

Lek. med. Michał Szuber

„Ocena ekspresji i sygnalizacji EG-VEGF i
receptorów PKR1 w myometrium i łożysku kobiet z
ciąży prawidłowych i ciąży powikłanych stanem
przedrzucawkowym.”

Rozprawa doktorska
wykonana w
Klinice Perinatologii i Ginekologii
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Promotor: dr hab. med. Wiesław Markwitz

Poznań 2010

*Niniejszą rozprawę doktorską
poświęcam
mojej żonie i córce*

*Składam serdeczne podziękowania Panu
dr hab. med. Wiesławowi Markwitzowi za
opiekę i wszechstronną pomoc oraz cierpliwość i wyrozumiałość
podczas realizacji tego projektu badawczego.*

*Wyrażam wdzięczność wszystkim tym, którzy okazali mi pomoc przy
realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Dziękuję mojej żonie i córce za ich życzliwość, wyrozumiałość i
wsparcie podczas powstawania tej pracy.*

SPIS TREŚCI

	Str.
1.0. Wstęp	
1.1. Ciśnienie tętnicze w ciąży	1
1.2. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w ciąży	2
1.3. Stan przedrzucawkowy - etiopatogeneza	4
1.4. Naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu pochodzący z gruczołów dokrewnych - Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF)	6
1.5. Funkcja prokinetycyn i ich receptorów	8
1.6. Rola prokinetycyn i ich receptorów w rozrodzie u człowieka	10
1.6.1. Układ płciowy męski	10
1.6.2. Układ płciowy żeński	10
1.7. Potencjalna rola prokinetycyn w ciąży	12
1.8. Rola prokinetycyn w zaburzeniach układu rozrodczego	13
2.0. Założenia i cele pracy	15
3.0. Materiał i metodyka	16
3.1. Materiał	16
3.1.1. Pacjenci	16
3.1.2. Materiał tkankowy i zastosowane odczynniki	16
3.2. Metodyka	18
3.2.1. Ocena sygnalizacji wewnątrzkomórkowej	18
3.2.1.1. Oznaczanie stężenia białek w supernatancie Metodą Lowry	19
3.2.1.2. Protokół badania Western Blotting	20
3.2.1.3. Preparatyka próbek myometrium i łożyska do metody Western Blotting	20
3.2.1.4. Skład mieszanin użytych w badaniu Western Blot	22
3.2.2. Metoda oznaczania ekspresji mRNA PKR1 i PK1 (EG-VEGF) w tkankach łożyska i mięśniówki macicy.	23
3.2.3. Oznaczenie immunohistochemiczne lokalizacji	28

receptora (PKR1) i ligandu (PK1) w tkankach myometrium
i łożyska

4.0. Wyniki	30
4.1. Analiza rozkładu wieku i rodności w grupie badanej i kontrolnej	30
4.2. Wyniki oceny ekspresji mRNA PK1 i PKR1 w myometrium i łożysku	30
4.3. Badanie poziomu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej	36
4.4. Badanie metodą immunohistochemiczną ekspresji białka PK1 i PKR1 w łożysku i myometrium	44
4.4.1. Łožysko	44
4.4.2. Mięsień macicy	44
5.0. Dyskusja	56
5.1. Omówienie wyników oceny ekspresji PK1 i PKR1 w myometrium i łożysku	58
5.2. Omówienie wyników badania poziomu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej	61
5.3. Omówienie wyników badania metodą immunohistochemiczną ekspresji białka PK1 i PKR1 w łożysku i myometrium	63
6.0 Wnioski	66
7.0 Streszczenie	67
8.0 Abstract	69
9.0 Piśmiennictwo	71

Wykaz ważniejszych skrótów użytych w pracy

- ACR – albumin-creatinine ratio – stosunek albumina-kreatynina w moczu
- BSA – bovine serum albumin – surowicza albumina wołowa
- dNTP - Deoxyribonucleotide triphosphate – trójfosforan deoksyrybonukleotydu
- DTT - Dithiothreitol (DTT, odczynnik Clelanda) – organiczny związek chemiczny będący podwójnym tiolem i diolem.
- EC – endothelial cells - komórki endotelialne
- EG-VEGF - Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor - Naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu pochodzący z gruczołów dokrewnych
- ERK - extracellular-signal-regulated protein kinases – pozakomórkowe kinazy białek regulujących przekaznictwo sygnału
- EVT – extravillous trophoblast – trofoblast pozakosmkowy
- GAPDH - glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase - glicerdehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa
- GPCRs - G – protein - coupled receptors - receptory błonowe podwójnego białka G
- HELLP - Haemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet Count – hemoliza erytrocytów, wzrost aktywności enzymów wątrobowych i trombocytopenia.
- IUGR – intrauterine growth restriction – wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu
- MAP kinases – mitogen-activated protein kinases – kinazy białkowe aktywowane mitogenem
- MMP – metalloproteinases - metaloproteinazy
- M-MuLV - Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase – polimeraza DNA kierowana przez RNA
- PBS – phosphate buffered saline – zbuforowana sól z fosforanami
- PE – preeclampsia – stan przedrzucawkowy, preeklampsja
- PK1 – prokinetycyna 1, substancja analogiczna z EG-VEGF

- PK2 – prokinetycyna 2, substancja analogiczna z ortologiem białka wyizolowanego z wydzieliny skóry płaza *Bombina variegata*, znanym jako Bv8
- PKR 1, PKR2 – prokineticin receptor 1 and 2 - receptor prokinetycyny 1, receptor prokinetycyny 2
- SDS - sodium dodecyl sulphate – siarczan dodecyłu sodu, detergent denaturujący białka.
- SGA –small for gestational age – hipotrofia płodu
- ST – syncytiotrophoblast - syncytiotrofoblast
- TBS – Tris-buffered saline – trzykrotnie buforowana sól
- Tween – roztwór detergentu
- VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor - Naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu

1. Wstęp

Nadciśnienie tętnicze w okresie ciąży dotyczy około 5-10% ciężarnych i związane jest ze zwiększonym ryzykiem powikłań okołoporodowych oraz zgonu zarówno matki, jak i dziecka [1]. U kobiet z nadciśnieniem tętniczym łagodnym poród przedwczesny występuje w 33% ciąż, zaś 11% noworodków rodzi się jako SGA (Small for Gestational Age) – zbyt małą masą ciała względem wieku ciążowego. U kobiet z ciężkim nadciśnieniem tętniczym odsetki te są wyższe i wynoszą odpowiednio 62-70% i 40% [1]. Spośród różnorodnych form nadciśnienia w ciąży **stan przedrzucawkowy** (preeclampsia - PE) jest odpowiedzialny za większość powikłań. Jest odpowiedzialny za około 15% jatrogennych porodów przedwczesnych, co związane jest ze znaczącą zachorowalnością i śmiertelnością okołoporodową noworodków [18]. W Polsce zaburzenia ciążowe spowodowane nadciśnieniem tętniczym są drugą, co do częstości przyczyną umieralności matek. Stan przedrzucawkowy zwiększa u matki ryzyko rozwinięcia się w przyszłości nadciśnienia tętniczego, choroby niedokrwiennej serca czy chorób krążenia mózgowego. Światowa Organizacja Zdrowia ocenia, iż dziennie umierają na świecie około 192 kobiety z powodu powikłań związanych z nadciśnieniem ciążowym.

1.1. Ciśnienie tętnicze w ciąży

Pod wpływem działania estrogenów i progesteronu oraz zwiększonej aktywności miejscowych czynników wazodylatacyjnych, takich jak prostacyklina i tlenek azotu, u kobiet z prawidłowo przebiegającą ciążą dochodzi do zmniejszenia oporu obwodowego, a co za tym idzie do obniżenia ciśnienia tętniczego. Już w I trymestrze ciąży następuje obniżenie ciśnienia rozkurczowego o około 10 mmHg, również jeśli wcześniej występowało nadciśnienie tętnicze. W II trymestrze ciąży wartości ciśnienia tętniczego również ulegają obniżeniu, osiągając najniższe wartości około 24. tygodnia, niższe średnio o 15 mmHg w porównaniu z okresem przed ciążą. W III trymestrze ciąży ciśnienie tętnicze powraca stopniowo do wartości wyjściowych lub nawet może je przekraczać. Po porodzie normalizacja ciśnienia tętniczego następuje zwykle do 6-8 tygodnia połogu [2,3].

