-τελικό άκρο είναι επιφορτισμένο με την δέσμευση των μορίων του ATP. (25).

*Η πρώτη HSP 70, που βρέθηκε να παίζει ρόλο στην πρωτεϊνική διαμόρφωση, είναι η BiP που εδρεύει στο ενδοπλασματικό δίκτυο (πίνακας 1). (26). Αρχικώς, η σύνθεσή της βρέθηκε να αυξάνει με την συσσώρευση στο ενδοπλασματικό δίκτυο ατελώς αναδιπλούμενων πρωτεϊνών, και ονομάστηκε ως γλυκοζο-ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη των θηλαστικών - grp 78. (27) (28). Συγκεκριμένα, δεσμεύει τις βαριές αλυσίδες ανοσοσφαιρινών, οι οποίες εμφανίζουν ελλείμματα στην σύνδεσή με τις ομόλογές τους ελαφρές. (26). Μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν την παροδική σύνδεση της BiP με άλλες πρωτεΐνες, όπως υπομονάδες αιμοσυγκολλητίνης influenza. Η σύνδεση αυτή συμβαίνει πριν την συναρμολόγηση των υπομονάδων αυτών, σχηματίζοντας μ' αυτό τον τρόπο, αρκετά πιο σταθερά συμπλέγματα με τις αποδομημένες και παρεκτρεπόμενες από την φυσική τους διαμόρφωση πρωτεΐνες. (29) (30). Στη συνέχεια, ακολούθησαν και άλλες μελέτες που έφεραν στο φως νεότερα δεδομένα για τον ρόλο των HSP 70. *Ανεξάρτητα με τη κυτταρική τους εντόπιση, όλες οι HSP της ομάδος 70, δεσμεύουν πρωτεϊνικά μόρια και κυρίως πρωτεΐνες που έχουν χάσει την ελικοειδή τους διαμόρφωση.**

Είναι αξιοσημείωτη η κατασκευαστική ομοιότητα των HSP 70 με τα HLA αντιγόνα της τάξης 1 του συστήματος MHC. (31). Τα αντιγόνα αυτά δεσμεύουν εκτεταμένης διαμόρφωσης πρωτεΐνες. (32) (33). Το ίδιο ισχύει και για την HSP 70, Dnak, του κυτταροπλάσματος της *Escherichia coli*. (34). Η πρωτεΐνη BiP συνδέεται, με ιδιαίτερα ισχυρό δεσμό, με πεπτίδια μεγέθους τουλάχιστον επτά αλιφατικών και υδρόφοβων αμινοξέων. (35). Η απελευθέρωση των πεπτιδίων αυτών από την BiP εξαρτάται από την δέσμευση ATP και κατόπιν την υδρόλυση των δεσμών αυτών. (36). *Αυτή ακριβώς η ικανότητα όλων των υποομάδων των HSP 70, της δέσμευσης και απελευθέρωσης από υδροφοβικούς δεσμούς με πρωτεΐνες που έχουν χάσει την ελικοειδή τους διαμόρφωση, προσδιορίζει τον ιδιαίτερο ρόλο τους στην μεγάλη ποικιλία των ζωτικών λειτουργιών του κυττάρου, όπως είναι η πρωτεϊνική σύνθεση, αναδίπλωση, ολιγομερισμός και μεταφορά αυτών των πρωτεϊνών.*

Διάφορες έρευνες αποκάλυψαν την ύπαρξη των HSP 70 στα μιτοχόνδρια διαφόρων ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων

κυττάρων θηλαστικών (37), αλλά και βακτηριδίων, όπως *Sacharomyces cerevisiae* (38) (πίνακας 1) και *Trypanosoma Cruzei* (39).

Ως γνωστό, το κυτταρόπλασμα με το ενδοπλασματικό δίκτυο και τη συσκευή του Golgi που περιλαμβάνει, παίζει τον πλέον σημαντικό ρόλο στη σύνθεση, μετατροπή, μεταφορά και ταξινόμηση των πρωτεϊνών. Ως επακόλουθο, η μελέτη των HSP που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα αποκτά εξέχουσα σημασία. Υπάρχουν σημαντικές αποδείξεις από τις παρελθούσες έρευνες, ότι οι κυτταροπλασματικές HSP 70 είναι στενά συνδεδεμένες με την αναδίπλωση και έκκριση των πρωτεϊνών. Όλοι οι οργανισμοί περιέχουν τουλάχιστον μία HSP 70 στο κυτταρόπλασμά τους. Τα κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν μία δομική μορφή HSP σε άφθονη ποσότητα, την HSP 73, αλλά και μία προκλητώς δημιουργούμενη, την HSP 70. Οι δύο αυτές HSP είναι περισσότερο από 90% όμοιες, όσον αφορά την χημική τους δομή, και δεν φαίνεται να διαφέρουν λειτουργικώς, καθόσον και οι δύο σχηματίζουν σύνθετα πρωτεϊνικά ολιγομερή (40).

Γενετικές μελέτες των κυτταροπλασματικών HSP 70 στο *Sacharomyces cerevisiae* απέδειξαν ότι μπορεί να διαχωριστούν σε δύο

υποομάδες, τις SSA και SSB πρωτεΐνες (41). Διαφέρουν θεμελιωδώς μεταξύ τους και ενώ η έκφραση των SSA διεγείρεται από το θερμικό shock, το ακριβώς αντίθετο ισχύει για τις SSB, οι οποίες κάτω από συνθήκες θερμικού shock διακόπτουν τη λειτουργία τους (42). Οι SSB βρίσκονται συγκεντρωμένες στα πολυσωμάτια, που ως γνωστό αποτελούν συνάθροιση ριβοσωματίων, και είναι πολύ πιθανό να παίζουν ένα ιδιαίτερο ρόλο στην μεταφραστική διαδικασία και εν συνεχεία στη σύνθεση νέων πρωτεϊνικών μορίων που λαμβάνει χώρα εκεί. Η ύπαρξη ενός τουλάχιστον μέλους της υποομάδας των SSA, είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου (43). Παρόλα αυτά, χρησιμοποιώντας άθικτα πρόδρομα μόρια αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, βρέθηκε ότι το “ξετύλιγμα” αυτών των μορίων ήταν ανεξάρτητο της υπάρξεως ATP καθώς και κυτταροπλασματικών HSP 70 (43). Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα, *ότι όλες οι HSP 70 δεσμεύονται μόνο στις μη αναδιπλούμενες πρωτεΐνες και δεν δεσμεύονται στα ώριμα πρωτεϊνικά μόρια.* Έτσι, οδηγούμαστε στην υπόθεση, *ότι η λειτουργία των HSP 70 είναι να προστατεύουν την συνάθροιση των πρωτεϊνικών προδρομικών μορφών και*

να σταθεροποιούν αυτά τα μόρια σε μια μη αναδιπλούμενη και, ακριβώς για αυτό το λόγο, ικανή για μετακίνηση μορφή. Αυτό συμβαίνει πιθανότατα, προτού αυτά τα μόρια αποκτήσουν πλήρη ελικοειδή μορφή. Άλλες έρευνες από κύτταρα θηλαστικών συμφωνούν στο ρόλο που παίζουν οι κυτταροπλασματικές HSP 70, στην πρωτεϊνική μετακίνηση. Έχει αποδειχθεί ο ρόλος των HSP 70 στην διέγερση της μετακίνησης μιας πρόδρομης πρωτεϊνικής μορφής, της M13, στα μικροσωμάτια του κυττάρου (44) και της εισόδου μορφών προ-ορωϊθίνης στα μιτοχόνδρια (45). Ωστόσο, κυτταροπλασματικές HSP 70 διευκολύνουν τη μεταφορά πρωτεϊνών και σε άλλα οργανίδια του κυττάρου. Συγκεκριμένες μικρές αλυσίδες αμινοξέων που βρίσκονται σε αρκετές πρωτεΐνες, παίζουν κύριο ρόλο στη δέσμευση αυτών των πρωτεϊνών στις HSP 70, και κατόπιν εισέρχονται στα λυσοσωμάτια των κυττάρων των θηλαστικών, όπου και αποδομούνται (46). Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις και για τον σπουδαίο ρόλο των HSP 70 στην αποτελεσματική μεταφορά πρωτεϊνών εντός του πυρήνα (47). Παρ'όλες όμως τις ανωτέρω έρευνες και ενδείξεις, ο ακριβής μηχανισμός

της αλληλεπίδρασης των HSP 70 με τις πρόδρομες πρωτεϊνικές μορφές, είναι ακόμη αδιευκρίνιστος.

Ιδιαίτερος είναι ο ρόλος ,δύο άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις HSP 70 και φαίνεται ότι συνεπικουρούν στη λειτουργία αυτών. Αυτές είναι οι πρωτεΐνες DNAJ και GrpE (48). Αποτελούν ομόλογες μορφές πρωτεϊνών με την HSP 70 του κυτταροπλάσματος της E.coli, την DNAK (πίνακας 1). Η DNAK είναι ιδιαίτερος σημαντική για την έκκριση των πρωτεϊνικών παραγώγων της E.coli (49), παρουσιάζοντας δραστηριότητα ΑΤΡάσης. Αυτή ακριβώς η δραστηριότητα επιταχύνεται κατά 50 φορές παρουσία των DNAJ και GrpE πρωτεϊνών (36). Σημαντικός, όπως θα δούμε και παρακάτω, είναι ο ρόλος αυτών των επικουρικών πρωτεϊνών στη λειτουργία των στεροειδικών υποδοχέων.

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p70 ΚΑΙ Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ.

Διάφορες μελέτες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια, προσπαθούν να μελετήσουν την συγκέντρωση και την έκφραση των HSP 70 στα διάφορα μέρη του πλακούντα, όπως και να συσχετίσουν τις τιμές των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών αυτών μορίων με τον τύπο του τοκετού, καθώς και με διάφορες άλλες παραμέτρους (Apgar score κλπ.).

Όπως είναι φυσικό, η εμβρυοπλακουντιακή μονάδα, λόγω της ιδιαίτερης ευαισθησίας της σε συνθήκες διαφόρων μορφών stress, αποτελεί εξέχουσας σημασίας ιστό για την έκφραση των HSP 70. Πράγματι, οι HSP 72 και 73 ανευρίσκονται σε άφθονη ποσότητα σε όλη την επιφάνεια του πλακούντα, και στους φυσιολογικούς τοκετούς αλλά και σε τοκετούς που διενεργήθηκαν με καισαρική τομή, χωρίς να ανιχνεύεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στις τιμές τους, όταν μελετούνται πλακούντες από κυήσεις με νεογνά διαφορετικού Apgar score (50). Η συγκέντρωσή τους

είναι σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου και δεν φαίνεται να αυξάνεται με την πάροδο της κύησης. Είναι παρούσες στο κυτταρόπλασμα όλων των κυτταρικών τύπων του πλακούντα. Οι HSP 70 ανιχνεύονται σε μεγάλο βαθμό, επιπλέον, και σε άλλους ιστούς που έχουν σχέση με μια εγκυμοσύνη, όπως ο ομφάλιος λώρος, το ενδομήτριο, εμβρυϊκά κύτταρα, αμνιακό υγρό, λείο χόριο και η εξωεμβρυϊκή τροφοβλάστη του βασικού πετάλου (51). Η ουσιώδης έκφραση των πρωτεϊνών αυτών στους ιστούς που αναφέρθηκαν, μαρτυρά ότι παίζουν ρόλο στην ρύθμιση της ομοιόστασης του κυττάρου, καθώς επίσης ότι αυτοί ακριβώς οι ιστοί, στους οποίους ανευρίσκονται οι HSP 70, είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε παράγοντες πρόκλησης stress (51). Μπορεί ακόμη να υποθέσει κανείς, την ύπαρξη σημαντικής διαφοράς στην έκφραση των HSP 70, στους διάφορους ιστούς που αποτελούν τα προϊόντα της σύλληψης, ανάλογα με το βαθμό του stress που υφίστανται αυτά. Κατά τη διάρκεια του τοκετού, οι εμβρυϊκές μεμβράνες υφίστανται σημαντικό βαθμό μηχανική καταπόνηση. Μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, είναι δυνατή η ανεύρεση μεγάλου βαθμού ενδοκυττάρων χασμάτων και επιπέδωση των κυττάρων της

αμνιακής μεμβράνης (52). Ο διαχωρισμός των μεμβρανών αυτών που επακολουθεί, μπορεί να οδηγήσει σε απάντηση πρόκλησης στο stress, δηλαδή στην παραγωγή HSP, από τα κύτταρα της αμνιακής μεμβράνης και του λείου χορίου. Έχουν ακόμη παρατηρηθεί μορφολογικές αλλαγές των μακροφάγων του αμνιακού μεσεγγύματος, που προκαλούνται από το stress του τοκετού (53). Ωστόσο, για την στατιστική τεκμηρίωση όλων των ανωτέρω, ιδιαίτερης σημασίας, δεδομένων, παρατηρήσεων και διαφορών, θα απαιτηθούν αρκετές ακόμη καλά οργανωμένες μελέτες.

Όπως είναι γνωστό, κατά την διάρκεια της γέννας, η οποία αποτελεί μια κατάσταση ιδιαίτερης και οξείας καταπόνησης για την μητέρα αλλά και για το κύημα, λαμβάνει χώρα αυξημένη έκκριση φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) (54) (55). Είναι γνωστή εξάλλου η υπόθεση, ότι η έναρξη του τοκετού απαιτεί την δεκαπλάσια αύξηση της ευαισθησίας των εμβρυϊκών επινεφριδίων στην ACTH, που λαμβάνει χώρα λίγο πριν την έναρξη της πρώτης φάσης του τοκετού (56) (57). Η επακόλουθη αύξηση της κορτιζόλης στην εμβρυϊκή κυκλοφορία, ίσως αποτελεί το εναρκτήριο σήμα του τοκετού (58). Αν σε όλα αυτά, προστεθεί και το γεγονός ότι η

έκκριση των επινεφριδιακών HSP 70 ρυθμίζεται από την ACTH (59), τότε είναι εύλογος ο συσχετισμός και των HSP 70, εκτός από τα κορτικοστεροειδή, με την έναρξη του τοκετού. Απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες, για την πλήρη διασαφήνιση του ρόλου των HSP στην διαδικασία του τοκετού.

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p90.

Η τρίτη μεγάλη, μετά τις HSP 60 και 70, οικογένεια πρωτεϊνών θερμικού shock, που ανευρίσκεται σε όλους τους οργανισμούς μέχρι σήμερα, είναι οι HSP 90, που εξ'ορισμού έχουν μοριακή μάζα περί τα 90 Kilo Daltons. Έχουν ανεβρεθεί και ταυτοποιηθεί έως τώρα, δύο γονίδια υπεύθυνα για την παραγωγή HSP 90 στη ζύμη (60). Αντίθετα, στην *Escherichia coli* και στην *Drosophila*, μόνο μία κατηγορία HSP 90 έχει ανιχνευθεί (61) (62). Στα θηλαστικά τουλάχιστον μία πρωτεΐνη όμοια με HSP 90 ανευρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, εκτός από τις κυτταροπλασματικές μορφές των HSP 90 (Πίνακας 1) (63) (64).