Zachowanie się ciśnienia tętniczego i zmiany adaptacyjne w układzie krążenia w ciąży o przebiegu prawidłowym sugerują, że normy i kryteria nadciśnienia

tętniczego u ciężarnych powinny być inne niż u kobiet nieciążarnych. Pomimo tych przesłanek, podstawowe kryterium rozpoznania nadciśnienia tętniczego w ciąży jest takie samo, jak w populacji ogólnej: dwukrotne stwierdzenie wartości ciśnienia tętniczego krwi równe lub przekraczające 140/90 mmHg. Drugi pomiar winien być przeprowadzony w odstępie przynajmniej 6 godzin, w sposób ograniczający ryzyko błędu i niewywołujący niepokoju u pacjentki [4]. U ciężarnych wartość ciśnienia rozkurczowego ma większe znaczenie przy ocenie ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego i powikłań narządowych nadciśnienia niż wartość ciśnienia skurczowego krwi.

1.2. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w ciąży

Istnieją różne klasyfikacje nadciśnienia tętniczego w ciąży. Nadciśnienie tętnicze może być obecne już przed ciążą, jako pierwotne lub rzadziej – wtórne, albo może być przez ciążę indukowane. Klasyfikacje tworzone przez różne organizacje zajmujące się problematyką nadciśnienia tętniczego ciąży ulegały zmianom na przestrzeni lat. Najbardziej aktualną jest zmodyfikowana klasyfikacja według wytycznych Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH) i Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC) z 2003 roku [5].

- **Nadciśnienie wcześniej istniejące (przewlekłe, *essential hypertension*).** Jest to nadciśnienie tętnicze, które występowało przed ciążą lub rozwinęło się przed 20 t.c. i nie ustępuje po porodzie. Może przebiegać z białkomoczem, występuje w 1-5% ciąż. [6]. Stanowi ono coraz większy problem kliniczny. Jest to związane z odkładaniem przez kobiety decyzji o zajściu w ciążę w czasie kosztem rozwijania kariery zawodowej. Wraz z wiekiem wzrasta częstość występowania pierwotnego nadciśnienia tętniczego w populacji. Obecnie odsetek przewlekłego nadciśnienia w ciąży w wieku 18-29 lat wynosi 0,6-2%, a wśród kobiet w wieku 30-39 lat – od 4,6 do 22,3%.
- **Nadciśnienie ciążowe** (indukowane ciążą) – rozwija się u 6-17% nieródek, oraz u 2-4% wieloródek [1]. Rozwija się po 20 t.c. i zazwyczaj ustępuje w ciągu 42 dni po porodzie. Przebiega bez towarzyszącego białkomoczu.
- **Stan przedrzucawkowy** (preeclampsia) – Jest to nadciśnienie tętnicze z towarzyszącym białkomoczem > 0,5 g/d (wg NHBPEP-WG – National High Blood Pressure Education Program - Working Group > 0,3 g/d), pojawia się

zwykle po 20 t.c. (w przypadku ciąż powikłanych zaśnadem groniastym nawet wcześniej) i zazwyczaj ustępuje w ciągu 42 dni po porodzie. Występuje u 2-7% zdrowych nieródek, w 14% ciąż bliźniaczych, oraz u 18% pacjentek, które wcześniej przebyły stan przedrzucawkowy [7]. W przypadku nieobecności białkomoczu, objawy takie jak ból głowy, nieostre widzenie, ból brzucha lub nieprawidłowe wyniki badań laboratoryjnych (małopłytkowość, wzrost aktywności enzymów wątrobowych) również sugerują rozpoznanie stanu przedrzucawkowego. Wartości białkomoczu przekraczające 5 g/d wskazują na ciężki stan przedrzucawkowy. W miarę pogarszania się stanu przedrzucawkowego może wystąpić zespół **HELLP (*Haemolysis, Elevated Liver Enzymes, Low Platelet Count* – hemoliza erytrocytów, wzrost aktywności enzymów wątrobowych i trombocytopenia)**. Wydaje się, iż jest to wielonarządowa manifestacja ciężkiego stanu przedrzucawkowego i rzucawki, lecz aż 15% ciężarnych z tym zespołem nie ma podwyższonego ciśnienia tętniczego, ani białkomoczu [8]. Zespół HELLP dotyczy 4-12% kobiet w stanie przedrzucawkowym lub z rzucawką i 0,2-0,6% wszystkich ciąż. Zazwyczaj pojawia się w III trymestrze ciąży (69%), ale może wystąpić zarówno wcześniej jak i do 7 dni po porodzie (31%) (największe ryzyko w pierwszych 48 godzinach połogu) [9,10].

Wystąpienie w przebiegu stanu przedrzucawkowego napadu drgawek toniczno-klonicznych, nie spowodowanych żadną inną przyczyną (np. padaczką lub krwawieniem do CUN) niż nadciśnienie ciążowe, połączonych z utratą przytomności jest określane mianem **rzucawki (*eclampsia*)**. Wystąpienie drgawek mogą poprzedzić inne objawy ze strony ośrodkowego układu nerwowego: utrzymujące się bóle głowy w okolicy czołowej lub potylicznej, nieostre lub podwójne widzenie, światłowstręt, mroczki przed oczami, rzadko całkowite niedowidzenie lub neurologiczne objawy ogniskowe. Rzucawka może wystąpić podczas ciąży (38-53%), w trakcie porodu (18-36%), jak również w okresie połogu (11-44%).

- **Nadciśnienie wcześniej istniejące (przewlekłe) z nałożonym stanem przedrzucawkowym** – to nadciśnienie tętnicze występujące przed ciążą lub, które rozwinęło się do 20 t.c. z dalszym wzrostem wartości ciśnienia tętniczego i pojawieniem się lub nasileniem białkomoczu po 20 t.c., nie ustępujące po porodzie. Występuje u 10-25% kobiet z nadciśnieniem

przewlekłym [1]. Zwiększone ryzyko wystąpienia tego powikłania obserwuje się w przypadku współistniejącej niewydolności nerek, długotrwałego nadciśnienia przewlekłego (min. 4 lata), oraz gdy nadciśnienie występowało już w poprzedniej ciąży [4].

- **Nadciśnienie tętnicze niesklasyfikowane przed porodem (podczas trwania ciąży)** – to nadciśnienie, którego początek nie został określony i które wymaga weryfikacji po 42 dniach połogu lub później.

1.3. Stan przedrzucawkowy - etiopatogeneza

Stan przedrzucawkowy występuje częściej u pierwiastek, zaś w kolejnych ciążach przebiega z reguły łagodniej, o ile jest to ciąża z tym samym partnerem. W przypadku zmiany partnera ryzyko rozwoju preeklampsji wraca do poziomu charakterystycznego dla pierwszej ciąży. Co więcej stan przedrzucawkowy występuje częściej w przypadku ciąż powstałych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego z wykorzystaniem donacji oocytów, gdy cały zarodek jest obcy antygenowo w stosunku do kobiety, w organizmie której się rozwija [11]. Wśród czynników etiologicznych wymienia się również obok immunologicznych czynniki genetyczne [12] i metaboliczne. Etiopatogeneza zaburzenia jest nieznana. Wydaje się oczywiste, iż zaburzenia związane z PE rozpoczynają się w łożysku, gdyż obecność łożyska (ale już nie płodu) jest niezbędna do wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Przykładem jest rozwój stanu przedrzucawkowego w przypadku zaśniadu groniastego, oraz ciąży mnogiej. Jedynym sposobem wyleczenia stanu przedrzucawkowego jest poród, podczas którego usuwane jest łożysko [13].

Dotychczas za najbardziej prawdopodobny uważało się dwuetapowy model rozwoju stanu przedrzucawkowego [13]. Przedkliniczny etap pierwszy występuje we wczesnej ciąży, gdy dochodzi do nieprawidłowej inwazji trofoblastu i co za tym idzie do niedokrwienia łożyska [14]. Etap drugi występuje wówczas, gdy będące pod wpływem stresu oksydacyjnego łożysko uwalnia do krążenia matczyne czynniki, powodujące systemową odpowiedź zapalną i dysfunkcję śródbłonnków u matki, co prowadzi do wystąpienia klinicznych objawów stanu przedrzucawkowego. O ile etap pierwszy (łożyskowy) jest trudny do zdiagnozowania, o tyle etap drugi (matczyne) jest etapem objawów klinicznych [13]. Czynniki genetyczne i immunologiczne

przyczyniają się głównie do rozwoju pierwszej fazy choroby, metaboliczne zaś mogą warunkować powstawanie zmian charakterystycznych zarówno dla pierwszego jak i drugiego etapu rozwoju stanu przedrzucawkowego.