Όπως οι HSP 70, έτσι και οι HSP 90 μπορούν και δεσμεύουν μόρια ATP (65). Κατά τη διάρκεια της σύνδεσης αυτής, οι HSP 90 υφίστανται μια σειρά από αλλαγές στη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού τους μορίου (66) και έχουν “ενοχοποιηθεί” ότι διευκολύνουν, μ’ αυτό τον τρόπο, την αναδίπλωση του μορίου της αποδομημένης κιτρικής συνθετάσης στον κύκλο του Krebs (67). Έχει αποδειχθεί ότι, HSP 90 από μία σειρά διαφορετικών οργανισμών, κατέχουν δραστηριότητα ATPάσης, αποκτώντας έτσι ιδιαίτερη σημασία στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, σημασία που μοιράζονται και οι τρεις κατηγορίες HSP 60, 70 και 90 (68). Βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι κυτταροπλασματικές HSP 90, μπορούν και συνδέονται με μια ποικιλία κυτταρικών πρωτεϊνών, όπως ακτίνη, νημάτια του κυτταροπλάσματος, κινάση της τυροσίνης, πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό διαφόρων ιών, καθώς και με στεροειδικούς ορμονικούς υποδοχείς (13). Αυτή ακριβώς η τελευταία ικανότητα σύνδεσης των HSP 90 με ορμονικούς υποδοχείς, είναι ιδιαίτερος σημαντική και μελετάται εκτενώς στις μέρες μας.

Με μια πρώτη ματιά, η μεταφορά ερεθίσματος από τους στεροειδικούς υποδοχείς, φαίνεται απλή: Αυτοί οι υποδοχείς είναι κυτταρικές πρωτεΐνες, που ενεργοποιούνται από τις ανάλογες ορμόνες τις οποίες δεσμεύουν, και οι οποίες προκαλούν αλλαγή της διαμόρφωσης του πρωτεϊνικού μορίου του υποδοχέα, ο οποίος τώρα δεσμεύει DNA και διαμορφώνει αναλόγως την μετάφραση του ερεθίσματος. Τα πράγματα είναι όμως πολύ διαφορετικά στην πραγματικότητα. Υπάρχουν αρκετά πρωτεϊνικά μόρια-κλειδιά, τα οποία παίζουν θεμελιώδη ρόλο στην μεταφορά του ορμονικού ερεθίσματος. Όταν απουσιάζει το ορμονικό ερέθισμα, οι στεροειδικοί υποδοχείς-συμπεριλαμβανομένων των ανδρογονικών, οιστρογονικών και γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων-βρίσκονται σε κατάσταση “συμπλεγμάτων”, που αποτελούνται από ένα μονομερές του υποδοχέα, ένα διμερές της HSP 90, και πιθανότατα στο σχηματισμό αυτών των συμπλεγμάτων παίρνουν μέρος και οι HSP 70, καθώς και οι πρωτεΐνες DNAJ και GrpE, που αποτελούν ομόλογες μορφές πρωτεϊνών με την HSP 70 του κυτταροπλάσματος της E.coli, την DNAK (πίνακας 1) (βλέπε και πιο πάνω-HSP 70) (69) (70). Με την ενεργοποίηση, κατόπιν, του υποδοχέα

από το ορμονικό ερέθισμα και τη σύνδεση του “συμπλέγματος” με την ανάλογη ορμόνη, ο ενεργοποιημένος τώρα υποδοχέας, αποχωρίζεται από το υπόλοιπο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα και δεσμεύεται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, διαμορφώνοντας έτσι την έκφραση-μετάφραση συγκεκριμένων γονιδίων του κυττάρου. Η κατάλληλη αλληλεπίδραση των στεροειδικών υποδοχέων με τις HSP 90, είναι απαραίτητη για την ορθή πρωτεϊνική διαμόρφωση του υποδοχέα στο χώρο, ούτως ώστε αυτός να βρίσκεται διαρκώς σε κατάσταση “ετοιμότητας” για την σύλληψη της ανάλογης ορμόνης και την ενεργοποίηση κατόπιν της αλυσιδωτής αντιδράσεως (70) (71).

Πιθανότατα, ο ρόλος των HSP 70, DNAJ και GrpE, είναι να συναθροίζουν τις HSP 90 πάνω στην επιφάνεια του στεροειδικού υποδοχέα, αφού μπορούν και συνδέονται σ’ αυτές μέσω ενός ATP-εξαρτώμενου μηχανισμού. Επίσης, είναι πολύ ενδιαφέρουσα η ανακάλυψη στεροειδικών υποδοχέων, που έχουν χάσει- μέσω μετάλλαξης -την περιοχή εκείνη που είναι ειδική για την σύνδεσή τους με τις HSP 90, και οι οποίοι δεν σχηματίζουν “συμπλέγματα” (72). Αυτοί οι υποδοχείς είναι,

κατασκευαστικώς, διαρκώς ενεργοί, ως προς την σύνδεσή τους με την ορμονική ένωση, δίδοντας έτσι μια καινούργια σημασία στον ρόλο των HSP 90, αφού αυτές πέρα από το να διαμορφώνουν το ορμονικό ερέθισμα, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελούν προφανώς και τον τρόπο εκείνο μέσω του οποίου ένα σύμπλεγμα επιλέγεται για το αν θα αντιδράσει ή όχι στο ορμονικό ερέθισμα. Καθορίζουν, με άλλα λόγια, το μέγεθος της απάντησης των υποδοχέων στο ανάλογο ερέθισμα (70) (72). Σύγχρονες έρευνες πάνω στις HSP 90 του *Saccharomyces cerevisiae*, έχουν φέρει στο φως, την ύπαρξη ενός καινούργιου πρωτεϊνικού συνοδού της οικογένειας των DNAJ, προερχομένου από μετάλλαξη, την YDJ1, η οποία συνδεόμενη με τις HSP 90, καταστέλλει την λειτουργία των οιστρογονικών και των γλυκοκορτικοειδικών υποδοχέων, και ελαττώνει αρκετά την λειτουργία του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης (73). Οπωσδήποτε, είναι απαραίτητη η περαιτέρω ενδελεχής μελέτη και έρευνα, για την πλήρη διαλεύκανση του ρόλου των HSP 90, και του ακριβούς μηχανισμού με τον οποίο τροποποιούν την αντίδραση ορμόνης-υποδοχέα.

ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΘΕΡΜΙΚΟΥ SHOCK p90 ΚΑΙ Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ.

Όπως και με τις HSP 70, γίνεται προσπάθεια να ανιχνευτεί η συγκέντρωση και κατόπιν ο ρόλος και η σημασία των HSP 90 στην πλακουντιακή μονάδα.

Σε ανάλογες μελέτες, όπως αυτές που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο HSP 70 και ο πλακούντας, ανεβρεθεί ότι οι HSP 90, εντοπίστηκαν σε ικανή συγκέντρωση στο κυτταρόπλασμα όλων των τροφοβλαστικών κυττάρων που βρίσκονται έξω από τη χοριακή λάχνη αλλά η συγκέντρωσή τους πρέπει να αναφερθεί ότι ήταν ιδιαίτερος αυξημένη στον πυρήνα αυτών των κυττάρων (74).

Στο κυτταρόπλασμα της συγκυτιοτροφοβλάστης των χοριακών λαχνών, υπήρξε ανίχνευση συγκέντρωσης HSP 90, αλλά όχι στον αυξημένο βαθμό που ανεβρεθεί στα εκτός λάχνης τροφοβλαστικά κύτταρα, και πρέπει να αναφερθεί ότι και εδώ η παρουσία των HSP 90 ήταν πιο έντονη στον πυρήνα αυτών των κυττάρων (74).

Μελετώντας κατόπιν τον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων της τροφοβλάστης του λείου χορίου, υπήρξε θετική αντίδραση ανίχνευσης HSP 90, αλλά δεν ανευρεθεί σημαντική συγκέντρωση αυτών των πρωτεϊνών του θερμικού shock, στο αμνίο όπως και στο φθαρτό χιτώνα (75).

Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτά τα ευρήματα ήταν παρόντα σε όλες τις ομάδες που μελετήθηκαν (ενδεικτικά αναφέρονται τελειόμηνες και πρόωρες κυήσεις, φυσιολογικοί τοκετοί και καισαρικές τομές).

Τέλος, πρέπει να σημειώσουμε ως συμπέρασμα, ότι οι HSP 90, όπως και οι HSP 70, ανευρίσκονται σταθερά στα εξωλαχνιακά τροφοβλαστικά κύτταρα, καθ' όλη τη διάρκεια του 3^{ου} τριμήνου, και είναι απαραίτητο να υπάρξουν ακόμη πιο εμπειριστατωμένες μελέτες, ούτως ώστε να αποκρυπτογραφηθεί πλήρως ο ρόλος αυτών των πρωτεϊνών στα κύτταρα της εμβρυοπλακουντιακής μονάδος (76).

ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό της έρευνας μας συγκεντρώθηκε από υλικό ξεσμάτων από γυναίκες που είχαν βεβαιωμένη υπερηχογραφικά παλίνδρομη κύηση και βάση περιόδου ηλικία κύησης μικρότερη των 12 εβδομάδων και από πλακούντες κύησης που περατώθηκαν πέρα των 36 εβδομάδων βάση τελευταίας περιόδου αλλά και βάση υπερηχογραφικής ηλικίας κύησης. Συγκεντρώθηκε υλικό από 50 περιπτώσεις παλίνδρομων κύησης πρώτου τριμήνου και 50 τελειόμηνοι πλακούντες. Το υλικό στο σύνολό του συγκεντρώθηκε στο Μαιευτήριο « Έλενα Βενιζέλου », στο Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και στην Ιδιωτική Μαιευτική κλινική της Λάρισας « Η Θεοτόκος ».

Όλες οι γυναίκες που συμμετείχαν στην έρευνα έδωσαν την προφορική συγκατάθεσή τους για τη συλλογή του υλικού και την μελέτη του για τις ανάγκες της εργασίας μας. Όλες οι γυναίκες που αποτελούν την κατηγορία

των παλίνδρομων κύσεων πρώτου τριμήνου, υπεβλήθησαν σε εκκενωτική απόξεση της ενδομητρίου κοιλότητας με αναρροφητικό ξέστρο.

Για τη διάγνωση της παλίνδρομης κύησης πρώτου τριμήνου χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια κατά Nielson et al. που περιλαμβάνουν την ύπαρξη ενός ενδομητρίου σάκου κύσεως με ύπαρξη ενός εμβρυϊκού πόλου ίσο ή και μεγαλύτερο των 10 χιλιοστών χωρίς καρδιακή λειτουργία σε υπερηχογράφημα που πραγματοποιήθηκε δια της κοιλιακής οδού.

Τα χαρακτηριστικά των περιστατικών που αποτελούν αυτή την ομάδα είναι τα ακόλουθα:

Ηλικία : 18 έως 39 χρονών. (Μέση ηλικία 26,42 έτη).

Πρώτη αποβολή για όλες τις γυναίκες.

Το 96% των γυναικών είναι Ελληνικής καταγωγής και το υπόλοιπο 4% Αλβανικής καταγωγής.

Τα χαρακτηριστικά των περιστατικών που αποτελούν την δεύτερη ομάδα μελέτης μας-αυτή των τελειομήνων κύσεων- είναι τα ακόλουθα:

Ηλικία: 18 έως 42 χρονών. (Μέση ηλικία 26,03 έτη).

Μέση ηλικία κύσεως: 38,13 εβδομάδες.

Μέσος αριθμός προηγούμενων τοκετών ζωντανών
νεογνών: 1,44

Μέθοδος τοκετού: 28 φυσιολογικοί τοκετοί (αναλογία
56%), 11 τοκετούς με αναρροφητικό εμβρυουλκό (αναλογία 22%) και 11
τοκετούς δια καισαρικής τομής (αναλογία 22%).

Λόγος καισαρικής τομής: Προηγηθείσα καισαρική τομή: 4
περιπτώσεις (αναλογία 8%), ισχιακή προβολή 2 περιπτώσεις (αναλογία
4%), 3 επείγουσες καισαρικές λόγω εμβρυϊκής δυσχέρειας (stress) (
αναλογία 6%) και 2 περιπτώσεις λόγω δευτεροπαθούς παύσεως της
διαστολής του τραχήλου και καθόδου της κεφαλής του εμβρύου (αναλογία
4%). Η μία εκ των δύο τελευταίων περιπτώσεων ήταν ταυτόχρονα και
προηγηθείσα καισαρική τομή που προσήλθε στο Μαιευτήριο ενώ ήταν σε
τοκετό και διαστολή 6 εκατοστών.

Φύλο νεογνού: 22 άρρενα (αναλογία 44%) και 28 θήλεα
(αναλογία 56%).

Το 100% των γυναικών είναι Ελληνικής καταγωγής.

Το υλικό που συγκεντρώθηκε και από τις δύο ομάδες υποβλήθηκε στην ακόλουθη διαδικασία:

Τα ιστολογικά δείγματα μονιμοποιήθηκαν σε 10% ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης για 24 ώρες. Μετά την μονιμοποίηση τα δείγματα αφυδατώθηκαν αρχικά σε 50% και ακολούθως σε 80%, 90% και 100% διαλύματα αλκοόλης και κατόπιν σε ξυλίνη. Μετά την διαδικασία της αφυδάτωσης, τα δείγματα ενσωματώθηκαν σε παραφίνη. Μετά την ενσωμάτωσή τους σε παραφίνη τεμαχίστηκαν σε μικρότερα κομμάτια των 4 μ με μικροτόμο. Κατόπιν όλα τα ιστολογικά δείγματα υποβλήθηκαν σε διαδικασία αποπαραφινιποίησης που επιτεύχθει με το πέρασμα τους μέσω διαλυμάτων ξυλίνης, αλκοόλης και κατόπιν με το πλύσιμό τους με αποσταγμένο νερό.

Ακολούθως, η δυνατότητα δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης εξουδετερώθηκε εμβαπτίζοντας τα ιστολογικά δείγματα σε διάλυμα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) για 30 λεπτά της ώρας. Μετά από πλύσιμο με αποσταγμένο νερό , τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα τρις-ρυθμιστικό διάλυμα αλατούχου διαλύματος με pH : 7,6.

Κατόπιν τα δείγματα επώασθηκαν σε 10% φυσιολογικό ορό κουνελιού σε τρις-ρυθμιστικό διάλυμα για 30 λεπτά προκειμένου να ανασταλεί ο μη ειδικός δεσμός των υπό μελέτη αντισωμάτων με τους ιστούς. Στη συνέχεια τμήματα από τα δημιουργηθέντα συμπλέγματα, επώασθηκαν με πρωτογενή πολυκλωνικά αντισώματα Αιγός HSP 70 (K-20: cat # sc-1060), HSP 70 (K-19: cat # sc-1059), HSP 90A (N-17: cat # sc-1055), HSP 90B (cat # sc-1057), που αποκτήθηκαν κατόπιν παραγγελίας από την εταιρία SANTA CRUZ του Καναδά , σε ένα τρις-ρυθμιστικό διάλυμα 1: 50 για 2 ώρες. Αμέσως μετά ακολούθησε ξέπλυμα των ιστολογικών δειγμάτων για 5 έως 6 λεπτά με τρις-ρυθμιστικό διάλυμα. Η διαδικασία συνεχίστηκε επώάζοντας τα δείγματα με ορό κουνελιού που περιείχε αντίσωμα συνεζευγμένο με αντί – αιγός υπεροξειδάση, για χρονικό διάστημα μιας ώρας.

Μετά από πλύσιμο των δειγμάτων για 5 έως 6 λεπτά, ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων με διάλυμα αποτελούμενο από DAB και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια όλα τα δείγματα ξεπλύθηκαν με τρις-ρυθμιστικό διάλυμα και αποσταγμένο νερό,

χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη, αφυδατώθηκαν και τελικά καλύφθηκαν με υάλινη πλάκα συγκράτησης.

Ο βαθμός χρωματισμού των δειγμάτων κατηγοριοποιήθηκε ως ακολούθως:

Αρνητικός (-) όταν δεν ανιχνεύονται καθόλου χρωματισμένα κύτταρα.

Ασθενώς θετικός (±) όταν λιγότερο από 25% των υπό μελέτη κυττάρων χρωματίζονται ασθενώς.

Ελαφρώς θετικός (+) όταν όλα τα υπό μελέτη κύτταρα εμφανίζονται ελαφρώς χρωματισμένα.

Μετρίως θετικός (++) όταν στα υπό μελέτη ιστολογικά δείγματα όλα τα κύτταρα εμφανίζουν μέτριο χρωματισμό και τέλος

Εντόνως θετικός (+++) όταν σε όλα τα υπό μελέτη κύτταρα ο χρωματισμός είναι ιδιαιτέρως έντονος.

Ο τύπος χρωματισμού στις θετικές περιπτώσεις είναι κυρίως διάχυτος κυτταροπλασματικός χρωματισμός και σε μικρότερο βαθμό αφορά διάχυτο χρωματισμό του πυρήνα των κυττάρων.

Στις θετικές περιπτώσεις που αφορούν την HSP 70 cognate πρωτεΐνη, ο χρωματισμός είναι χαρακτηριστικά εμφανής στην ελεύθερη επιφάνεια των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η συγκέντρωση της HSP 90B στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις περιπτώσεις των παλίνδρομων κυήσεων ανιχνεύθηκε ελαφρώς θετική (+) σε 4 περιπτώσεις, ασθενώς θετική (±) σε 33 περιπτώσεις και αρνητική (-) σε 13 περιπτώσεις.

Στην κατηγορία των τελειόμηνων κυήσεων και στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης του πλακούντα, δεν ανιχνεύθηκε καθόλου συγκέντρωση HSP 90B και στις 50 περιπτώσεις. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο κατηγοριών, χρησιμοποιώντας την στατιστική μέθοδο του Mantel-Haenszel test διαπιστώνουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο κατηγορίες ($p < 0,001$).

Η συγκέντρωση της HSP 90B πρωτεΐνης στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης στα ιστολογικά δείγματα των παλίνδρομων

κυήσεων ανιχνεύεται εντόνως θετική (+++) σε 14 περιπτώσεις, μετρίως θετική (++) σε 27 περιπτώσεις και ελαφρώς θετική (+) στα υπόλοιπα 9 δείγματα. (Εικόνα 12).

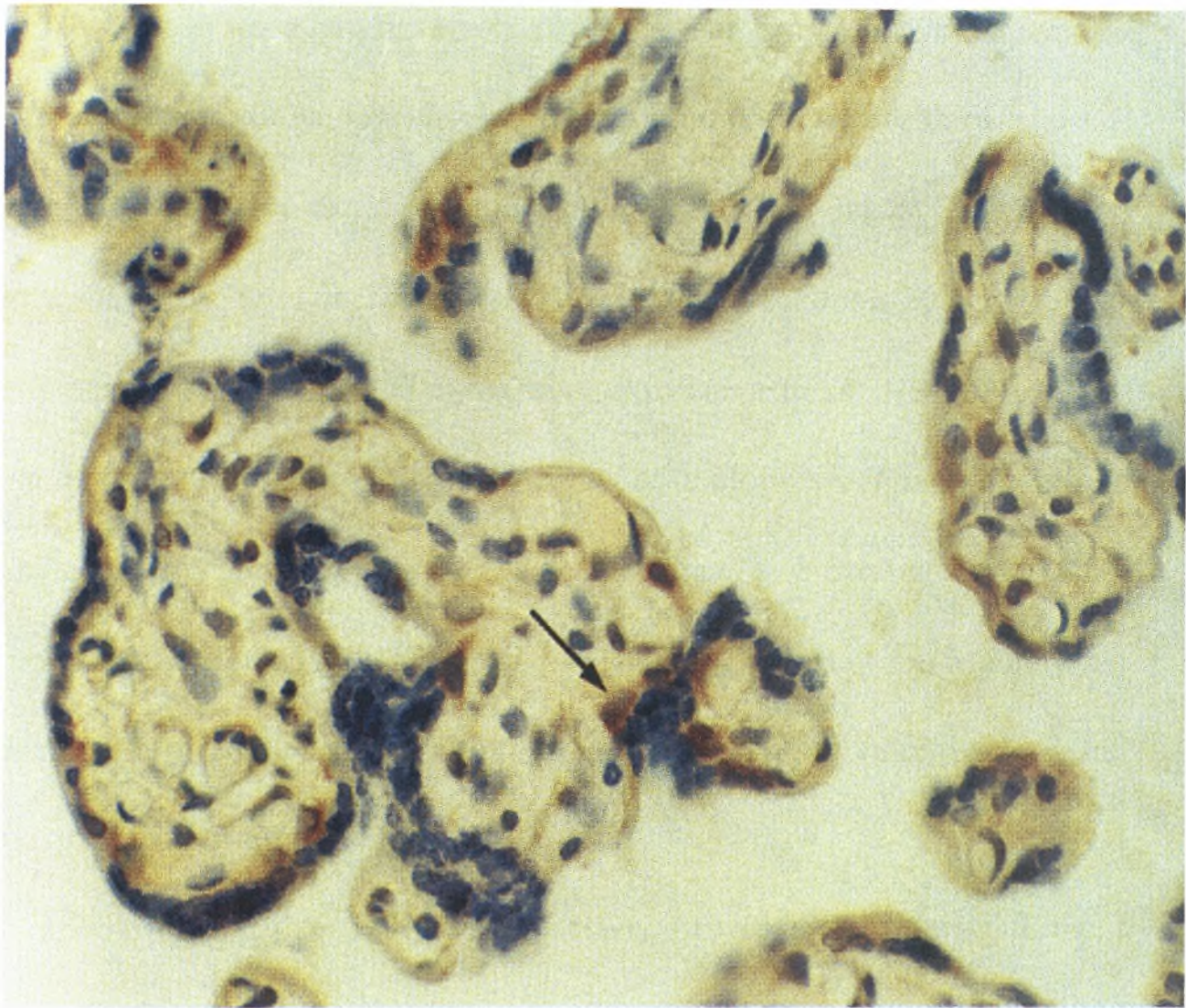


Εικόνα 12.

Χρωματισμός της HSP 90B σε κύτταρα χοριακής λάχνης, σε υλικό αυτόματης αποβολής πρώτου τριμήνου. Παρατηρήστε τον εντόνως θετικό βαθμό

χρωματισμού (μακρύ βέλος) των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης, τον ασθενώς θετικό βαθμό χρωματισμού (κοντό βέλος) των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης και τον μετρίως θετικό βαθμό χρωματισμού (κεφαλή βέλους) των κυττάρων του στρώματος.(X 450).

Στην κατηγορία του πλακούντα των τελειόμηνων κυήσεων, η συγκέντρωση της HSP 90B στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης, ανιχνεύεται μετρίως θετική (++) σε 6 περιπτώσεις, ασθενώς θετική (+) σε 14 δείγματα, ελαφρώς θετική (±) σε 26 και αρνητική (-) στις υπόλοιπες 4 περιπτώσεις. (Εικόνα 13). Χρησιμοποιώντας την στατιστική μέθοδο του Mantel-Haenszel test, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υπό μελέτη κατηγοριών.



Εικόνα 13.

Χρωματισμός της HSP 90B σε κύτταρα χοριακής λάχνης, σε υλικό τελειόμηνου πλακούντα. Παρατηρήστε τον μετρίως θετικό βαθμό χρωματισμού (μακρύ βέλος) των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης, και την έλλειψη χρωματισμού των υπόλοιπων κυτταρικών στοιχείων. (X 450).

Περνώντας τώρα στη μελέτη της συγκέντρωσης της HSP 90B πρωτεΐνης στα αγγεία των παλίνδρομων κυήσεων βλέπουμε ότι μετρίως θετική (++) συγκέντρωση ανευρίσκεται σε δύο δείγματα, ελαφρώς θετική (+) σε 6, ασθενώς θετική (±) σε 22 περιπτώσεις ενώ στις υπόλοιπες 20 δεν ανιχνεύεται καθόλου (-). Τα ανάλογα αποτελέσματα της HSP 90B πρωτεΐνης στα αγγεία του πλακούντα των τελειόμηνων κυήσεων είναι: Ασθενώς θετική συγκέντρωση (±) σε 2 δείγματα ενώ στα υπόλοιπα 48 δεν ανιχνεύεται καθόλου (-). Μέσω της στατιστικής μεθόδου του Mantel-Haenszel test η διαφορά που προκύπτει ανάμεσα στις δύο κατηγορίες είναι στατιστικώς σημαντική ($p < 0,001$).

Τέλος, η μελέτη της HSP 90B πρωτεΐνης στα κύτταρα του στρώματος των παλίνδρομων κυήσεων δείχνει μετρίως θετική συγκέντρωση (++) σε 2 περιπτώσεις, ελαφρώς θετική (+) σε 6, ασθενώς θετική (±) σε 17 και αρνητική (-) στις υπόλοιπες 25 των περιπτώσεων.
(Εικόνα 12).

Για τα κύτταρα του πλακουντιακού στρώματος, των τελειομήνων κυήσεων τα αποτελέσματα είναι: Ασθενώς θετική (±) σε 2 δείγματα και αρνητική

(-) στα υπόλοιπα 48. (Εικόνα 13). Η στατιστική μέθοδος του Mantel-Haenszel test αναδεικνύει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p < 0,001$).

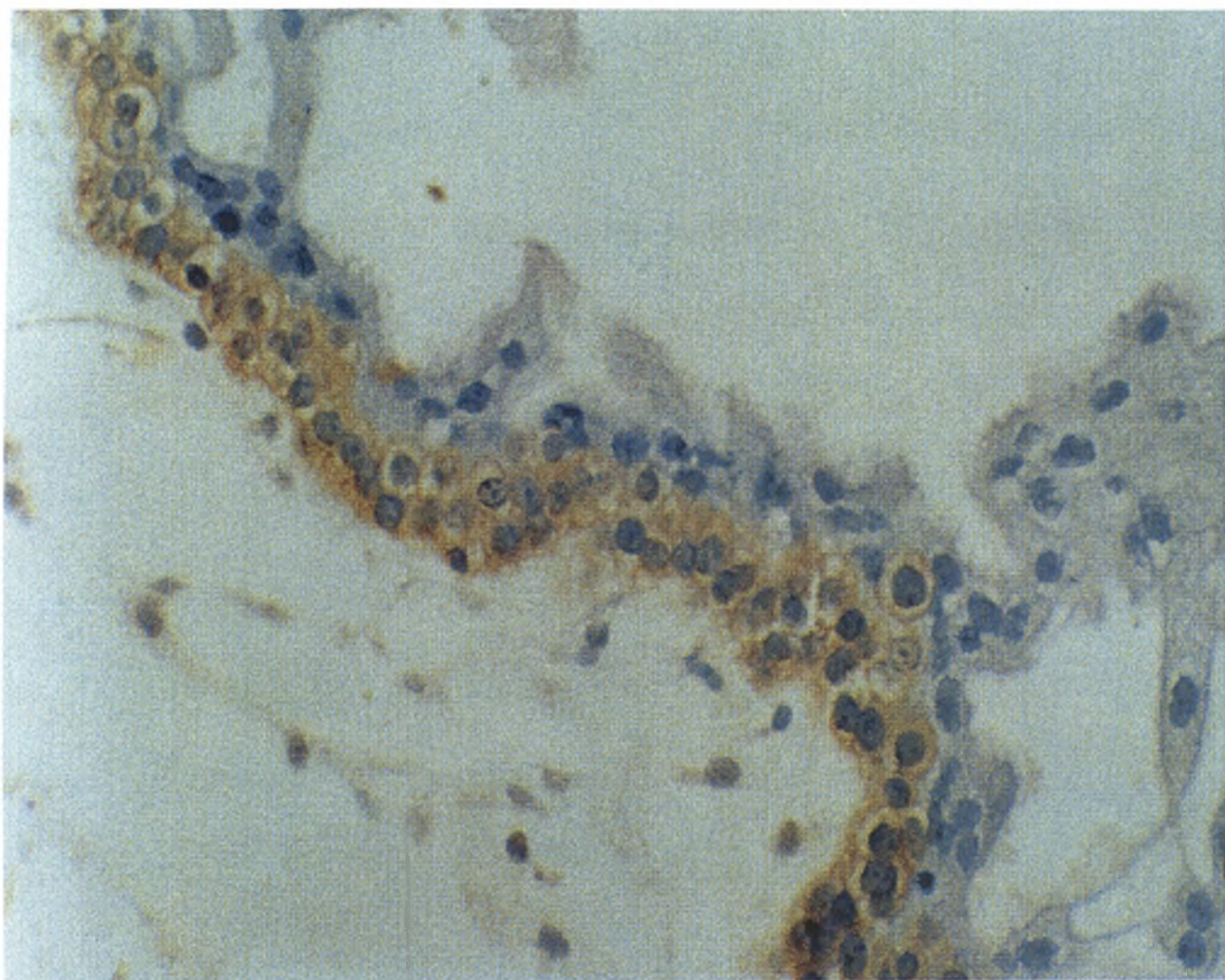
Όλα τα αποτελέσματα που αφορούν την συγκέντρωση της HSP 90B παρατίθενται στον πίνακα 2 που ακολουθεί.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

HSP 90B	Παλίνδρομες κηύσεις	Ωριμοι πλακούντες
Συνγκυτιοτροφοβλάστη		
+++	0	0
++	0	0
+	4	0
±	33	0
-	13	50
Κυτταροτροφοβλάστη		
+++	14	0
++	27	6
+	9	14
±	0	26
-	0	4
Αγγεία		
+++	0	0
++	2	0
+	6	0
±	22	2
-	20	48
Στρώμα		
+++	0	0
++	2	0
+	6	0
±	17	2
-	25	48

Περνώντας, τώρα στη μελέτη της HSP 90 A, βλέπουμε ότι δεν ανιχνεύεται καθόλου στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης στις παλίνδρομες κυήσεις αλλά και στους πλακούντες στις τελειόμηνες κυήσεις. (Εικόνες 14 και 15). (Από 50 περιπτώσεις σε κάθε ομάδα).

Στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης στις παλίνδρομες κυήσεις η έκφραση της HSP 90 A είναι ελαφρώς θετική (+) σε 11 περιπτώσεις, ασθενώς θετική (±) σε 21 δείγματα και αρνητική (-) στα υπόλοιπα 18. (Εικόνα 14).

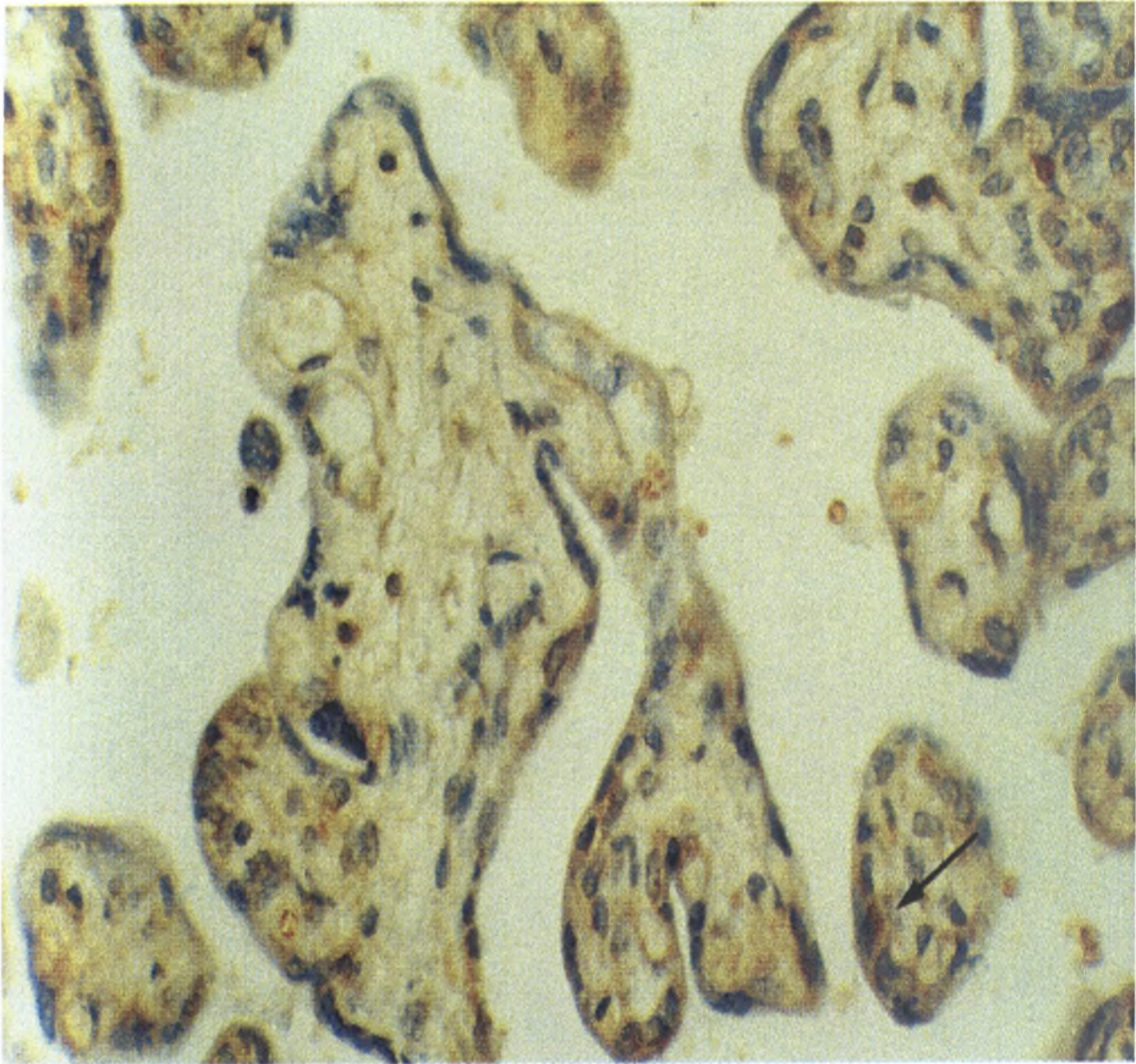


Εικόνα 14.

Χρωματισμός της HSP 90B σε κύτταρα χοριακής λάχνης, σε υλικό αυτόματης αποβολής πρώτου τριμήνου. Παρόμοιες τομές της χοριακής λάχνης που απεικονίζεται στην Εικόνα 11. Παρατηρήστε τον ελαφρώς θετικό βαθμό χρωματισμού των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης και την έλλειψη χρωματισμού των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης και των κυττάρων του στρώματος. (X 450).

Ο χρωματισμός της HSP 90 A στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης των πλακούντων είναι ελαφρώς θετικός (+) σε 4 περιπτώσεις, ασθενώς θετικός (±) σε 8 ιστολογικά δείγματα και αρνητικός (-) στα υπόλοιπα 38. (Εικόνα 15). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα για τις δύο υπό μελέτη ομάδες κυττάρων με το Mantel-Haenszel test, βλέπουμε ότι η διαφορά που προκύπτει είναι στατιστικώς σημαντική ($p < 0,001$).

Όσον αφορά την έκφραση της HSP 90 A στα κύτταρα των αγγείων και του στρώματος και στην ομάδα ιστολογικού υλικού των παλίνδρομων κυήσεων, βλέπουμε ότι δεν υπάρχει καθόλου χρωματισμός άρα και συγκέντρωση (-) HSP 90 A σε καμία από αυτές τις ομάδες κυττάρων. (Εικόνα 14). Ο ανάλογος χρωματισμός για τα κύτταρα αγγείων και στρώματος των πλακουντιακών κυττάρων των τελειομήνων κυήσεων είναι ασθενώς θετικός (±) σε 4 περιπτώσεις και αρνητικός (-) στις υπόλοιπες 46. (Εικόνα 15). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Fisher's exact test διαπιστώνουμε ότι η διαφορά της συγκέντρωσης HSP 90 A στις δύο υπό μελέτη ομάδες δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p < 0,059$).



Εικόνα 15.

Χρωματισμός της HSP 90A σε κύτταρα χοριακής λάχνης, σε υλικό τελειόμηνου πλακούντα. Παρατηρήστε τον ασθενώς θετικό βαθμό χρωματισμού (μακρύ βέλος) των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης και την έλλειψη χρωματισμού των υπολοίπων κυτταρικών στοιχείων. (X 450).

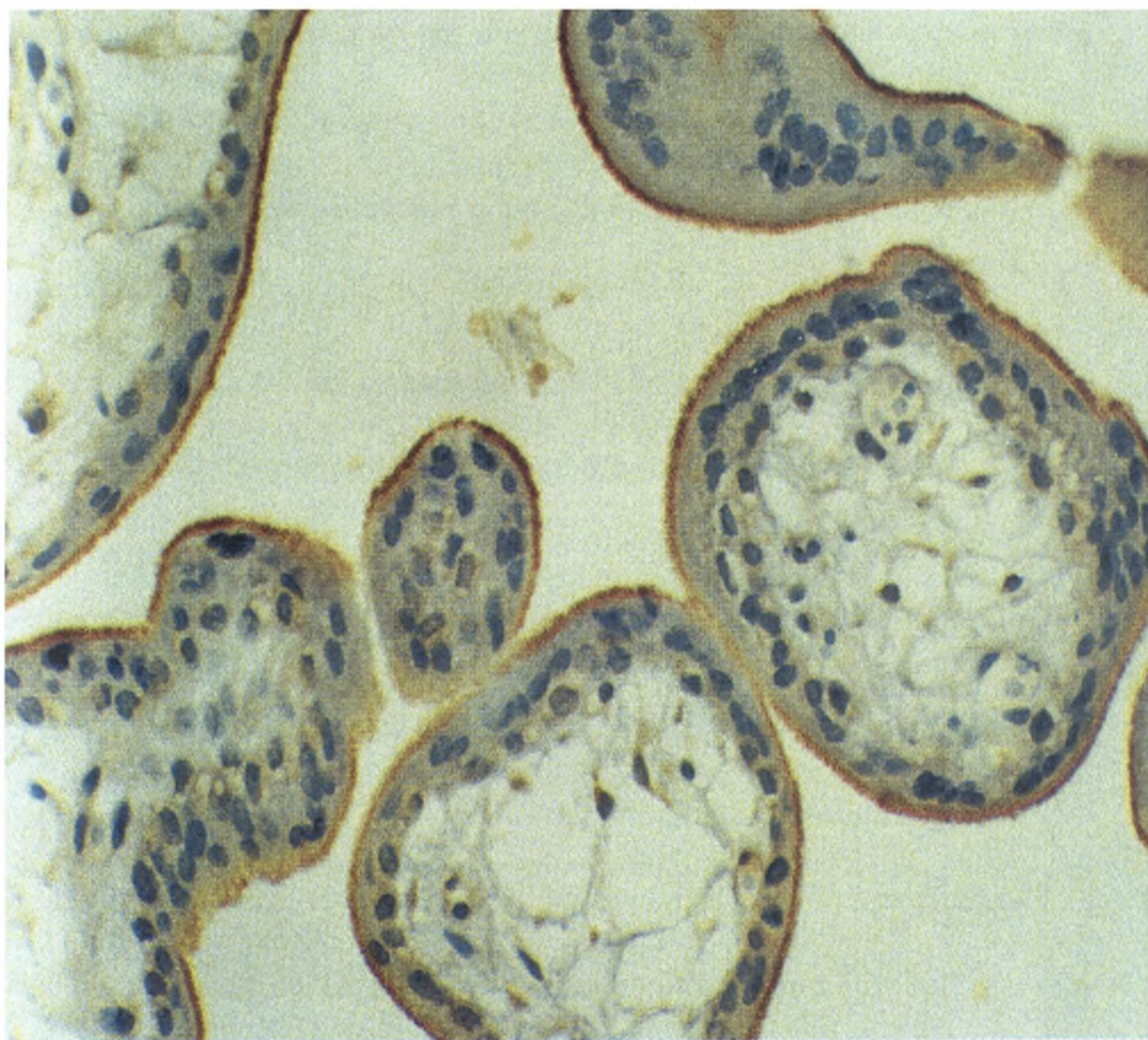
Όλα τα αποτελέσματα για την HSP 90 A παρατίθενται στον πίνακα 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

HSP 90A	Παλίνδρομες κήσεις	Ωριμοί πλακούντες
Συγκυτιοτροφοβλάστη		
+++	0	0
++	0	0
+	0	0
±	0	0
-	50	50
Κυτταροτροφοβλάστη		
+++	0	0
++	0	0
+	11	4
±	21	8
-	18	38
Αγγεία		
+++	0	0
++	0	0
+	0	0
±	4	0
-	46	50
Στρώμα		
+++	0	0
++	0	0
+	0	0
±	4	0
-	46	50

Συνεχίζοντας την καταγραφή των αποτελεσμάτων της μελέτης μας, περνάμε στην ομάδα των HSP 70, με πρώτο αντικείμενο μελέτης την HSP 70K19 cognate. Τα αποτελέσματα χρωματισμού αυτής της ομάδας πρωτεϊνών έχουν ως εξής:

Στην ομάδα των παλίνδρομων κήσεων, ο χρωματισμός άρα και κατ'αναλογία η έκφραση της HSP 70K19 cognate στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, είναι εντόνως θετικός (+++) μόνο στην επιφάνεια των κυττάρων και στις 50 περιπτώσεις. (Εικόνα 16).



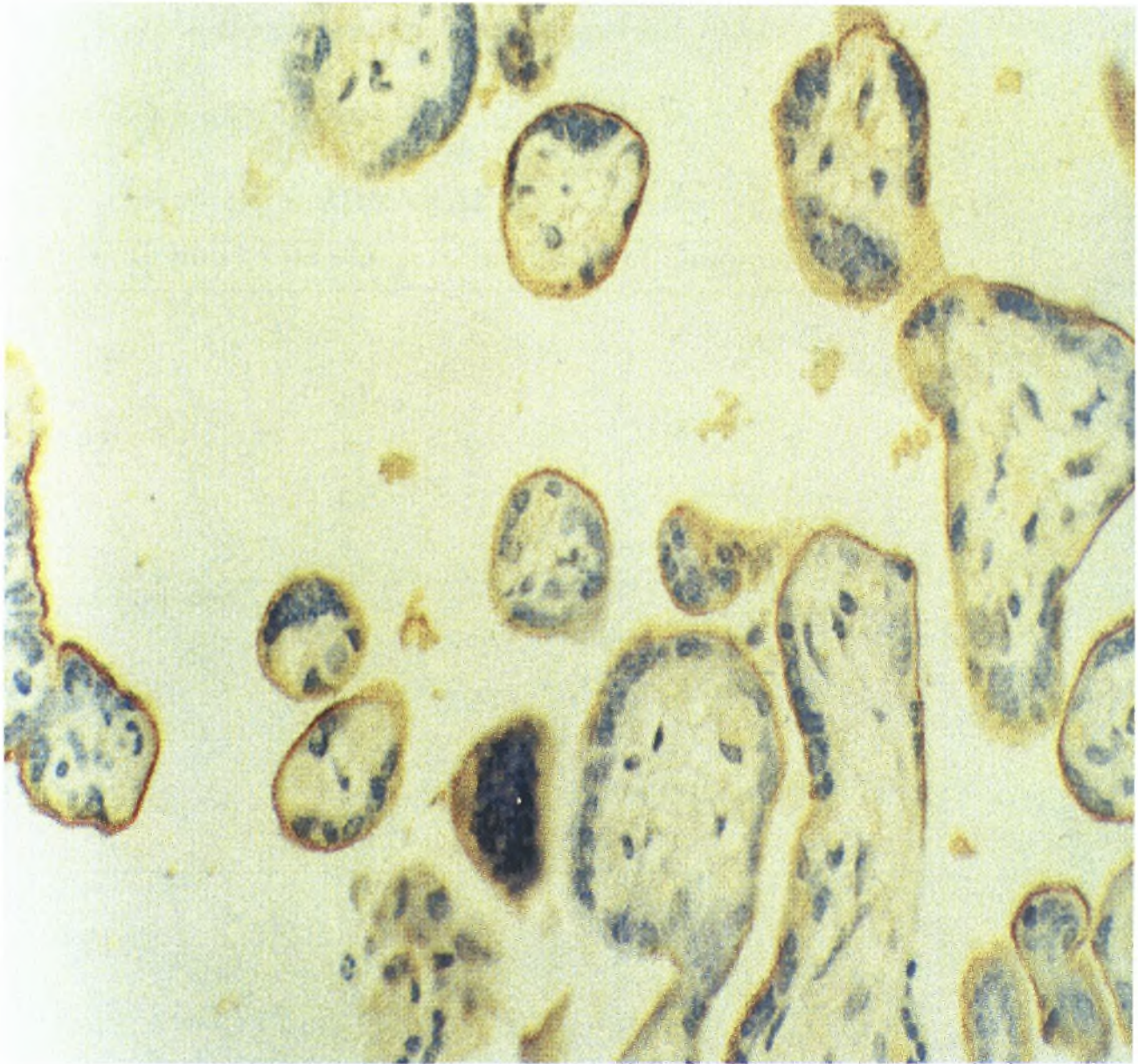
Εικόνα 16.