Nowsze badania [15] sugerują inny model rozwoju stanu przedrzucawkowego. Jest to model trój etapowy: pierwotnie dochodzi do nadmiernej i atypowej matczynej odpowiedzi immunologicznej na rozwijający się zarodek i płód. Sugeruje się mutacje w ludzkim leukocytarnym antygenie – G (Human Leukocyte Antygen – G), jednym z genów kodujących białka zgodności tkankowej MHC (Major Histocompatibility Complex). Mutacja w jego obrębie prowadziłyby do nadmiernej cytolitycznej aktywacji leukocytów doczesnowych i z krwi obwodowej do tej pory będących w supresji pod wpływem cząstek MHC z powierzchni komórkowej. HLA-G występują na powierzchni trofoblastu pozakosmkowego, ale nie na powierzchni syncytiotrofoblastu. W ten sposób defektywna funkcja HLA-G przyczyniałaby się do nieprawidłowej inwazji trofoblastu, prowadzącej do przewlekłego stresu oksydacyjnego i w konsekwencji do zaburzeń w funkcjonowaniu matczynek komórek endotelium. Przebieg tych zaburzeń obserwowany w stanie przedrzucawkowym nie wydaje się być inny od procesów przebiegających w ciąży prawidłowej. Różnica polega na stopniu nasilenia tych procesów, co sugeruje, iż stan przedrzucawkowy jest krańcowym przykładem zmian występujących w każdej ciąży [15].

Nieprawidłowa inwazja komórek trofoblastu w ściany tętnic spiralnych – końcowych gałęzi tętnic macicznych, niezależnie od przyczyny ją wywołującej, stanowi podstawę patofizjologii procesu powstawania stanu przedrzucawkowego. W organizmie ludzkim, w warunkach prawidłowych, inwazja trofoblastu ma przebieg dwuetapowy. W pierwszej fazie, między 6. a 8. t.c. inwazja wewnątrznaczyniowego cytotrofoblastu pozakosmkowego w ściany tętnic spiralnych ograniczony jest tylko do doczesnowych odcinków naczyń. Drugim etapem jest wnikanie trofoblastu w mięśniowe, bardziej zewnętrznie położone, odcinki końcowych gałęzi tętnic macicznych, co ma miejsce pomiędzy 14. a 16. t.c. Następstwem inwazji trofoblastu w ścianę tętnic jest ich intensywna przebudowa. Wysokooporowe tętniczki typu sprężystego z okresu przed ciążą ulegają konwersji w niskooporowe, wysokopojemnościowe naczynia zbliżone budową do żył. Przebudowa ta jest następstwem zniszczenia błony mięśniowej i włókien tkanki łącznej warstwy środkowej tętnic oraz destrukcji śródbłonna i zastąpienia go warstwą komórek trofoblastu. Przemiany te mają charakter przystosowawczy do znacznego wzrostu

przepływu krwi przez macicę w okresie ciąży. W ciąży w której rozwija się stan przedrzucawkowy zaburzenia ulega inwazja trofoblastu. Konsekwencją tego jest niedostateczna przebudowa odcinków mięśniowych tętnic spiralnych. Nie tylko nie dochodzi do utraty śródbłonka i regresji warstwy mięśniowej, ale może dodatkowo następować stopniowa proliferacja warstwy mięśniowej, pogrubienie ściany naczynia oraz formowanie się zmian miażdżycowych.

Niestety, nieprawidłową inwazją trofoblastu w ściany tętnic spiralnych nie można w pełni tłumaczyć rozwoju stanu przedrzucawkowego w ciąży. Zjawisko niedostatecznej inwazji trofoblastu znajdujemy również w przypadku powikłań takich jak wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu bez towarzyszącego nadciśnienia. Uważa się obecnie, iż do rozwoju PE niezbędny jest udział czynników matczyńskich predysponujących do zmian naczyniowych [13, 16]. Należą do nich między innymi przewlekłe nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, insulinooporność, kolagenozy, trombofilia, hiperlipidemia i otyłość, chociaż w świetle ostatnich analiz [17] wydaje się, iż ta ostatnia nie jest niezależnym czynnikiem ryzyka.

Przedmiotem kontrowersji i ciągłych badań jest ustalenie czynnika i procesów będących łącznikiem między pierwszym a drugim etapem rozwoju choroby. Powszechnie przypisuje się rolę ogniwa pomiędzy wystąpieniem hipoperfuzji a uszkodzeniem śródbłonka stresowi oksydacyjnemu. Istotą jego jest nasilona produkcja wolnych rodników tlenowych (OFR – O₂ free radicals), zwłaszcza w procesie nasilonej peroksydacji lipidów – najlepiej poznanego procesu utleniania substancji organicznych przez OFR.

1.4 Naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu pochodzący z gruczołów dokrewnych - Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF)

Prokinetycyny to niedawno odkryte czynniki biorące udział w całym spektrum zjawisk w różnych tkankach poprzez aktywację swoistych receptorów. Prokinetycyna 1 (PK1) i prokinetycyna 2 (PK2) to nazwy nadane tym substancjom przez Li i wsp. (19), by oddać ich funkcje w przewodzie pokarmowym, polegającą na indukowaniu swoistej i silnej czynności skurczowej mięśniówki gładkiej. Ostatnio, Le Couter i wsp.

(20) opisali czynnik wzrostu powodujący silną mitogenną odpowiedź w komórkach śródbłonna z gruczołów dokrewnych. Podobny efekt wywołuje znany już naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), dlatego też nowy czynnik nazwano naczyniowym śródbłonkowym czynnikiem wzrostu pochodzącym z gruczołów dokrewnych (EG-VEGF). Pomimo iż czynniki te wykazują podobne funkcje, czy mechanizmy kontroli, ich struktura jest różna. Terminy prokinetycyna 1 i EG-VEGF można stosować zamiennie jako iż strukturalnie są to czynniki identyczne.

PK1 jest ludzkim ortologiem nietoksycznego białka wyizolowanego z jadu czarnej mamby (*Dendroaspis polylepsis*) i nazwanym początkowo białkiem jadowym A (VPRA) (21) lub jelitową toksyną mamby 1 (MIT 1), z powodu jej zdolności do kurczenia jelita cienkiego świnek morskich (22,23). PK1 jest naturalną proteiną składającą się z 86 aminokwasów, z peptydem sygnałowym składającym się z 19 aminokwasów, w 80% homologiczna do VPRA/MIT1. Gen kodujący prekursor PK1 zlokalizowany jest na ludzkim chromosomie pierwszej pary (24) i zakodowany jest przez 3 eksony (19,20).

PK2 jest ludzkim paralogiem PK1 i ortologiem białka wyizolowanego z wydzieliny skóry płaza *Bombina variegata*, znanym jako Bv8 (25). Występowanie wariantu PK2 zostało opisane w ludzkich, mysich i byczych jądrach. Posiada on bogatą w argininę i lizynę wstawkę 21 aminokwasów. Prowadzi to do nazwania tego wariantu „Bv8-podstawowy” (Bv8-basic, Bv8-b) (26). Prekursor PK2 jest zlokalizowany na ludzkim chromosomie 3 pary (24) i zakodowany jest przez 4 eksony, z trzecim eksonem podatnym na rozszczep (27).

PK1 i PK2 mają wspólne 44% aminokwasów i strukturę białkową. Mają one zachowaną sekwencję N-końcową (AVITGA), co jest konieczne dla aktywności tych białek. Mutacje tej sekwencji, poprzez wstawienie metioniny przed N-końcową alaniną, zastąpienie N-końcowej alaniny metioniną (28) lub delecje dwóch pierwszych aminokwasów (29) tworzą antagonistów receptora PK. Kolejną cechą prokinetycyn jest obecność dziesięciu cystein, które tworzą pięć dwusiarczkowych wiązań (19,30). Te dwusiarczkowe wiązania tworzą fałd w cząsteczce PK, niezbędny w funkcjonowaniu cząsteczki (30,31), gdyż nieprawidłowe jej zfałdowanie, mutacja w zakresie regionów bogatych w cysteiny powoduje inaktywację PK (28).

Prokinetycyny są ligandami dla dwóch blisko spokrewnionych receptorów błonowych podwójnego białka G (G – protein - coupled receptors - GPCRs), odpowiednio receptorów prokinetycyny 1 i 2 (PKR1 i PKR2). Receptory te mają

wspólne 85% aminokwasów zaś największą różnicę wykazują w N - końcowym odcinku (32,33). Ich sekwencja jest prawie identyczna w domenie przezbłonowej (34), co sugeruje, iż mechanizmy aktywacyjne są identyczne i że drobnocząsteczkowe analogi nie będą rozróżniać receptorów, tak jak jest to w przypadku PK1 i PK2. Powinowactwo tych molekuł do swoistych receptorów jest podobne, z PK2 wykazującym nieznacznie wyższe powinowactwo do obydwu receptorów.

Receptory prokinetycynowe 1 i 2 przyłączają się zarówno do białek błony komórkowej – hamującego cyklastę adenylanową Gi (35) i aktywującego fosfolipazę C Gq (32,34). W komórkach endotelium naczyń włosowatych kory nadnerczy wykazano zahamowanie aktywacji tych receptorów przez toksynę krztuścową (35), sugerując wiązanie receptorów z białkiem Gi. Dla kontrastu, w transferowanych komórkach jajnika chomika chińskiego aktywacja receptorów indukuje mobilizację wapnia i hydrolizę fosfoinozytolu (32-34), sugerując sprzężenie z białkiem Gq. Sygnalizacja poprzez te receptory wiąże się z aktywacją fosfolipazy C β i generacją diacyloglicerolu i fosforanu inozytolu, z potencjalnym uruchomieniem kaskady kinazy białkowej C. Jest to regulowane przez pozakomórkowe sygnały kinaz 1 i 2 (extracellular-signal-regulated protein kinases - ERK), Akt i syntetazę tlenku azotu (NOS) (32,35,36). Wykazano aktywację ERK 1 i 2 przez wiązanie kompleksu PK1-PKR1 (35).

1.5 Funkcja prokinetycyn i ich receptorów

Prokinetycyny pierwotnie znaleziono w przewodzie pokarmowym, gdzie wywoływały czynność skurczową mięśnia podłużnego jelita cienkiego u świnki morskiej (19), jakkolwiek PK2 nie wywołuje takiego efektu na przedżołądek i jelito grube (37). Prokinetycyny występują również w tkankach steroidogennych takich jak jądra (26,38), jajniki (39,40), łożysko (20,41) i nadnercza (35). Wykazano, iż w tych tkankach prokinetycyny biorą udział w kontroli przeżycia, proliferacji, różnicowaniu i indukcji fenestracji endotelium naczyń włosowatych (35). Efekt prokinetycyn na komórki endotelium wydaje się tkankowo specyficzny. Dla przykładu, w odróżnieniu od VEGF, prokinetycyny nie mają żadnego wpływu na komórki endotelium pochodzące z aorty, żyły pępowinowej lub rogówki (20).

Sugeruje się, iż prokinetycyny biorą też udział w hematopoezie i regulacji odpowiedzi immunologicznej (42,43). PK2 występuje w szpiku kostnym, oraz w komórkach krwi, w szczególności w monocytach, neutrofilach i komórkach dendrytycznych (43), podczas gdy PK1 jest znajdowana jest na błonach komórkowych limfocytów B i T, a także w różnych tkankach nacieczonych zapalnie (42). Badania *in vitro* sugerują, iż prokinetycyny promują przeżywalność i różnicowanie linii monocytarnych i granulocytarnych. Udział prokinetycyn w hematopoezie i odpowiedzi immunologicznej potwierdza ekspresja PK1 i PK2 na progenitorowych i dojrzałych komórkach krwi (43).

Wykazano ekspresję PK2 w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie najprawdopodobniej promuje ona przeżywalność neurocytów (44). Uważa się, iż PK2, wydzielana przez jądro nadwzrokowe (SCN - suprachiasmatic nucleus) i wykazująca okołodobowy profil oscylacji (45,46), funkcjonuje jako kluczowa molekula, odpowiedzialna za okołodobowe rytmy ruchowe (45,47). PK2 występuje również w opuszce węchowej gdzie jest odpowiedzialna za neurogenezę. Badania *in vitro* wykazują indukowaną PK2 migrację progenitorów neuronów z okolicy pod komorowej do opuszki (48). Co ciekawe, szczep myszy pozbawiony receptorów PKR2 wykazuje również znaczną atrofię układu rozrodczego, w tym jąder, jajników, macicy i pochwy, a także w gruczołach piersiowych. Badania immunohistochemiczne wykazują brak neuronów uwalniających GnRH w podwzgórzu tych zwierząt, co sugeruje, iż aktywacja PKR2 jest niezbędna do prawidłowej migracji tych neuronów z płyty węchowej do przodomózgowia podczas rozwoju (46). Fenotyp PKR2^{-/-} u myszy jest uderzająco podobny do zespołu Kallmanna u ludzi, zaś ostatnio wykazano mutacje PK2 i PKR2 u pacjentów cierpiących na ciężki zespół Kallmanna (49).

Prokinetycyny biorą także udział w odczuwaniu bodźców szkodliwych (bólowych) i regulacji odżywiania. Podawanie PK2 parenteralnie zmniejszyło próg pobudliwości na ból termiczny i mechaniczny u szczurów (50). Ponadto udowodniono, iż myszy pozbawione PKR1 wykazują zaburzone odczuwanie bólu zapalnego i nocycyptywnego na szkodliwe oddziaływanie gorąca (51). Dokomorowe podawanie PK2 lub jej homologu Bv8 u szczurów znacząco zaburzyło mechanizmy kontroli odżywiania (52).

1.6 Rola prokinetycyn i ich receptorów w rozrodzie u człowieka

Prokinetycyny mogą modulować funkcje rozrodcze u człowieka na różnych poziomach. Jak już wcześniej wspomniano czynniki te odgrywają ważną rolę w rozwoju systemu GnRH – zależnego, lecz mogą też działać bezpośrednio na narządy płciowe.

1.6.1 Układ płciowy męski

Prokinetycyny i ich receptory obecne są w jądrach i prostatie. W jądrach ekspresja PK1 występuje głównie w produkujących testosteron komórkach Leydiga, podczas gdy PK2 występuje jedynie w pierwotnych spermatocytach (26,38). Ekspresja PKR występuje w komórkach śródbłonna naczyń jąder (38). Co ciekawe w mysich jądrach PKR1 i PKR2 występują w równej ilości, podczas gdy w ludzkich jądrach ekspresja PKR1 jest wyższa niż PKR2 (38). Dokładna rola każdego z tych receptorów i wpływ różnych poziomów ich ekspresji pozostaje nadal niewyjaśniony. Uważa się, iż prokinetycyny, przez swoje spokrewnione receptory, funkcjonują jako regulatory fenestracji w naczyniach włosowatych jądra (38). W rezultacie mogą brać udział w modulacji transportu testosteronu z jąder na obwód i czynników regulujących w obrębie jądra.(53) Panuje pogląd, iż prokinetycyny pełnią rolę potencjalnych mediatorów odpowiedzi zapalnej podczas infekcji w obrębie jądra (38). Uważa się tak w oparciu o fakt, iż jądro jest miejscem reakcji zapalnej wywołanej przez infekcję bakteryjną bądź wirusową (54,55), zaś prokinetycyny biorą udział w wytworzeniu wrodzonej i nabytej odporności immunologicznej (43).

Ekspresja prokinetycyn i ich receptorów występuje także w prostatie (19,32,56), jednakże wykryto ją tylko w tkance przerostowej i rakowej gruczołu (56). Brak jak dotąd kompleksowych badań nad występowaniem i rolą prokinetycyn w tym narządzie.

1.6.2 Układ płciowy żeński

Prokinetycyny i ich receptory występują między innymi w jajniku i macicy (39,41,57). W prawidłowym jajniku, PK1 występuje w elementach komórkach linii płciowej i stromalnej (58), podczas gdy ekspresji PK2 nie można wykryć (39).

Podczas dojrzewania pęcherzyków ekspresja PK1 i VEGF są odwrotnie powiązane. W pęcherzykach primordialnych i pierwotnych występuje wysoka ekspresja EG-VEGF w komórkach ziarnistych, lecz nie występuje VEGF. Dojrzewające pęcherzyki wtórne zachowują silną ekspresję PK1, oraz słabą do umiarkowanej ekspresję VEGF. Jednakże w pęcherzykach antralnych EG-VEGF występuje na niskim poziomie w komórkach tekalnych, podczas gdy ekspresja VEGF jest bardzo silna w komórkach ziarnistych i umiarkowana w komórkach tekalnych. W dojrzałych pęcherzykach atretycznych ekspresja PK1 jest ponownie silna w pozostałych komórkach tekalnych, zaś ekspresja VEGF ponownie jest słaba (39). W ciałku żółtym ekspresja mRNA PK1 zwiększa się wraz z dojrzewaniem ciałka żółtego, podczas gdy ekspresja VEGF jest maksymalna już we wczesnej fazie lutealnej (39,40). Te odmienne wzory ekspresji sugerują, iż VEGF i PK1 pełnią różne role w naskularnych i niewaskularnych funkcjach ciałka żółtego. Działanie EG-VEGF w jajniku jest mediowane przez PKR1 i PKR2, obecne w tym narządzie (32,34). Jednakże ich precyzyjna lokalizacja nadal nie jest ustalona.