Χρωματισμός της HSP 70K19 cognate σε κύτταρα χοριακής λάχνης, σε υλικό αυτόματης αποβολής πρώτου τριμήνου. Παρατηρήστε τον εντόνως θετικό βαθμό χρωματισμού της επιφάνειας των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης μόνο. Όλα τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία δείχνουν παντελή έλλειψη χρωματισμού. (X 450).

Όσον αφορά τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης των λαχνών στους ώριμους πλακούντες, ο χρωματισμός είναι ελαφρώς θετικός (+) σε 15 περιπτώσεις, ασθενώς θετικός (\pm) σε 25 δείγματα και αρνητικός (-) στα υπόλοιπα δέκα. (Εικόνα 17).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τη μέθοδο του Mantel-Haenszel test διαπιστώνουμε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συγκρινόμενων κατηγοριών.

Η μελέτη της HSP 70K19 cognate στα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης, των αγγείων και του στρώματος στην ομάδα των παλίνδρομων κυήσεων (50 περιπτώσεις) αλλά και στην ομάδα των τελειόμηνων πλακούντων (άλλες 50 περιπτώσεις) απέβη αρνητική (-) (Εικόνες 16 και 17). Ως εκ τούτου δεν προκύπτει καμία διαφορά στις δύο υπό μελέτη ομάδες.



Εικόνα 17.

Χρωματισμός της HSP 70K19 cognate σε κύτταρα χοριακής λάχνης, σε υλικό τελειόμηνου πλακούντα. Παρατηρήστε τον ελαφρώς θετικό βαθμό χρωματισμού (μακρύ βέλος) των κυττάρων της επιφάνειας της συγκυτιοτροφολάστης μόνο και την παντελή έλλειψη χρωματισμού των υπολοίπων κυτταρικών στοιχείων. (X 450).

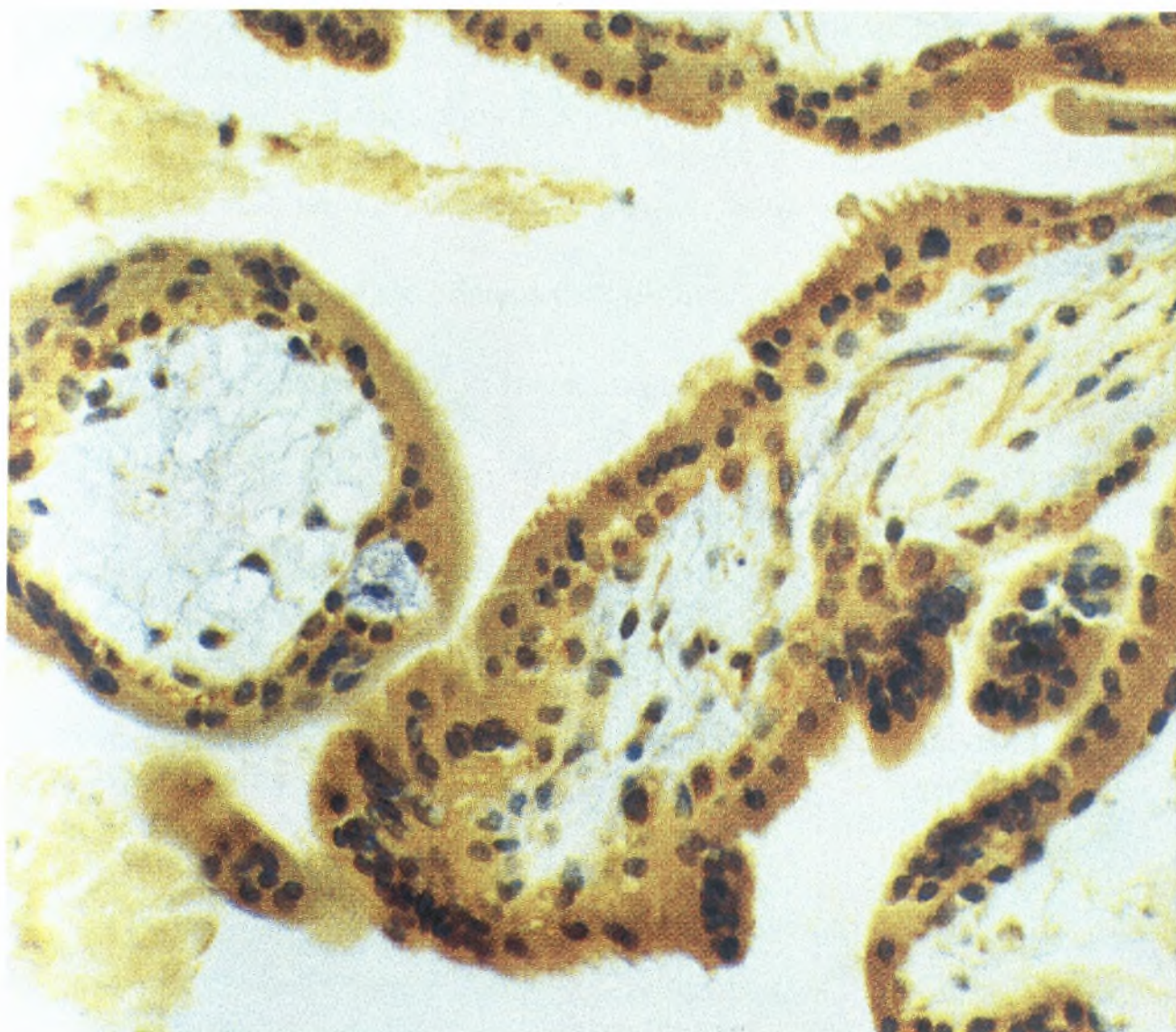
Τα αποτελέσματα της μελέτης μας για την HSP 70K19 cognate παρατίθενται στον Πίνακα 4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

HSP 90 K19 cognate	Παλίνδρομες κήσεις	Ωριμοί πλακούντες
Συγκυτιοτροφοβλάστη		
+++	0	0
++	0	0
+	50	15
±	0	25
-	0	10
Κυτταροτροφοβλάστη		
+++	0	0
++	0	0
+	0	0
±	0	0
-	50	50
Αγγεία		
+++	0	0
++	0	0
+	0	0
±	0	0
-	50	50
Στρώμα		
+++	0	0
++	0	0
+	0	0
±	0	0
-	50	50

Τελειώνουμε την καταγραφή των αποτελεσμάτων της μελέτης μας με την ομάδα HSP 70K20 inducible. Ο χρωματισμός άρα και η έκφραση της HSP 70K20 στα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα στις παλίνδρομες κυήσεις ανιχνεύεται εντόνως θετικός (+++) σε 8 περιπτώσεις, μετρίως θετικός (++) σε 6, ελαφρώς θετικός (+) σε 9 ιστολογικά δείγματα, ασθενώς θετικός (±) σε 13 δείγματα και αρνητικός (-) στα υπόλοιπα 14. (Εικόνα 18).

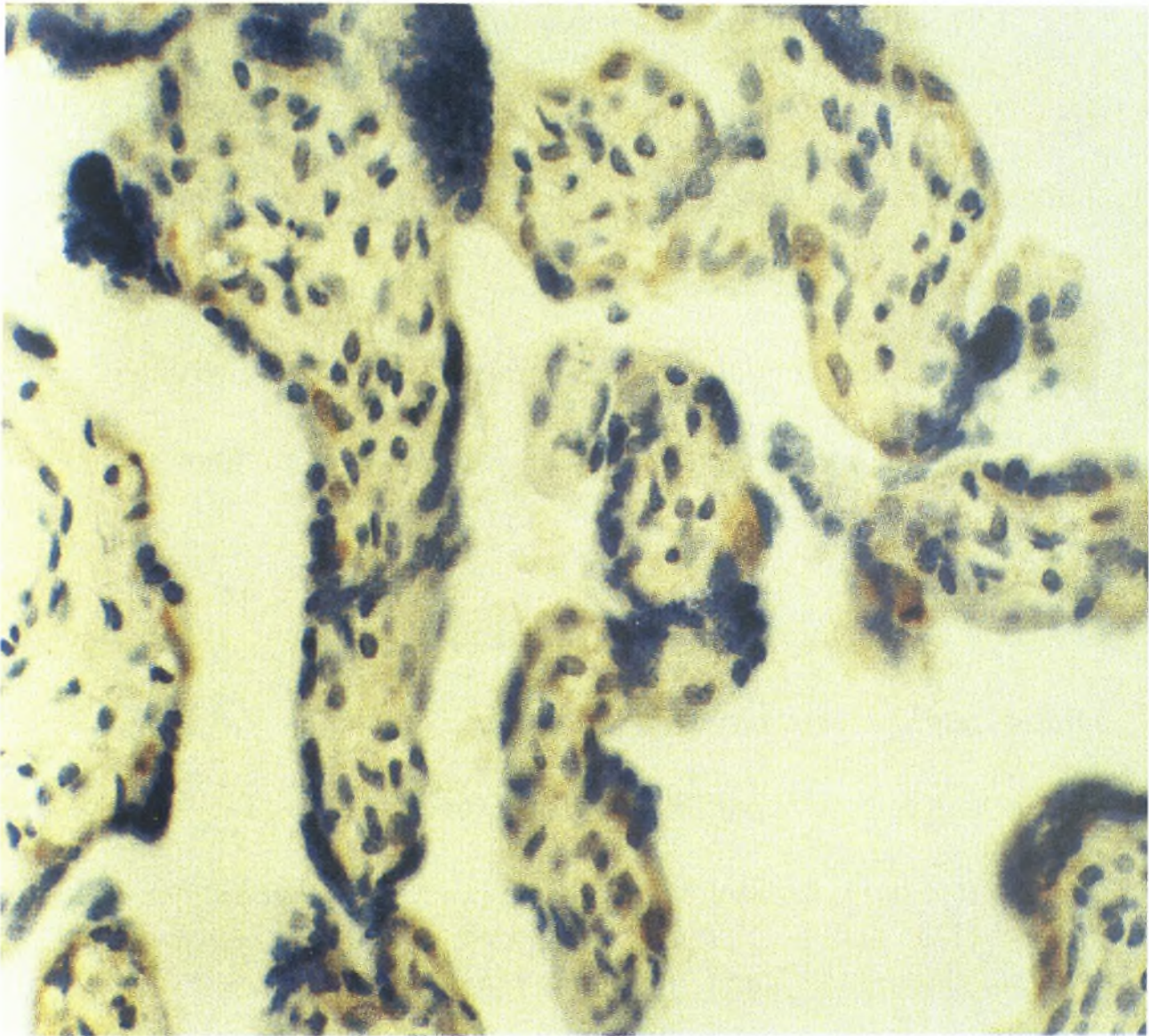
Ο αντίστοιχος χρωματισμός των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης στις ώριμες πλακουντιακές λάχνες έδωσε τα κάτωθι αποτελέσματα: Ελαφρώς θετικός (+) σε 4 ιστολογικά δείγματα, ασθενώς θετικός (±) σε 36 και αρνητικός (-) στα υπόλοιπα 10. Με τη μέθοδο του Mantel-Haenszel test η διαφορά που προκύπτει για τις δύο κατηγορίες είναι στατιστικώς σημαντική ($p < 0,001$).



Εικόνα 18.

Χρωματισμός της HSP 70 K20 inducible σε κύτταρα χοριακής λάχνης, σε υλικό αυτόματης αποβολής πρώτου τριμήνου. Παρατηρήστε τον εντόνως θετικό βαθμό χρωματισμού των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης καθώς και της κυτταροτροφοβλάστης. Τα κύτταρα του στρώματος δίνουν μετρίως θετικό βαθμό χρωματισμού. (X 450).

Η έκφραση της HSP 70 K20 στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα των δειγμάτων των παλίνδρομων κυήσεων ανιχνεύεται εντόνως θετική (+++) σε 14 περιπτώσεις, μετρίως θετική (++) σε 25, ελαφρώς θετική (+) σε 9 και ασθενώς θετική (±) σε 2 δείγματα. (Εικόνα 18). Στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα των πλακούντων, η έκφραση της HSP 70 K20 είναι ελαφρώς θετική σε 4 ιστολογικά δείγματα, ασθενώς θετική (±) σε 37 δείγματα και αρνητική (-) στα 9 εναπομείναντα. (Εικόνα 19). Η στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων με το Mantel-Haenszel test δείχνει ότι η διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες είναι στατιστικώς σημαντική. ($p < 0,001$).



Εικόνα 19.

Χρωματισμός της HSP 70 K20 inducible σε κύτταρα χοριακής λάχνης, τελειόμηνου πλακούντα. Παρατηρήστε τον ασθενώς θετικό βαθμό χρωματισμού των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης. Τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία δεν χρωματίζονται..

Στα δείγματα των παλίνδρομων κυήσεων, ο χρωματισμός της HSP 70K20 στα αγγεία, είναι εντόνως θετικός (+++) σε 12 περιστατικά, μετρίως θετικός (++) σε 7, ελαφρώς θετικός (+) σε 11, ασθενώς θετικός (±) σε 14 δείγματα και αρνητικός (-) σε 6. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα αγγεία στα ιστολογικά δείγματα που αφορούν τους πλακούντες στις τελειόμηνες κυήσεις, είναι ελαφρώς θετικός χρωματισμός (+) σε 2 πλακούντες, ασθενώς θετικός (±) σε 24 δείγματα και αρνητικός (-) στα υπόλοιπα 24. Η διαφορά που προκύπτει μέσω της μελέτης των αποτελεσμάτων με το Mantel-Haenszel test είναι στατιστικώς σημαντική. ($p < 0,001$). Τέλος η έκφραση της HSP 70K20 στο στρώμα των κυττάρων των παλίνδρομων κυήσεων έχει ως εξής: είναι εντόνως θετικός (+++) σε 18 περιπτώσεις, μετρίως θετικός (++) σε 2, ελαφρώς θετικός (+) σε 10 περιπτώσεις, ασθενώς θετικός (±) σε 14 δείγματα και αρνητικός (-) σε 6. (Εικόνα 18). Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα κύτταρα του στρώματος στα ιστολογικά δείγματα των πλακούντων, είναι ασθενώς θετικός (±) σε 24 δείγματα και αρνητικός (-) στα υπόλοιπα 26. (

Εικόνα 19). Η διαφορά που προκύπτει ανάμεσα στις δύο υπό μελέτη κατηγορίες μέσω του Mantel-Haenszel test είναι στατιστικώς σημαντική. ($p < 0,001$).