Badania *in vitro* sugerują, iż PK1 odgrywa rolę w proliferacji i przeżyciu komórek endotelium krwi ciałka żółtego (59). Ponadto zauważono, iż PK1 może stymulować ekspresję VEGF, co może wskazywać na pośredni udział EG-VEGF w angiogenezie ciałka żółtego (60).

W nieciążarnej macicy, PK1 jest zlokalizowany w nabłonku gruczołowym, jak też w komórkach endotelialnych i stromalnych endometrium, głównie w warstwie czynnościowej (57). Jego ekspresja występuje również w komórkach endotelialnych i myometrium (57). Ekspresja EG-VEGF zmienia się dynamicznie przez cykl miesięczkowy, z niskimi poziomami ekspresji podczas wczesnej fazy folikularnej, następnie ze stopniowym wzrostem, który osiąga szczyt w środku fazy lutealnej i stopniowym spadkiem ekspresji w późnej fazie lutealnej (61). PK2, PKR1 i PKR2 również występują w różnych przedziałach komórkowych endometrium, ale nie wykazują czasowych zmian ekspresji swojego mRNA podczas cyklu (57). Ekspresja EG-VEGF w endometrium występuje w wieku reprodukcyjnym, ale nie występuje po menopauzie. Wynika to stąd, iż występowanie PK1 jest modulowane przez estrogeny i progesteron, które zwiększają jego ekspresję w endometrium (57,61).

Dalszego dowodu na rolę prokinetycylnych w funkcjach rozrodczych dostarczają pozbawione PKR2 myszy, u których występuje hipoplazja przewodu rodowego (46).

Fenotyp ten został wyjaśniony brakiem neuronów GnRH w podwzgórzu tych zwierząt, nie wyklucza to jednak bezpośredniej roli braku PKR2 w atrofii u tych zwierząt. Myszy pozbawione PK2 i PKR1 nie wykazują nieprawidłowości w obrębie układu rozrodczego (46,48).

1.7 Potencjalna rola prokinetycyn w ciąży

Implantacja

Tylko ekspresja PK1 osiąga szczyt w środkowolutealnym „okienku implantacyjnym”, z lokalizacją potwierdzoną w badaniach immunohistochemicznych w nabłonku gruczołowym endometrium, komórkach podścieliska, endotelium naczyń myometrium, jak też w mięśni gładkim (57,61,62). Przekrwienie i „przeciekanie” endotelium w miejscu implantacji są jednym z jej pierwszych objawów (63,64). W oparciu o to postawiono hipotezę, iż PK1 poprzez indukcję fenestracji i przepuszczalności w mikrokrażeniu może sprzyjać implantacji (57,61).

Prokinetycyny i jednostka „płodowo-łożyskowa”

Szczyt ekspresji PK1 i PKR1 w trofoblaście przypada pomiędzy 8 a 19 tygodniem ciąży, z PK1 zlokalizowanym głównie w syncytiotrofoblaście i minimalnie w cytotrofoblaście. PK1 nie występuje natomiast w trofoblaście pozakosmkowym (41). Lokalizacja ta jest odmienna od lokalizacji VEGF i jego receptorów, które występują głównie w trofoblaście pozakosmkowym i cytotrofoblaście (41,66,67). PK1 i VEGF występują natomiast wspólnie, począwszy od szóstego tygodnia ciąży, w płodowych komórkach Hofbauera znajdujących się w mezenchymie kosmków łożyska. PK2 i PKR2 nie występują w trofoblaście w pierwszym trymestrze ciąży, za wyjątkiem okresu między 8 a 10 tygodnie czasu trwania ciąży, kiedy wykrywa się je w niskich stężeniach. Ekspresja PKR2 rośnie w płodowych komórkach endotelium naczyń krwionośnych po 12 tygodniu czasu trwania ciąży (41). Pomimo iż ekspresja prokinetycyny 1 i prokinetycyny 2 (przy czym PK2 w znacząco niskich stężeniach) występuje w łożysku w trzecim trymestrze ciąży, jak dotąd nikt nie badał ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej (20,24,38,68). Podobnie, nie ma badań odnośnie ekspresji prokinetycyn lub ich receptorów w jednostce „płodowo-łożyskowej” w drugim trymestrze ciąży.

Wysunięto niedawno hipotezę, iż PK1 i PKR1 odgrywają ważną rolę w rozwoju łożyska, głównie dlatego, iż szczyt ich ekspresji przypada na kluczowy okres hipoksji w rozwoju łożyska (8-10 tydzień czasu trwania ciąży), przed ustaleniem krążenia kosmówkowego (41). Za regulacją hipoksemiczną PK1 i PKR1 przemawia też obecność miejsca wiązania czynnika indukowanego hipoksją (hypoxia-inducible factor, HIF-1 α) w odcinku promotora zarówno PK1 jak i PKR1. Jednakże czynniki takie jak HCG czy progesteron (57,61), o których wiadomo iż regulują ekspresję PK1, również są wydzielane w tym okresie ciąży i mogą brać udział w regulacji PK1. Silna ekspresja PK1 w syncytiotrofoblaście, o którym wiadomo iż jest endokrynnym komponentem łożyska, sugeruje iż ekspresja ta może być związana ze stopniem zróżnicowania łożyska. Uważa się zatem, iż PK1 może być czynnikiem wzrostu łożyska (41).

1.8 Rola prokinetycyn w zaburzeniach układu rozrodczego

Kilka badań sugeruje, iż EG-VEGF pełni rolę w patologiach układu rozrodczego. Samson i współpracownicy wykazali (53), iż PK1 występuje w nowotworach komórek Leydiga. Zwiększone mikrokążenie obserwowane w guzach tego typu w porównaniu z innymi typami raka jądra, takimi jak nasieniak, sugeruje że PK1 odgrywa rolę w rozwoju tego nowotworu poprzez wzmożenie tworzenia naczyń (53). Ponadto, EG-VEGF występuje w niskich stężeniach w komórkach nabłonka gruczołowego i w łagodnej przerostowej tkance prostaty, zaś większe stężenia PK1 znajduje się w raku prostaty wraz z postępem choroby (56). PK1 zaczyna się zatem brać pod uwagę jako marker progresji choroby. Także ekspresja mRNA PK2 jest obserwowana w tkance nowotworowej w większej ilości w porównaniu z tkanką zdrową, co sugeruje udział obu prokinetycyn w tej patologii (56).

Jak dotąd nie wyjaśniono roli prokinetycyn w nowotworach układu rozrodczego żeńskiego. W rakach endometrium, czy jajnika ekspresja PK1 jest mniejsza lub jej brak w porównaniu z tkanką zdrową (58,61). Sugeruje się jednak udział EG-VEGF w rozwoju raka jądra, ponieważ znaleziono go w nie-nowotworowych komórkach podścieliska, a także w naciekowych limfocytach T (58).

Przerost i nadmierna waskularyzacja komórek podścieliska są kluczowym czynnikiem w rozwoju zespołu policystycznych jajników (polycystic ovarian syndrome PCOS). W zespole tym wykryto silną ekspresję w jajnikach VEGF i PK1 (39).

Wykryto silną korelację pomiędzy ekspresją EG-VEGF a hyperplazją i angiogenezą w zespole PCOS, co może sugerować rolę PK1 w patogenezie tego zespołu (39). Dodatkowo ustalono, że PK1 wespół z VEGF może pełnić rolę w mediowaniu rozregulowanej przepuszczalności naczyniowej, jaka występuje w zespole hyperstymulacji jajników (OHSS- ovarian hyperstimulation syndrome) (39).

2.0. Założenia i cele pracy

Patofizjologia preeklampsji (PE) pozostaje nieznana, choć stwierdza się łożysko relatywnie hipoksyiczne, zmienione zapalnie z okluzją naczyń. Najnowsze dane wskazują na początek PE w pierwszym trymestrze ciąży, w wyniku nieprawidłowej adaptacji macicznego układu krążenia i „jednostki płodowo-łożyskowej”. Zmiany w ekspresji białek po rozpoznaniu preeklampsji mogą być raczej przyczyną niż konsekwencją jej rozwoju. Sugeruje się, iż prokinetycyna 1 (PK1) i receptor prokinetycyny 1 (PKR1) mogą brać udział w rozwoju PE poprzez swą ekspresję w kluczowych niedokrwiennych momentach rozwoju łożyska w pierwszym trymestrze ciąży. Celem pracy jest wykazanie udziału PK1 i PKR1 w rozwoju stanu przedrzucawkowego. Cel osiągnięto poprzez:

1. Ocenę ekspresji mRNA PK1 i PKR1 w myometrium i łożysku ciężarnych zdrowych i ciężarnych z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym.
2. Ocenę poziomu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na stymulację ligandem – EG-VEGF - w myometrium i łożysku ciężarnych zdrowych i ciężarnych z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym.
3. Immunohistochemiczną ocenę ekspresji białka PK1 i PKR1 w myometrium i łożysku ciężarnych zdrowych i ciężarnych z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym.
4. Zbadanie zależności między poziomem ekspresji PK1 i PKR1 w myometrium i łożysku kobiet ciężarnych, a występowaniem stanu przedrzucawkowego.
5. Zbadanie zależności między poziomem sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w odpowiedzi na ligand (PK1), a występowaniem stanu przedrzucawkowego.
6. Zbadanie zależności występowania białka PK1 i receptora PKR1 w myometrium i łożysku ciężarnych, a występowaniem stanu przedrzucawkowego.