Όλα τα αποτελέσματα της ομάδας της HSP 70 K20 παρατίθενται στον πίνακα 4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

HSP 90 K20 inducible	Παλίνδρομες κήσεις	Ώριμοι πλακούντες
Συγκυτιοτροφοβλάστη		
+++	8	0
++	6	0
+	9	4
±	13	36
-	14	10
Κυτταροτροφοβλάστη		
+++	14	0
++	25	0
+	9	4
±	2	37
-	0	9
Αγγεία		
+++	12	0
++	7	0
+	11	2
±	14	24
-	6	24
Στρώμα		
+++	18	0
++	2	0
+	10	0
±	14	24
-	6	26

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η έκφραση των πρωτεϊνών του θερμικού shock HSP αποτελεί μια μοναδική κυτταρική απάντηση στις συνθήκες του stress. Η παλίνδρομη κύηση αποτελεί μια κατάσταση οξέος stress για τα προϊόντα της κύησης ενώ ο τοκετός αποδεδειγμένα προκαλεί οξύ stress καθώς αποτελεί την πλέον επείγουσα κατάσταση ελέγχου επάρκειας της εμβρυοπλακουντιακής ομάδας. Επιδίωξη της μελέτης μας είναι να διερευνήσει τον ρόλο των πρωτεϊνών του θερμικού shock HSP στις παραπάνω αναφερθείσες καταστάσεις οξέος stress και να συγκρίνει την έκφραση των. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ξεκάθαρα αποδεικνύουν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά της ποσοτικής αλλά και ποιοτικής έκφρασης των HSP 70 και HSP 90, μεταξύ των χοριακών λαχνών των

παλίνδρομων κυήσεων και των λαχνών που μελετήθηκαν από πλακούντες τελειομήνων κυήσεων.

Για την διαφορά της ποιοτικής έκφρασης, πρέπει ιδιαιτέρως να σημειωθεί ότι η έκφραση της HSP 90 B και των δύο μορφών HSP 70 cognate και inducible είναι ιδιαιτέρως έντονη στην ελεύθερη επιφάνεια των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης του υλικού που απομονώθηκε από αυτόματες αποβολές και ότι αυτό και μόνο το γεγονός μπορεί να σημαίνει έναν μοναδικό και ιδιαιτέρως σημαντικό ρόλο της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στη μεταφορά των απαραίτητων για τη ζωή ουσιών, από τη μητρική κυκλοφορία στην εμβρυοπλακουντιακή μονάδα. Είναι ακόμη γνωστό ότι οι πρωτεΐνες των κυτταρικών μεμβρανών έχουν πολλές λειτουργίες. Άλλες αποτελούν αντιγόνα (π.χ. ομάδα αίματος, ιστοσυμβατότητα) και οι οποίες είναι γλυκοπρωτεΐνες, άλλες αποτελούν μοριακούς υποδοχείς ορμονών, αντισωμάτων κ.λ.π. και άλλες πάλι σχετίζονται με τη μεταφορά ουσιών.

Απ' όλα τα θρεπτικά συστατικά που φθάνουν στην πλακουντιακή μεμβράνη (οξυγόνο, νερό, υδατάνθρακες, αμινοξέα, λιπίδια, ηλεκτρολύτες κ.λ.π.)

είναι γνωστό ότι η γλυκόζη μεταφέρεται πάρα πολύ γρήγορα μέσω διευκολυνόμενης διάχυσης (facilitated transport) και ενεργητικής μεταφοράς (uphill transport). Η μεταφορά της γλυκόζης απαιτεί όχι μόνο την διαφορά συγκεντρώσεως μεταξύ των χώρων που διαχωρίζονται από τη μεμβράνη, αλλά και την ύπαρξη ενός φορέα διότι είναι γνωστό ότι η γλυκόζη δεν μπορεί να διέλθει ούτε μέσω λιποειδικών διπλοστιβάδων αλλά ούτε και μέσω των πόρων. Βασιζόμενη στα αποτελέσματα της μελέτης μας θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η οι HSP παρεμβάλλονται στις παραπάνω κυτταρικές λειτουργίες με αποτέλεσμα είτε την ελαττωμένη παροχή θρεπτικών ουσιών στο αναπτυσσόμενο έμβρυο, είτε την ανώμαλη σύνδεσή τους με προϊόντα της μητρικής κυκλοφορίας (ορμόνες, αντισώματα) και τελικά την αποβολή των προϊόντων της σύλληψης. Είναι γνωστό εξάλλου, από προηγούμενες έρευνες ότι διάφορες πρωτεΐνες-σφαιρίνες που κυκλοφορούν στον ορό της μητέρας μεταλλάσσουν τη δομή τους κατά τη διάρκεια μιας εγκυμοσύνης με στόχο τη σύνδεσή τους με συγκεκριμένες γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης της συγκυτιοτροφοβλάστης και τελικό αποτέλεσμα τη δίοδό τους στην εμβρυϊκή κυκλοφορία.(77).

Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ανθρώπιος τρανσκορτίνη που κατά τη διάρκεια της κύησης μεταβάλλει το γλυκοπρωτεϊνικό τμήμα της ούτως ώστε να μπορεί να δεσμευτεί από τη μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης.

(78). Η αυξημένη έκφραση των HSP στην επιφάνεια της συγκυτιοτροφοβλάστης θα μπορούσε να σημαίνει μια παρεμβολή αυτών των πρωτεϊνών στη διαδικασία μεταφοράς διαφόρων σφαιρινών από τη μητρική κυκλοφορία στο επίπεδο της μεμβράνης της συγκυτιοτροφοβλάστης και η οποία έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή στη διαδικασία φυσιολογικής εμφύτευσης του κνήματος.

Η ιδιαιτέρως σημαντική έκφραση των HSP 90 B και HSP 70 cognate στη επιφάνεια των κυττάρων γεννά αμέσως το ερώτημα του τι εξυπηρετεί μια τέτοια σημαντική έκφραση στην συγκεκριμένη περιοχή του κυττάρου. Η στενή σχέση που υπάρχει μεταξύ της αυξημένης συγκέντρωσης των HSP και της έκκρισης των στεροειδών υπό συνθήκες stress, ως επακόλουθο οδηγεί τη σκέψη μας στην αναζήτηση κάποιας σχέσης μεταξύ των υποδοχέων των στεροειδών και της έκφρασης των HSP 90 B και HSP 70 cognate στη συγκυτιοτροφοβλάστη. Υπάρχουν άραγε περισσότεροι

στεροειδικοί υποδοχείς στη συγκυτιοτροφοβλάστη και αν ναι, σε τι εξυπηρετεί αυτή η αύξηση του αριθμού τους στην επιφάνεια του κυττάρου.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν έρευνες και αναφορές που αποδεικνύουν ότι η μετατροπή των ενεργών και μη γλυκοκορτικοειδών-κορτιζόλης και κορτιζόνης- στα κύτταρα της πλακουντιακής μονάδος είναι ιδιαίτερος σημαντική στην προώθηση της διεισδυτικής ικανότητας της τροφοβλάστης. Αναφέρεται ότι έκφραση των δύο ισομορφών της 11-βήτα-υδροξυστεροειδικής δεϋδρογενάσης που καταλύει την μετατροπή των πρώιμων μορφών των γλυκοκορτικοειδών σε ενεργείς μορφές είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα κύτταρα του μητρικού φθαρτού. (79). Αυτή η παρατήρηση σε συνδυασμό με τα δικά μας αποτελέσματα θα μπορούσε να σημαίνει ένα ιδιαίτερος σημαντικό ρόλο των HSP στην αλυσίδα των αντιδράσεων που συμβαίνουν κατά την μετατροπή και έκφραση των γλυκοκορτικοειδών στους υποδοχείς των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης. Η έκφραση αυτή είναι ιδιαίτερος σημαντική στην διείσδυση της τροφοβλάστης.

Σε προηγούμενες ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχει ανεβρεθεί ότι οι υποδοχείς των οιστρογόνων εκφράζονται στον πυρήνα των κυττάρων της συγκυτιοτροφοβλάστης. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση ότι η λειτουργία της συγκυτιοτροφοβλάστης είναι οιστρογονικά εξαρτώμενη. (80). Έχει ακόμη αποδειχθεί ότι κατά τη διάρκεια της κύησης η παραγωγή της οιστραδιόλης αυξάνεται τουλάχιστον κατά 8 φορές έως το τέλος της εγκυμοσύνης και ότι ο πλακούντας δεσμεύει εκλεκτικά αυτά τα οιστρογόνα. Σε προηγούμενες ανοσοϊστοχημικές μελέτες υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι ο βήτα υποδοχέας των οιστρογόνων βρίσκεται σε αφθονία στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, της εξω-χοριακής τροφοβλάστης, των επιθηλιακών κυττάρων του αμνιακού υγρού και των ινοβλαστών. Σε αυτή την έρευνα συγκρίνεται η έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα βήτα σε σύγκριση με τον άλφα οιστρογονικό υποδοχέα και παρατίθενται στοιχεία που αποδεικνύουν την συσχέτιση του βήτα οιστρογονικού υποδοχέα με την δημιουργία πιο διαφοροποιημένων μορφών του πλακούντα και κατ'επέκταση με την σωστή λειτουργία και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης. (81). Τα αποτελέσματα της δικής μας

μελέτης που δείχνουν μια αυξημένη έκφραση των HSP στα προϊόντα των αποβολών μπορεί να συσχετιστούν με τις ανωτέρω έρευνες και κάποιος μπορεί να υποθέσει ότι η αυτή η αυξημένη έκφραση παρεμβάλλεται στη σωστή δημιουργία και λειτουργία των ειδικών οιστρογονικών υποδοχέων και ως συνέπεια στη σωστή διείσδυση της τροφοβλάστης και της διαφοροποίησης του πλακούντα. Αυτή η υπόθεση μπορεί να υποστηριχθεί και από μια ακόμη μελέτη της τελευταίας διετίας (82), η οποία ανέδειξε ότι η διαμόρφωση του συγκυτίου χωρίς την ύπαρξη οιστραδιόλης επιβραδύνεται σημαντικά ενώ αντιθέτως η παρουσία της οιστραδιόλης οδηγεί στην επιτάχυνση της όλης διαδικασίας διαμόρφωσης της συγκυτιακής μονάδας και αυτή η διαπίστωση θα μπορούσε να δώσει μια πιθανή εξήγηση στην αυξημένη έκφραση της HSP 90B και HSP 70 inducible και να οδηγήσει σε περαιτέρω υπόθεση συσχέτισης των συγκεκριμένων μορφών HSP με αυξημένη συγκέντρωση των οιστρογονικών υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια.

Επιπροσθέτως, υπάρχουν αναφορές και έρευνες που μελετώντας την έκφραση των υποδοχέων της προγεστερόνης σε προϊόντα αυτομάτων και

τεχνητών αποβολών, έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Συγκεκριμένα, η έκφραση των προγεστερονικών υποδοχέων στα ενδιάμεσα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης είναι σημαντικά μικρότερη στην κατηγορία των αυτομάτων αποβολών. Παρόλο που δεν μπορεί να ξεκαθαριστεί αν αυτή η διαφορά οφείλεται στη διαδικασία της αποβολής ή είναι η γενεσιουργός αιτία αυτής, θα μπορούσε να συσχετιστεί με ανωμαλία της διείσδυσης της τροφοβλάστης και της εμφύτευσης του κυήματος που οδηγεί σε αυτόματη αποβολή. (83). Στην δικιά μας έρευνα η ποσοτική και ποιοτική αυξημένη έκφραση των HSP στα κύτταρα της επιφανείας της εμβρυοπλάκουντιακής μονάδας των αυτομάτων αποβολών, σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες έρευνες μπορεί να οφείλονται σε μεταβολή του αριθμού των στεροειδικών υποδοχέων στη συγκυτιοτροφοβλάστη και σε ανωμαλία της φυσιολογικής διαφοροποίησης του πλακούντα που οδηγεί σε ανωμαλίες της εμφύτευσης αυτού και τελικά στην αποβολή των προϊόντων της κύησης. Σαφώς και απαιτούνται μελλοντικές έρευνες για να ξεκαθαριστεί αν αυτή η διαφορά είναι εξ'αρχής

παρούσα και οδηγεί τελικά στην αποβολή ή αποτελεί δευτερεύων εύρημα κατά τη διαδικασία της αυτόματης αποβολής.

Στις μέρες μας, το ενδιαφέρον στις θεραπείες της υπογονιμότητας αλλά και των καθ'έξιν αποβολών εστιάζεται ολοένα και περισσότερο στα ανοσολογικά φαινόμενα που συμβαίνουν κατά την εμφύτευση. Το γονιμοποιημένο ωάριο είναι πράγματι ένα ξένο μόσχευμα, καθ'όσον φέρει γενετικό υλικό κατά το ήμισυ διαφορετικό από αυτό της μητέρας και τα αντιγόνα του θα μπορούσαν να προκαλέσουν μια ανοσολογική αντίδραση απόρριψης. Λόγω ανάπτυξης ενός πολύπλοκου μηχανισμού προστασίας του εμβρύου αυτό δεν συμβαίνει. Τα αντιγόνα στην επιφάνεια της τροφοβλάστης προκαλούν την κινητοποίηση των ειδικών κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος της μητέρας, δηλαδή των λεμφοκυττάρων Β, Τ και των μακροφάγων. Η κυτταροτοξική όμως δράση των ειδικών λεμφοκυττάρων Τ εξασκείται στα κύτταρα στόχους μόνον όταν τα αντιγόνα είναι ενωμένα με μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC-HLA). Η τροφοβλάστη δεν διαθέτει αντιγόνα του MHC με αποτέλεσμα τα αντισώματα που φέρονται με τα ειδικά λεμφοκύτταρα Τ να

βρίσκονται μπροστά σε ένα αντιγονικώς ουδέτερο φραγμό. Το ενδομήτριο κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης διηθείται από τα λεμφοκύτταρα NK (Natural Killers), η κυτταροπλασματική δράση των οποίων δεν εξαρτάται από το MHC. Η τροφοβλάστη εκκρίνει γλυκοπρωτεϊνικούς και λιποπρωτεϊνικούς παράγοντες, οι οποίοι εξουδετερώνουν τη δράση των NK κυττάρων, αδρανοποιώντας το σύμπλεγμα. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι οι HSP παρεμβάλλονται στην ανωτέρω διαδικασία ανοσοπροστασίας, είτε μεταβάλλοντας το ουδέτερο αντιγονικά περιβάλλον, είτε αποτελώντας ενδιάμεσο προϊόν στη διαδικασία αποβολής του κυήματος. Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό το ενδιαφέρον αποσαφήνισης του όλου μηχανισμού θα κορυφωθεί στο μέλλον και η πιθανότητα εξωγενούς παρέμβασης μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω θεραπείες για τη αντιμετώπιση των καθέξιν αποβολών αλλά και διευκόλυνσης εμφύτευσης των γονιμοποιημένων ωαρίων στην εξωσωματική γονιμοποίηση.