3.0 MATERIAŁ I METODYKA

3.1 Materiał

3.1.1 Pacjenci

Badanie odbywało się w Medical Research Council, Human Reproductive Sciences Unit w Edynburgu i następnie było kontynuowane w Klinice Perinatologii i Ginekologii, Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zaprojektowano dwie grupy badane:

- Ciężarne pacjentki u których wystąpił stan przedrzucawkowy (preeklampsja)
- Ciężarne, zdrowe kobiety (grupa kontrolna)

Preeklampsję definiowano jako wystąpienie nadciśnienia tętniczego (ciśnienie tętnicze powyżej 140/90, mierzone przynajmniej dwukrotnie w odstępie 6 godzin, po 10 minutowym odpoczynku), a także białkomocz rzędu 300 mg/l (lub ++ w teście paskowym, lub więcej niż 0,5 g/dobę, lub ACR (stosunek albuminy/kreatynina) >30mg/mmol). Grupa kontrolna składała się z pacjentek będących w ciąży o niepowikłanym przebiegu, zaś cięcia cesarskie wykonywane były głównie z powodów elektywnych.

W badaniu udział wzięło 40 pacjentek, w tym 19 pacjentek w grupie ciąż powikłanych stanem przedrzucawkowym i 21 pacjentek w grupie ciąż o przebiegu prawidłowym.

3.1.2. Materiał tkankowy i zastosowane odczynniki

Badanym materiałem były fragmenty płyty łożyska i fragment myometrium, obydwa w przybliżeniu 3 cm długości i 2 cm szerokości. Próbkę pobierano podczas cięć cesarskich wykonywanych w trzecim trymestrze ciąży, od pacjentek które wyraziły zgodę na udział w badaniu. Metodyka pracy uzyskała akceptację Scottish

Council on Human Bioethics w Edynburgu, a także Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu a pobieranie materiału przebiegało zgodnie z rekomendacjami odnośnie postępowania z materiałem biologicznym.

Materiał tkankowy bezpośrednio po pobraniu dzielono na trzy części. Blok tkankowy wielkości 5 x 5 mm umieszczano w roztworze RNAlater, celem dalszej ekstrakcji RNA przy pomocy zestawu RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA), zgodnie z zaleceniami producenta i następnie poddano ilościowej ocenie PCR. Stężenie RNA było oznaczane przy pomocy spektrofotometru, zaś jakość RNA potwierdzano na żelu agarozowym. Wykonano oznaczanie Real-time PCR, poprzez monitorowanie w czasie rzeczywistym wzrostu fluorescencji barwnika SYBR Green przy pomocy systemu 7900 HT Fast real-Time PCR firmy Iscience.

Kolejny blok tkankowy wielkości 10 x 10 mm umieszczano w 4% paraformaldehydzie i utrwalano w temperaturze 4°C przez 24 godziny, następnie zatapiano w postaci bloczków parafinowych. Seryjne skrawki o grubości około 5 µm skrojone zostały na szkiełka Super Frost/Plus, tak utworzony preparat histologiczny poddawano analizie immunohistochemicznej.

Pozostały blok tkankowy umieszczano w roztworze RPMI (Sigma, Poole, UK) zawierającym 2 mm l-glutaminy, 100 IU penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny i transportowano do laboratorium celem wykonania hodowli tkankowej, zaś następnie oceniano proces sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.

Zebrałem materiał tkankowy (fragmenty łożyska i myometrium) od 40 pacjentek. Na skutek niekorzystnych zdarzeń w procesie obróbki materiału, nie wszystkie próbki kwalifikowały się do dalszej analizy zgodnie z metodyką pracy. W ocenie sygnalizacji wewnątrzkomórkowej przeanalizowano 15 próbek łożyska i 14 próbek myometrium z grupy ciąż powikłanych stanem przedrzucawkowym, oraz 19 próbek myometrium i 20 próbek łożyska z grupy ciąż o przebiegu prawidłowym. W ocenie ekspresji mRNA przeanalizowano 17 próbek myometrium i łożyska z grupy ciąż powikłanych stanem przedrzucawkowym, oraz 20 próbek myometrium i łożyska z grupy ciąż o przebiegu prawidłowym. Badanie immunohistochemiczne przeprowadzono dla 19-tu próbek myometrium i łożyska z grupy ciąż powikłanych stanem przedrzucawkowym, oraz 20-tu próbek myometrium i łożyska z grupy ciąż o przebiegu prawidłowym.

3.2. Metodyka

3.2.1. Ocena sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

Fragmenty łożyska i myometrium umieszczano w świeżo przygotowanym roztworze RPMI (Sigma, Poole, UK) zawierającym 2 mM l-glutaminy, 100 IU penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny i inkubowano przez noc w cieplarni w temperaturze 37°C i powietrzu o stężeniu CO₂ równym 5%. Następnego dnia preinkubowaną tkankę rozdrabniano i homogenizowano w roztworze buforu lizującego [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% dezoksychoalan sodu, 0.1% dodecylosiarczan sodu, 1% Triton X-100, 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu, 5 µg/ml leupeptyny, 5 µg/ml aprotyniny] pierwotnie przy pomocy homogenizatora Tissue Lyser Qiagen firmy Retsch, a w Poznaniu w ciekłym azocie, do czasu aż próbki były całkowicie jednorodne. Po odwirowaniu określano stężenie białek w supernatancie przy pomocy BSA (frakcja V; Sigma, St. Louis, MO) jako standardu. Łożyskowe i myometrialne białka elektroforetycznie rozdzielono na żelach NuPAGE 4-12% Novex Bis-Tris Gels firmy Invitrogen, a następnie elektrycznie przeniesiono na błony z 0.25-µm difluorku poliwinylidenu. Błony płukano w 0.1% PBS-Tween 20 (PBS-T) i blokowano w buforze blokującym firmy Odyssey przez 1 godzinę. Następnie błony inkubowano najpierw w przeciwciele przeciwko pERK (pERK rabbit phospho p44/42 MAP Kinase by Cell Signalling®), a potem przez 60 minut w przeciwciele przeciwko tERK (tERK mouse p42 MAP Kinase by Cell Signalling®). Po kilkukrotnym płukaniu w roztworze PBS Tween i PBS błony były skanowane przy pomocy LI-COR Biosciences Odyssey Infrared Imaging System. Mierzono intensywność prążków immunoreaktywnych, zaś obraz był poddawany analizie komputerowej przy pomocy oprogramowania LI-COR Biosciences Odyssey. Analizowano średnią gęstość pikseli dla każdego paska, aby otrzymać względną wartość jednostek dla fosforylacji białek sygnalizujących ERK.

3.2.1.1. Oznaczanie stężenia białek w supernatancie metodą Lowry

1. Przygotowanie standardu

- a. Oznaczanie 1,5 ml próbówki Eppendorfa numerami od 1 do 9
 - b. Dodawanie 60 μ l wody destylowanej do próbówek 1-8 i 160 μ l wody destylowanej do próbówki 9
 - c. Dodawanie 40 μ l BSA w stężeniu 1mg/ml do próbówki 9 i wymieszanie
 - d. Dodawanie 60 μ l z próbówki 9 do 8 i mieszanie; zmienianie końcówki pipety
 - e. Dodawanie 60 μ l z próbówki 8 do 7 i mieszanie; zmienianie końcówki pipety
 - f. Dodawanie 60 μ l z próbówki 7 do 6 i mieszanie; zmienianie końcówki pipety
 - g. Dodawanie 60 μ l z próbówki 6 do 5 i mieszanie; zmienianie końcówki pipety
 - h. Dodawanie 60 μ l z próbówki 5 do 4 i mieszanie; zmienianie końcówki pipety
 - i. Dodawanie 60 μ l z próbówki 4 do 3 i mieszanie; zmienianie końcówki pipety
 - j. Dodawanie 60 μ l z próbówki 3 do 2 i mieszanie
 - k. W próbówce 1 pozostawała sama woda destylowana.
2. Rozcieńczanie próbki (supernatant otrzymany po homogenizacji) w H₂O, aby otrzymać więcej niż 50 μ l rozcieńczonej próbki na badanie. Mieszanie próbki.
 3. Dodawanie 25 μ l standardu podwójnie do 96 studzienkowej płytki w kolejności od 1 do 9.
 4. Dodawanie 25 μ l rozcieńczonej próbki podwójnie do tej samej płytki.