Η προστασία του εμβρύου από επιβλαβή έκθεσή του σε προϊόντα της μητρικής κυκλοφορίας αποτελεί άλλο ένα πεδίο συζήτησης. Για παράδειγμα η κατάλληλη έκθεση του εμβρύου στα γλυκοκορτικοειδή της

μητρικής κυκλοφορίας είναι απαραίτητη για τη σωστή ανάπτυξη και ωρίμανση των οργάνων του. Σύγχρονες μελέτες (84) έφεραν στο φως τον ιδιαίτερος σημαντικό ρόλο του πλακουντιακού ενζύμου της 11-βήτα υδροξυστεροειδικής δεϋδρογενάσης τύπου 2 (11beta-HSD2). Η λειτουργία αυτού του ενζύμου έγκειται στην ρύθμιση της έκθεσης του εμβρύου στις αυξημένες και δυνητικώς ιδιαίτερα επιβλαβείς συγκεντρώσεις των γλυκοκορτικοειδών της μητρικής κυκλοφορίας, μέσω μετατροπής της κορτιζόλης στην ανενεργό μορφή της κορτιζόνης. Τα κύτταρα της τροφοβλάστης του πλακούντα βάση αυτής της έρευνας φαίνεται πως διαθέτουν ένα αυτό-ρυθμιστικό σύστημα απάντησης στην αυξημένη ποσότητα των μητρικών γλυκοκορτικοειδών που καταφθάνουν στον πλακούντα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αύξησης της έκφρασης του ενζύμου της 11-βήτα υδροξυστεροειδικής δεϋδρογενάσης τύπου 2 (11beta-HSD2) από τα κύτταρα της τροφοβλάστης. Με αυτό τον τρόπο το έμβρυο προστατεύεται από τις καταστροφικές συνέπειες της έκθεσής του στις πολύ υψηλές ποσότητες κορτιζόλης που καταφθάνουν. Η αυξημένη έκφραση των HSP στην επιφάνεια της συγκυτιοτροφοβλάστης και στα προϊόντα της

αποβολής αλλά και στην επιφάνεια των τελειόμων πλακούντων θα μπορούσε να συνδέεται με την αυξημένη έκφραση των ενζύμων αλλά και των υποδοχέων των στεροειδών στο συγκεκριμένο μέρος της πλακουντιακής μονάδας.

Η διαφορά που προκύπτει για την ποσοτική έκφραση των HSP 90A, HSP 90B, HSP 70 inducible και HSP 70 cognate, αποδεικνύει ξεκάθαρα ότι όλοι οι ανωτέρω τύποι HSP εκφράζονται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό στην ομάδα των παλίνδρομων κύσεων παρά στις χοριακές λάχνες των προϊόντων μιας τελειόμηνης κύησης. Μοναδική εξαίρεση σε αυτή τη διαπίστωση αποτελεί η έκφραση της HSP 90A στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, στρώματος αλλά και αγγείων όπου και δεν προκύπτει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υπό μελέτη ομάδων. Όλες οι άλλες μελετηθείσες ομάδες της οικογένειας των HSP όπως φαίνεται και στις εικόνες της μελέτης μας εκφράζονται σε πολλαπλάσιο βαθμό στα κύτταρα μιας κύησης που παλινδρόμησε απ'ότι στις λάχνες ενός πλακούντα μιας κύησης που είχε επιτυχή κατάληξη.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ο ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος του κλάσματος κορτιζόλης προς προγεστερόνη στην ανάπτυξη του κύματος. (85). Κατά τη διάρκεια της κύησης είναι απαραίτητη η αδρανοποίηση των προσταγλανδινών που φθάνουν στο κύημα και η οποία επιτυγχάνεται μέσω του ενζύμου της 15-υδροξυπροσταγλανδινικής δεϋδρογενάσης. Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου στα κύτταρα του χορίου και του πλακούντα διεγείρεται από την προγεστερόνη και αδρανοποιείται από την κορτιζόλη. Αυτή η ρύθμιση γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης της προγεστερόνης με τους προγεστερονικούς υποδοχείς και της κορτιζόλης με γλυκοκορτικοειδικούς υποδοχείς. Εφόσον οι HSP εκφράζονται άφθονα στα προϊόντα μιας αυτόματης αποβολής θα μπορούσε κάποιος να συσχετίσει αυτή την έκφρασή τους με μια διαταραχή των υποδοχέων προγεστερόνης και κορτιζόλης που με τη σειρά της θα οδηγούσε σε διαταραχή της έκφρασης του ενζύμου της 15-υδροξυπροσταγλανδινικής δεϋδρογενάσης . Αυτό θα οδηγούσε στην ιδιαίτερος επιβλαβή αύξηση των προσταγλανδινών που όλοι γνωρίζουμε πόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν στη διαδικασία μιας αποβολής-

αυτόματης ή προκλητής (RU 486)- αλλά και στην πρόκληση τοκετού (Prostin).

Η ομάδα των HSP αποτελεί μια σχετικά νέα ομάδα πρωτεϊνών και ως εκ τούτου δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός ερευνών στη διεθνή βιβλιογραφία, που να αφορά την έκφρασή τους στα κύτταρα των χοριακών λαχνών. Η παρούσα μελέτη είναι μια από τις ελάχιστες που καταπιάνονται με το συγκεκριμένο θέμα. Θα μπορούσε κάποιος να περιμένει ότι, εξαιτίας του πολλαπλασίου μεγέθους του stress στο οποίο υφίσταται η εμβρυοπλακουντιακή μονάδα κατά τη διάρκεια ενός φυσιολογικού τοκετού ή μιας καισαρικής τομής, η έκφραση των HSP θα ήταν αναλόγως πιο έντονη στις χοριακές λάχνες που αφορούν τους πλακούντες των τελειομήνων κυήσεων. Παραδόξως κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώνεται από την μελέτη μας, η οποία δείχνει το ακριβώς αντίθετο, με την έκφραση των HSP να είναι μακράν εντονότερη στις χοριακές λάχνες των προϊόντων κυήσεων που παλινδρόμησαν για κάποιο λόγο κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου. Βασισμένοι λοιπόν σ' αυτό το ιδιαίτερος σημαντικό γεγονός της διαφορετικής έκφρασης των HSP στις μελετηθείσες ομάδες κυττάρων,

μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ο ρόλος των HSP 90A, HSP 90B και HSP 70 είναι ιδιαιτέρως σημαντικός στη διαδικασία παλινδρόμησης μιας κύησης, πιθανότατα επηρεάζοντας την φυσιολογική λειτουργία του αναπτυσσόμενου πλακούντα.

Είναι όμως εξίσου σημαντικό να τονισθεί ότι τα αποτελέσματα της έρευνάς μας δεν αποτελούν παρά μονάχα την αρχή μιας τέτοιας υπόθεσης και πρέπει στο μέλλον να διαλευκανθούν πολλοί σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι μπορεί να παρεμβάλλονται στην διαδικασία απάντησης ενός συγκεκριμένου τύπου κυττάρων στις συνθήκες του stress. Ενδεικτικά αναφέρονται ως τέτοιοι παράγοντες, η ύπαρξη κάποιας μορφής εμβρυϊκής ανωμαλίας, είτε χρωμοσωματικής είτε ανωμαλίας που αφορά την ανάπτυξη του εμβρύου, η διαταραχή παραγόντων του μεταβολισμού, η έκθεση σε συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς ή ακόμη και τερατογόνους παράγοντες, ο βαθμός του stress στο οποίο εκτίθεται κάθε κύηση ξεχωριστά (τοκετός με καισαρική τομή, εμβρυουλκία κ.λ.π.) και η συσχέτιση αυτού του βαθμού με την έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών καθώς και πλήθος άλλων

παραγόντων, των οποίων η αρίθμηση ξεφεύγει από το αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης έρευνας.

Ελπίζουμε ότι η έρευνά μας θα αποτελέσει το έναυσμα για παρόμοιου τύπου μελλοντικές μελέτες οι οποίες και θα μπορέσουν να ρίξουν ακόμη περισσότερο φως στον ιδιαίτερα αμφιλεγόμενο ρόλο της έκφρασης των πρωτεϊνών του θερμικού shock και ιδιαίτερα στον μηχανισμό με τον οποίο η έκφραση αυτή εμπλέκεται στην παλινδρόμηση μιας κύησης αλλά και στον ιδιαίτερο ρόλο που μπορεί να παίζει η συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεϊνών στην λειτουργία του πλακούντα μιας καθ'όλα φυσιολογικής τελειόμηνης κύησης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας: Να ερευνήσει την ρόλο των πρωτεϊνών του θερμικού shock (HSP) στις χοριακές λάχνες του πλακούντα και να συγκρίνει την συγκέντρωσή τους στις λάχνες των πλακούντων τελειομήνων κυήσεων και στα προϊόντα αυτομάτων αποβολών.

Υλικό και Μέθοδοι: Υλικό από προϊόντα 50 αυτομάτων αποβολών

πρώτου τριμήνου και 50 πλακούντες από τελειόμηνες κυήσεις.

Ακολούθησε ανοσοϊστοχημική μελέτη στην οποία εντοπίσαμε την συγκέντρωσή των πρωτεϊνών του θερμικού shock HSP 70 και 90 στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, κυτταροτροφοβλάστης, στρώματος και αγγείων. Η εντόπισή τους έγινε με την χρήση ειδικών αντισωμάτων που μπορούν να ανιχνεύσουν την παρουσία αυτών των πρωτεϊνών με τη χρήση μικροσκοπίου. Συγκρίναμε την έκφρασή τους στα κύτταρα φυσιολογικών τελειόμηνων πλακούντων και στο υλικό αυτομάτων αποβολών πρώτου τριμήνου.

Εφαρμόσαμε τη μέθοδο έμμεσης υπεροξειδάσης χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των HSP 70 και 90 σε εμβαπτισμένους σε φορμαλίνη ιστούς που προηγούμενα είχαν μονιμοποιηθεί σε παραφίνη.

Αποτελέσματα: Η έκφραση της HSP90B είναι στατιστικώς σημαντική αυξημένη στις χοριακές λάχνες του υλικού των αυτομάτων αποβολών πρώτου τριμήνου σε σύγκριση με την έκφρασή της στις λάχνες των τελειόμηνων πλακούντων και αφορά τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, της κυτταροτροφοβλάστης, των αγγείων και του

στρώματος. Η έκφραση της HSP90A είναι στατιστικώς σημαντική αυξημένη στις χοριακές λάχνες του υλικού των αυτομάτων αποβολών πρώτου τριμήνου σε σύγκριση με την έκφρασή της στις λάχνες των τελειόμηνων πλακούντων και αφορά τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης μόνο.

Στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασης που αφορά την HSP70 cognate στις χοριακές λάχνες του υλικού των αυτομάτων αποβολών πρώτου τριμήνου σε σύγκριση με την έκφρασή της στις λάχνες των τελειόμηνων πλακούντων βρέθηκε για τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης μόνο.

Τέλος η έκφραση της HSP70 inducible είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στις χοριακές λάχνες του υλικού των αυτομάτων αποβολών πρώτου τριμήνου σε σύγκριση με την έκφρασή της στις λάχνες των τελειόμηνων πλακούντων και αφορά τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, της κυτταροτροφοβλάστης, των αγγείων και του στρώματος.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, φέρουν στην επιφάνεια ικανοποιητικά στοιχεία που δείχνουν ότι υπάρχει μια σημαντική

αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών του θερμικού shock HSP 70 και 90, στις χοριακές λάχνες του υλικού των αυτομάτων αποβολών πρώτου τριμήνου σε σύγκριση με την έκφρασή των στις λάχνες των τελειόμηνων πλακούντων και ότι αυτή η αύξηση πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία μιας αυτόματης αποβολής.

Λέξεις-κλειδιά: Αυτόματη αποβολή πρώτου τριμήνου, Τελειόμηνοι πλακούντες, Χοριακές λάχνες, Συγκυτιοτροφοβλάστη, Κυτταροτροφοβλάστη, Κύτταρα του στρώματος, Κύτταρα των αγγείων, Πρωτεΐνες του θερμικού shock HSP, HSP 70 cognate, HSP 70 inducible, HSP 90 A και HSP 90 B.

SUMMARY IN ENGLISH (86)

Purpose: To investigate the role of Heat Shock Proteins on the chorionic villi of the human placental cells and to compare the concentration of placental HSP P70 & P90 in term deliveries and in missed miscarriages.

Materials and Methods: Fifty products of conception from women who experienced first trimester missed miscarriage and fifty placentas from women who gave birth at term were studied. An Immunohistochemical investigation was carried out with which we mark the localization of Heat Shock Proteins 70 and 90 on the syncytiotrophoblastic, cytotrophoblastic, stromal and blood vessel cells, using specific antibodies which can detect the presence of those proteins, on the light microscopic level. We compare their expression in the normal placental tissue of term pregnancies and in material acquired from first trimester missed miscarriages.

An indirect immunoperoxidase method was applied using polyclonal antibodies against HSP 70 and HSP 90 on formaline fixed paraffin embedded tissues.

Results: Expression of HSP 90 B was increased in chorionic villi of first trimester missed miscarriage, concerning syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, vessel and stroma cells, compared to full term placentas. There has been a statistically significant increase of HSP 90 A expression in chorionic villi of first trimester missed miscarriage, concerning only the cytotrophoblast cells, compared to full term placentas.

Expression of HSP 70 cognate protein was significantly increased in chorionic villi of first trimester missed miscarriage, concerning syncytiotrophoblastic cells only, compared to full term placentas.

Finally, HSP 70 inducible protein, was significantly increased in chorionic villi of first trimester missed miscarriages, concerning syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, vessel and stroma cells, compared to full term placentas.

Conclusions: The results of the present study have sufficiently shown that there is an increase of HSP 70 & 90 expression in chorionic villi of first trimester missed miscarriages compared to full term placentas and this increase may have an important implication on the miscarriage process.

Key words: First trimester missed miscarriage, term placenta, chorionic villi, syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, vessel, stroma, HSP 90 B, HSP 90 A, HSP 70 cognate, HSP 70 inducible.

Content: HSP 70 & 90 expression has been found statistically increased in missed miscarriages products in comparison to their expression into fully term placentas.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Δ.Αραβαντινός. Παθολογία της κύησης, Εκτρώσεις- Μαιευτική 1994;4:106-114.
- 2) E.Malcolm Symonds. Complications of early pregnancy-Spontaneous Abortion, Essential Obstetrics & Gynaecology 1992;8:85-88.
- 3) D.James, M.Pillai. Complications of early pregnancy-Obstetrics 1997;3:10.
- 4) T.G.Stovall, M.L.McCord. Early Pregnancy Loss and Ectopic Pregnancy, Novak's Gynecology 1996;17:487-488.
- 5) L.C.Junqueira, J.Carneiro, J.A.Long. Female Reproductive System-Basic Histology 1986;23:568-575.
- 6) K.Moore. The placenta & the membranes-Before we are born, Basic Embryology and Birth Defects 1970;8:72,76-79.
- 7) D.James, M.Pillai. The placenta-Obstetrics 1997;16:102-104.
- 8) K.Moore. The second Week of Fetal Development-Before we are born, Basic Embryology and Birth Defects 1970;4:28-31.
- 9) M.de Swiet, G.Chamberlain. Embryology-Basic Sciences in Obstetrics & Gynaecology 1998;2:43-48.
- 10) W.Kuhnel. Taschenatlas der Zytologie und mikroskopischen Anatomie 1985;pag.268-269.
- 11) T.Chard, R.Lilford. Cell biology, Embryology and the Placenta-Basic Sciences in Obstetrics & Gynaecology 1997;1:19-28.
- 12) E.A.Craig. The heat-shock response-CRC Critic.Rev.Biochemistry 1985;18:280-288.
- 13) S.Lindquist, E.A.Craig. The heat-shock proteins-Annual review of Genetics 1988;22:631-677
- 14) S.Lindquist. The heat-shock response-Annual review of Biochemistry 1986;55:1151-1191.
- 15) M.J.Gething, J.Sambrook. Protein folding in cell-Nature 1992;355:33-45.
- 16) R.I.Morimoto, A.Tissieres, C.Georgopoulos. The stress response, function of the proteins and perspectives-Stress Proteins in Biology and Medicine, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1990;pag.1-37.