5. Wymieszanie reagentów A i S w stosunku 500 μ l do 10 μ l aby uzyskać wystarczającą ilość do dodania 25 μ l do każdej studzienki.
6. Dodawanie 25 μ l mieszaniny reagentów A i S do każdej studzienki.
7. Dodawanie 100 μ l reagentu B do każdej studzienki.
8. Pozostawianie płytkę na 15 minut (wartości absorbancji są stabilne przez minimum 1 godzinę).
9. Odczytywanie płytki w długości fali 690 nm na czytniku.
10. Wylizywanie rezultatu dokonano przy pomocy programu AssayZap.

3.2.1.2. Protokół badania Western Blotting

1. Zanurzenie błony z 0.25- μ m difluorku poliwinylidenu po transferze w PBS na kilka minut.
2. Blokowanie błony w buforze blokującym firmy Odyssey przez 1 godzinę.
3. Pierwszorzędowe przeciwciało rozcieńczano w buforze blokującym firmy Odyssey, w stosunku 1:2000 z dodaniem 0,2% roztworu Tween-20 celem obniżenia tła fluorescencji błony.
4. Inkubowanie błon całkowicie zanurzonych w roztworze pierwszorzędowego przeciwciała przez 60 minut w temperaturze pokojowej na wytrząsarce.
5. Następnie 4 razy płukano błony na wytrząsarce, za każdym razem przez okres 5 minut, w temperaturze pokojowej w buforze PBS z dodatkiem 0,1% Tween-20.
6. Rozpuszczanie znakowanego fluorescencyjnie drugorzędowego przeciwciała w blokującym buforze firmy Odyssey w rozcieńczeniu 1:10000. Dodawano Tween-20 do roztworu celem obniżenia tła fluorescencji błony.
7. Inkubowanie błon na wytrząsarce w roztworze drugorzędowego przeciwciała przez 60 minut, w temperaturze pokojowej. Inkubacja odbywała się w ściśle zamkniętych pojemnikach, z dala od światła.
8. Następnie 4 razy płukano błony na wytrząsarce, za każdym razem przez okres 5 minut, w temperaturze pokojowej w buforze PBS z dodatkiem 0,1% Tween-20. Płukano w ściśle zamkniętych pojemnikach, z dala od światła.
9. Spłukiwanie membrany roztworem PBS celem usunięcia nadmiaru Tween-20.
10. Membrany skanowano na fosfoimadżerze firmy Odyssey w długościach fali odpowiednio dla pERK i dla tERK.

3.2.1.3. Preparatyka próbek myometrium i łożyska do metody Western Blotting

Część materiału opracowywana w Poznaniu, w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, analizowana była przy pomocy fosfoimadżera Fuji FLA-5100.

Preparatyka tkanki do momentu homogenizacji tkanki przebiegała podobnie.

Następnie protokół badania przebiegał jak poniżej.

1. Ucieranie tkanki w ciekłym azocie, przechowywanie w temperaturze -80 st.
2. Homogenizowanie tkanki w 100 μ l buforu 2 x SB z koktajlem inhibitorów proteaz (GE Healthcare). Na 10 próbek przygotowano 1100 μ l buforu (1189 μ l 2x SB + 11 μ l koktajlu).
3. Wirowanie próbki przez 10 minut
4. Poddawanie próbki działaniu ultradźwięków 3 x przez czas 30 sekund w lodzie.
5. Denaturowanie próbki w 70 st. Celsjusza przez 6 minut.
6. Wirowanie próbki przez 10 minut w 13,2 tys. obrotów na minutę (rpm).
7. Zebranie supernatantu, przeniesienie do lodu.
8. Pomiar stężenia białka zestawem firmy GE Healthcare (do pomiaru pobrano 5 μ l natantu i dodano 5 μ l wody aby rozcieńczyć SB do 1x).
9. Odmierzanie 40 μ g białka, rozcieńczanie tą samą objętością wody, dodawanie 0,3 μ l BPB i wyrównywanie objętości wszystkich prób stosując 1xSB (maksymalna objętość kieszonek żeli NuPage 1,5mm 10 well to 37 μ l)
10. Przygotowywanie buforu elektrodowego: 25 ml Running Buffer 20x + 475 ml wody.
11. Z żeli NuPage wyjmowano grzebienie, odklejano plaster i przemywano dokładnie wodą wraz z kieszonkami.
12. Zamontowywanie żeli w aparacie, zalewanie buforem, przepłukiwanie kieszonek buforem.
13. Nakładanie preparatów. Warunki elektroforezy: 15 minut 30 mA, do końca 60 mA (na dwa żele).
14. W trakcie trwania elektroforezy (około 2h) przygotowywanie 8 bibułek typu Whatmann i 2 fragmentów membrany PVDF o wymiarach 5x7cm. Przygotowywanie 2x stężony bufor do transferu: 10 ml 20x Transfer Buffer + 10 ml MeOH – dopełnianie do 100ml wodą.
15. Przygotowywanie 3 plastikowych pudełek: z MeOH (metanolem), wodą i buforem do transferu. Zanurzanie PVDF w MeOH (metanolu) na 30", następnie przenoszenie do wody na 1 minutę, a następnie do buforu do transferu.
16. Po zakończonej elektroforezie rozkładanie płyty, pozostawianie żelu na jednej z płyt.
17. Na bloterze Semi-Dry (Biorad) układanie zwilżonych: 2 whatmannów, membrany, żelu i 2 whatmannów, usuwanie pęcherzyków powietrza, nalewanie odrobiny buforu i zamykanie aparatu. Warunki transferu: 15 V 25' (natężenie

obserwowane: 0,6 A na starcie, w trakcie transferu spada do około 0,4 A na końcu).

18. Rozkładanie kanapek, membrany inkubowano 5 minut w TBS, żele barwiono CBB-G250.
19. Blokowanie TBST z 4% BSA przez 1h
20. Płukanie blotów w TBST 3x 5'
21. Inkubacja w pierwotnym przeciwciele w TBST z 4% BSA (przez noc w temperaturze 4 st. C) p44/42 MAP kinase antibody in rabbit 1: 1000 czyli 15 μ l/15ml phospho- p44/42 MAPK in mouse 1:2000 czyli 7,5 μ l/15ml (inkubacja w jednej kuwecie)
22. Płukanie blotów w TBST 3x 5 minut
23. Wtórne przeciwciała w TBST z 4% BSA przez okres 1 godziny, Anti-rabbit IgG-Alexa Fluor 532nm
24. Anti-mouse IgG-Alexa Fluor 635nm. Oba w stosunku 1:5000 czyli 3 μ l/15ml.
25. Płukanie blotów w TBST 3x 5 minut
26. Skanowanie: Phosphoimager Fuji FLA-5100
27. Laser dla Alexa Fluor 532 – 532nm; Filter LPG
28. Laser dla Alexa Fluor 635 – 635nm; Filter LPR
29. Rozdzielczość (wielkość piksela): 10 μ m, Woltaż: 600 V

3.2.1.4. Skład mieszanin użytych w badaniu Western Blot

2 x SB 3ml

125mM Tris/HCl pH 6,8 (750 μ l 0,5M Tris/HCl pH 6,8)

4 % SDS (1,2ml 10% SDSu)

20% glicerol (600 μ l)

100 mM DTT (0,0462 g)

dopełniano do 3ml wodą (około 430 μ l)

TBS pH 7,55

2,42 g Trisu; 8 g NaCl dopełniano do litra wodą

TBST

do 297 ml TBS u dodać 3ml 10% Tween-20 (końcowe stężenie 0,1%).

TBST z BSA

2 g BSA rozpuszczano w 50ml TBST (20ml na blokowanie i po 15ml na oba przeciwciała).

3.2.2. Metoda oznaczania ekspresji mRNA PKR1 i PK1 (EG-VEGF) w tkankach łożyska i mięśniówki macicy.

Pobrane tkanki zabezpieczono w buforze RNALater (Qiagen, Ambion) do czasu izolacji RNA.