- 17) R. Udelsman, M.J. Blake, C.A. Stagg, D.G. Li, D.J. Putney, N.J. Holbrook. Vascular heat shock protein expression in response to stress-*Journal of Clinical Investigation* 1993;91:465-473.
- 18) P.A. Berbarian, W. Myers, M. Tytell, V. Challa, M.G. Bond. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and arterosclerotic specimens of human arteries-*American Journal of Pathology* 1990;136:71-80.
- 19) A.E. Heufelder, J.R. Goellner, B.E. Wenzel, R.S. Bahn. Immunohistochemical detection and localization of a 72-kilodalton heat shock protein in autoimmune Thyroid disease-*Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1992;74:724-731.
- 20) J. Martin, A.L. Horwich, F.U. Hartl. Prevention of Protein Denaturation Under Heat Stress by the Chaperonin Hsp 60-*Science* 1992; Vol.258:995-998.
- 21) U.C. Manning-Krieg, P.E. Schemer, G. Schatz. Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix-*EMBO J.* 1991;10:3273-3280.
- 22) G. Becker, E.A. Craig. Heat shock proteins as molecular chaperones-*Journal of Biochemistry* 1994;219:11-23.
- 23) D.G. Li, C.B. Gordon, C.A. Stagg, R. Udelsman. Heat shock expression in human placenta and umbilical cord-*Shock* 1996;Vol.5 No.5:320-323.
- 24) J. Rothman. Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells-*Cell* 1989;46:5-9.
- 25) T.G. Chapell, B.B. Conforti, S.L. Schmid, J.E. Rothman. The ATPase core of a clathrin uncoating protein-*Journal of Biol. Chemistry* 1987;262:746-751.
- 26) I.G. Haas, M. Wabl. Immunoglobulin heavy chain binding protein-*Nature* 1983;306:387-389.
- 27) A.S. Lee, A. Delegeane, D. Scharff. Highly conserved glucose-regulated protein in hamster and chicken cells: preliminary characterization of its cDNA clone-*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1981;78:4922-4925.
- 28) S. Munro, H.R.B. Pelham. An hsp 70-like protein in the ER: Identity with the 78-kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein-*Cell* 1986;46:291-300.

- 29) D.G. Bole, L.M. Hendershot, J.F. Kearny. Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas - *Journal of Cell Biology* 1986;102:1558-1566.
- 30) C.S. Copeland, R.W. Doms, E.M. Bolzau, R.G. Webster, A. Melenius. Assembly of influenza haemagglutinin trimers and its role in intracellular transport - *Journal of Cell Biology* 1986; 103:1179-1191.
- 31) M. Flajnik, C. Canel, J. Kramer, M. Kasahara. Hypothesis: Which came first, MHC class 1 or class 2 - *Immunogenetics* 1991;33:295-300.
- 32) D.R. Madden, J.C. Gorga, D.C. Wiley. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2,1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC - *Cell* 1992;70:1035-1048.
- 33) D.R. Madden, J.C. Gorga, J. Strominger, D.C. Wiley. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptide bound in an extended conformation - *Nature*;353:321-325.
- 34) S.J. Landry, R. Jordan, R. McMacken, L.M. Gierach. Different conformations for the same polypeptide bound to chaperones DnaK and GroEL - *Nature*;355:455-457.
- 35) G.C. Flynn, J. Pohl, M.T. Flocco, J.E. Rothman. Peptide binding specificity of the molecular chaperone BiP - *Nature* 1991;353:726-730.
- 36) K. Liberek, D. Skowyra, M. Zylicz, C. Johnson, C. Georgopoulos. The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat-shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein - *Journal of Biol. Chemistry* 1991;266:14491-14496.
- 37) T. Leustek, B. Dalie, D. Amir-Shapira, N. Brot, H. Weissbach. A member of HSP 70 family is localized in mitochondria and resembles *Escherichia coli* DnaK - *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1989;86:7805-7808.
- 38) E.A. Craig, J. Kramer, J. Shilling, M. Werner-Washburne, S. Holmes, J. Koscic-Smith, C.M. Nikolett. SSC1, an essential member of the *S. cerevisiae* HSP 70 multigene family, encodes a mitochondrial protein - *Mol. Cell. Biology* 1989;9:3000-3008.

- 39) D. Engman, L. V. Kirchhoff, J. E. Donelson. Molecular cloning of mtp 70, a mitochondrial member of the HSP 70 family- *Mol. Cell. Biology* 1989;9:5163-5168.
- 40) C. R. Brown, R. L. Martin, W. J. Hansen, R. P. Beckmann, W. J. Welch. The constitutive and stress inducible form of HSP 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion- *Journal of Cell Biology* 1993;120:1101-1112.
- 41) E. A. Craig, K. Jacobsen. Mutations in cognate gene of *Saccharomyces cerevisiae* HSP 70 result in reduced growth rate at low temperatures- *Mol. Cell. Biology* 1985;5:3517-3524.
- 42) M. Werner-Washburne, J. Becker, J. Kosics-Smithers, E. A. Craig. Yeast HSP 70 RNA levels change in response to the physiological status of the cell- *Journal of Bacteriology* 1989; 171:2680-2688.
- 43) N. Pfanner, J. Rassow, B. Guiard, T. Sollner, F. U. Hartl, W. Neupert. Energy requirements for unfolding and membrane translocation of precursor proteins during import in mitochondria- *J. Biological. Chemistry* 1990;265:16324-16329.
- 44) R. Zimmerman, M. Sagstetter, M. J. Lewis, H. R. B. Pelham. Seventy Kilo Dalton HSP and additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes- *EMBO J.* 1988;7:2875-2880.
- 45) D. Peralta, T. Lithgow, N. J. Hoogenraad, P. B. Hoj. Prechaperonin 60 and preorniyhine transcarbamyase share components of the import apparatus but have distinct maturation pathways in rat liver mitochondria- *Eur. J. Biochem.* 1993;211:881-889.
- 46) S. R. Terlecky, H. L. Chiang, T. S. Olson, J. F. Dice. Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat-shock cognate protein- *J. Biol. Chem.* 1992;267:9202-9209.
- 47) N. Imamoto, Y. Matsuoka, T. Kurihara, K. Kohno, M. Miyagi, F. Sakiyama, Y. Okada, S. Tsunasawa, Y. Yoneda. Antibodies against 70-kDa heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins- *J. Cell. Biol.* 1992;119:1047-1061.

- 48)K.Liberek, J.Marszalek, D.Ang, C.Georgopoulos, M.Zylicz. Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of Dnak-Proc.Natl Acad.Sci.USA 1988; 88:2874-2878.
- 49)J.Wild, E.Altman, T.Yura, C.A.Gross. DnaK and DnaJ HSP participate in protein export in Escherichia coli-Genes & Dev.1992;6:1165-1172.
- 50)D.G.Li, C.B.Gordon, C.A.Stagg, R.Udelsman. Heat shock protein expression in human placenta and umbilical cord-Shock 1996;Vol.5.No.5:320-323.
- 51)M.J.Divers, J.N.Bulmer, D.Miller, R.J.Litford. Placental heat-shock proteins: No immunoistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour-Gynecol.Obstet.Invest.1995;40:236-243.
- 52)J.Sonek, S.G.Gabbe, J.D.Iams, D.A.Kniss. Morphological changes in the human amnion epithelium that accompany labour as seen with scanning and transmission electron microscopy-Am.J.Obstet.Gynecol.1991;164:1174-1180.
- 53)A.D.Hoyes. Structure and function of the amnion- Obstet.Gynecol.Ann.1975;4:1.
- 54)B.R.Carr, C.R.Parker, J.D.Madden, P.MacDonald, J.C.Porter. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationship throughout human pregnancy-Am.J.Obstet. Gynaecol.1981;139:416-422.
- 55)I.Fettes, J.Fox, S.Kuzniak, J.Shime, D.Care. Plasma levels of immunoreactive β -endorphin and adrenocorticotropic hormone during labor and delivery-Obstet.Gynaecol.1984;64:359-362.
- 56)A.Kauppila, R.Tuimala, J.Haapalahti. Maternal adrenocorticotropic hormone and cortisol during labour and vaginal delivery- J.Obstet.Gynaecol.Br.Common.1974;81:691-694.
- 57)A.Costa, V.D.Filippis, M.Voglino. Adrenocorticotropic hormone and catecholamines in maternal, umbilical and neonatal plasma in relation to vaginal delivery-J.Endocrinol.Invest. 1988;11:703-709.
- 58)B.E.P.Murphy. Steroid arteriovenous differences in umbilical cord plasma: evidence of cortisol production by the human fetus in early gestation- J.Clin.Endocrinol.Metab. 1973; 36:1037-1038.

- 59) M.J.Blake, R.Udelsman, G.J.Feulner, D.D.Norton, N.J.Holbrook. Stress-induced HSP 70 expression in adrenal cortex: A glucocorticoid-sensitive, age-dependent response-*Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 1991;88:9873-9877.
- 60) K.Borkovich, F.Farrelly, D.Finkelstein, J.Taulien, S.Lindquist. HSP 82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells in higher temperature-*Mol.Cell.Biol.* 1989;9:3910-3930.
- 61) J.C.A.Bardwell, E.A.Craig. Eucaryotic Mr 83000 heat-shock protein has a homologue in *Escherichia coli*-*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 1987;81:848-852.
- 62) R.K.Blackman, M.Meselson. Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the *Drosophila* HSP 82 gene-*J.Mol.Biol.*1986;188:499-515.
- 63) R.A.Mazzarella, M.Green. ERp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat-shock protein (HSP 90) and the 94-kDa glucose regulated protein (GRP 94)-*J.Biol.Chem.*1987;262:8875-8883.
- 64) P.K.Sorger, H.R.B.Pelham. The glucose-regulated protein grp 94 is related to heat-shock protein hsp 90-*J.Mol.Biol.*1987;194:341-344.
- 65) P.Csermely, C.R.Kahn. The 90-kDa heat-shock protein (hsp 90) possesses an ATP binding site and autophosphorylating activity-*J.Biol.Chem.*1991;266:4943-4950.
- 66) P.Csermely, J.Kajitar, M.Hollosi, G.Jalsovszky, S.Holly, C.R.Kahn, P.Jr.Gergely, C.Soti, K.Mihaly, J.Somogyi. ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat-shock protein (hsp 90)-*J.Biol.Chem.*1993;268:1901-1907.
- 67) H.Wiech, J.Buchner, R.Zimmermann, U.Jacob. HSP 90 chaperones protein folding in vitro-*Nature* 1992;358:169-170.
- 68) K.Nadeau, A.Das, C.T.Walsh. HSP 90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat-shock transcription factors and peptidyl-prolyl-isomerases-*J.Biol.Chem.*1993;268:1479-1487.
- 69) K.J.Howard, S.J.Holley, K.R.Yamamoto, C.W.Distelhorst. Mapping the heat-shock protein 90 binding region of the glucocorticoid receptor-*J.Biol.Chem.*1990;265:11928-11935.
- 70) S.P.Bohen, A.Kralli, K.R.Yamamoto. Hold'em and fold'em: Chaperones and Signal Transduction-*Science* 1995;268:1303-1304.

- 71) F.C. Dalman, L.C. Scherrer, L.P. Taylor, H. Akil, W.B. Pratt. Localization of the 90-kDa heat-shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition- *J. Biol. Chem.* 1991;266:3482-3490.
- 72) S.P. Bohen, K.R. Yamamoto. *The biochemistry of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*-Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 1994;pp:330-334.
- 73) Y. Kimura, I. Yahara, S. Lindquist. Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp 90-mediated signal transduction pathways-*Science* 1995;268:1362-1365.
- 74) M.J. Divers, J.N. Bulmer, D. Miller, R.J. Lilford. Placental Heat Shock Proteins: No Immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour-*Gynecology & Obstetrics Investigation* 1995;40:240.
- 75) M.J. Divers, J.N. Bulmer, D. Miller, R.J. Lilford. Placental Heat Shock Proteins: No Immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour-*Gynecology & Obstetrics Investigation* 1995;40:242-figure 7-a.b.c.
- 76) M.J. Divers, J.N. Bulmer, D. Miller, R.J. Lilford. Placental Heat Shock Proteins: No Immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour-*Gynecology & Obstetrics Investigation* 1995;40:243.
- 77) G.V. Anamukov, O.A. Strel'chyonok. Pregnancy associated variant differs from normal transcortin with respect to its carbohydrate structures-*Biochim and Biophys Acta* 1988 Feb.8;938(1):1-6
- 78) G.V. Anamukov, O.A. Strel'chyonok. Pregnancy associated variant differs from normal transcortin with respect to its carbohydrate structures-*Biochim and Biophys Acta* 1988 Feb.8;938(1):1-6
- 79) P.M. Driver, M.D. Kilby, I. Bujalska, E.A. Walker, M. Hewison, P.M. Stewart. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes and corticosteroid hormone receptors in primary cultures of human trophoblast and placental bed biopsies-*Molecular Human Reproduction* 2001 Apr;7(4):357-63.

- 80) R.B. Billiar, G.J. Repe, E.D. Albrecht. Immunocytochemical identification of the estrogen receptor in the nuclei of cultured human placental syncytiotrophoblasts-Placenta 1997 May;18(4):365-70.
- 81) A. Bukovsky, M.R. Caudle, M. Cekanova, R.I. Fernando, J. Wimalasena, J.S. Foster, D.C. Henley, R.F. Elder. 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-Reproductive Biology Endocrinology 2003 April 15;1(1):36.
- 82) A. Bukovsky, M. Cekanova, M.R. Caudle, J. Wimalasena, J.S. Foster, D.C. Henley, R.F. Elder. Expression and localization of estrogen receptor-alpha and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol-Reproductive Biology Endocrinology 2003 Feb 6;1(1):13
- 83) T.N. Hickman, L.M. Shih, H.A. Zacur, R.J. Kurman, M. Diener-West, J.D. Gearhart. Decreased progesterone receptor expression in the intermediate trophoblastic cells of spontaneous abortions-Fertility and Sterility 2002 May;77(5):1001-5.
- 84) J.P. van Beek, H. Guan, L. Julan, K. Yang. Glucocorticoids stimulate the expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultures human placental trophoblast cells-Journal of clinical endocrinology and Metabolism 2004 Nov;89(11):5614-21.
- 85) F.A. Patel, J.W. Funder, J.R. Challis. Mechanism of cortisol/progesterone antagonism in the regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase activity and messenger ribonucleic acid levels in human chorion and placental trophoblast cells at term-Journal of clinical endocrinology and Metabolism 2003 Jun;88(6):2922-33.]
- 86) S. Sotiriou, K. Liatsos, I. Ladopoulos, D.L. Arvanitis. A comparison in concentration of heat shock proteins (HSP) 70 and 90 on chorionic villi of human placenta in normal pregnancies and in missed miscarriages-Clinical & Experimental Obstetrics and Gynaecology 2004 Vol XXXI ISSN:0390-6663,n.3 185-190.