Izolację RNA przeprowadzono za pomocą zestawu Rneasy Mini Kit (Qiagen), według wskazówek producenta. Do homogenizacji materiału użyto kolumn homogenizacyjnych QiaShredder (Qiagen). W trakcie izolacji przeprowadzono eliminację DNA zestawem odczynników RN-ase Free Dnaze Set (Qiagen). Roztwór wodny wyizolowanego RNA zamrożono w -20°C .

Odwrotną transkrypcję przeprowadzono za pomocą odczynników DYnamo Syber GreenTM 2-step qPCR (Finnzymes, Finlandia). Zgodnie z protokołem producenta, w reakcji użyto 1 μl wyizolowanego wcześniej RNA, zawierającego <1 μg RNA, oraz starteru oligo dT dla mRNA.

W tabeli 1 pokazano skład mieszaniny do cDNA, zaś w tabeli 2 protokół amplifikacji Cyclerelem.

Tab. 1 Skład mieszaniny do cDNA.

Składnik	Ilość	Objętość/20µl reakcji	Komentarz
RT Bufer	2x	10 µl	RT Bufer zawierający dNTPs i MgCl ₂
Losowa mieszanina zestawów primerów	300 ng/µl	1 µl	Można użyć alternatywnie primera oligodT lub primera specyficzny do produktu
Wzorcowy RNA		X µl	Max 1µg
M-MuLV RNaza H* Odwrotna transkryptaza		2 µl	Łącznie z inhibitorami RNazy
H ₂ O wolne od RNazy		X µl	Dodać wody do końcowej objętości reakcji
Całkowita objętość		20 µl	

Tab. 2 Protokół amplifikacji Cyclerem

Krok	Cel	Temperatura	Czas	Komentarz
1	Wydłużanie primera	25°C	10 min	Krok ten jest niepotrzebny jeśli używamy primerów specyficznych dla genu.
2	Synteza cDNA	37°C	30 min	Większość docelowych DNA można syntetyzować w temperaturze 37°C. Jeśli jest taka potrzeba temperatura reakcji może się wahać pomiędzy 37 - 48°C. Czas inkubacji można wydłużyć do 60 min w przypadku długich lub rzadkich transkryptów.
3	Zakończenie reakcji	85°C	5 min	Inaktywacja M-MuLV zapobiega hamowaniu przez nią reakcji qPCR.
4	Chłodzenie próbki	4°C	Zatrzymane	Opcjonalnie

W tabelach zawarte są skład mieszaniny reakcyjnej Tab.3 i profil termiczny reakcji odwrotnej transkrypcji Tab. 4.

Ocenę ilościową poziomu transkryptu dla PKR1 i EG-VEGF przeprowadzono metodą real-time PCR. Startery do reakcji zostały zaprojektowane za pomocą programu Primer3 na podstawie sekwencji mRNA, w formacie FASTA uzyskanych z bazy NCBI-EntrezGene. Parametry termodynamiczne zostały zweryfikowane za pomocą programu OligoAnalyzer1.2, a specyficzność starterów porównano w bazie BLAST. Temperatura topnienia starterów wyznaczona została za pomocą kalkulatora Finnzymes i posłużyła jako punkt wyjścia do wyznaczenia temperatury annealingu (tworzenia komplementarnej sekwencji RNA przy pomocy wiązań wodorowych), dla poszczególnych transkryptów. Wydajność reakcji i krzywą wzorcową wyznaczono za pomocą reakcji qPCR, dla której matrycą było sześć kolejnych rozcieńczeń liniowej formy produktu specyficznego dla zastosowanych starterów. Ilość transkryptu oceniano w odniesieniu do wewnętrznego markera – genu o konstytutywnej ekspresji

GAPDH i α aktyny. Reakcję prowadzono za pomocą odczynników DYNAMO SYBER Green™ 2-step qPCR (Finnzymes, Finlandia), zgodnie z zaleceniami producenta.

Skład mieszaniny reakcyjnej zawiera Tabela 3:

Tab. 3 Składniki mieszaniny reakcyjnej.

Składniki (w kolejności dodawania)	Objętość w 20 μ l całkowitej objętości reakcji	Końcowe stężenie	Komentarz
Master mix	10 μ l	1x	Wymieszaj dokładnie
Primer mix (w ddH ₂ O)	1 μ l	0,5 μ M fwd 0,5 μ M rev	Jeśli trzeba wymiareczkuj od 0,3 do 1 μ M
Wzorcowy cDNA	1 μ l		Nie przekrocz 10% końcowej objętości reakcji. Można wykonać serię rozcieńczeń w reakcji syntezy cDNA, aby zoptymalizować ilość
ddH ₂ O	7 μ l		Dodaj wody destylowanej do końcowej objętości reakcji
Całkowita objętość	20 μ l		

Tab. 4 Profil termiczny reakcji:

Cel	Temp	Czas	Komentarz
Początkowa denaturacja	95°C	15 min	Krok ten jest konieczny do aktywacji gorącego startu polimerazy DNA i do zdenaturowania wzorcowego cDNA
Denaturacja	94°C	10s	
Annealing	59°C	20s	5°C poniżej niższego primera T _m , użyj gradientu stężeń do optymalizacji wyniku
Wydłużenie	72°C	30s	
Uzyskiwanie danych			Otrzymywanie danych fluorescencji
Opcjonalnie			T _m (primer-dimer) < X < T _m (produkt)
Uzyskiwanie danych (opcjonalnie)	78°C GAPDH, α-actin, 80°C PK1, PKR1		Otrzymywanie danych fluorescencji w wyższej niż wydłużanie temperaturze zabezpiecza przed błędami, w przypadku jeśli obserwuje się układy primery-dimery
Ilość cykli	45 cycles, step 3-8		
Końcowe wydłużanie (opcjonalnie)	72°C	5-10 min	Końcowe wydłużanie zapewnia, iż wszystkie produkty amplifikacji są w formie podwójnie skręconej spirali przed procedurą krzywej stapiania
Krzywa stapiania	72 - 95°C	20 min czas nachylenia dla większości sprzętu	Weź pod uwagę, iż ustawienia krzywej stapiania mogą się różnić w zależności od użytego sprzętu do oznaczania real-time PCR. Sprawdź dokładne dane ustawień w instrukcji obsługi używanego sprzętu.

Reakcje przeprowadzono podwójnie dla każdej z prób. Uzyskane wartości CT dla poszczególnych prób zostały odniesione do wartości krzywej wzorcowej. Relatywną ekspresję wyznaczono dzieląc wartości odczytane z krzywej wzorcowej dla transkryptów PKR1 i EG-VEGF przez wartości dla genów referencyjnych GAPDH i α-aktyny.

3.2.3. Oznaczenie immunohistochemiczne lokalizacji receptora (PKR1) i ligandu (PK1) w tkankach myometrium i łożyska

Do badania pobrano 38 wycinków z łożyska i 37 wycinków ze ściany macicy, po połowie z każdej z grup badanych. Materiał poddano obróbce histologicznej i zatopiono w bloczkach parafinowych. Z każdego bloczka skrojono po 5 skrawków, celem naklejenia na szkiełka. Z każdej grupy zabarwiono po jednym szkiełku metodą H+E (hematoksylina i eozyna). Na pozostałych skrawkach wykonano reakcje immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał anty PK1 i PKR1 odpowiednio firmy Phoenix Pharmaceuticals i Lifespan Biosciences w rozcieńczeniach 1:200 (PK1) i 1:300 (PKR1). Łącznie wykonano 75 badania. Immunoreakcje prowadzono z użyciem EnVision TM+ - System HRP.

Etapy reakcji immunohistochemicznej:

1. Odparafinowanie (w przypadku preparatów parafinowych) i nawodnienie preparatów w ksylenie i szeregu alkoholi o malejących stężeniach (2x100%, 90%, 85%, 80%, 70%)
2. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 minut
3. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H₂O₂ w wodzie destylowanej
4. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 minut
5. Płukanie w wodzie destylowanej – 10 minut
6. Inkubacja w normalnej surowicy koziej (stężenie 1:20, Firmy DAKO)
7. Inkubacja ze swoistymi przeciwciałami – 18 godzin w temperaturze 4⁰C, a następnie przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej
8. Płukanie w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS-phosphate-buffered saline) – 3x3 minuty.
9. Inkubacja z biotynylowanymi przeciwciałami (LSAB2, DAKO) – 20 minut
10. Płukanie w PBS – 3x3 minuty

11. Inkubacja z kompleksem streptawidyna - biotylinowana peroksydaza (LSAB2, Firmy DAKO) – 20 minut
12. Płukanie w PBS – 3x3 minuty
13. Inkubacja z 3-3' diaminobenzydyną (DAB, Firmy DAKO) – 7 minut
14. Płukanie w wodzie bieżącej – 10 minut
15. Płukanie w wodzie destylowanej – 10 minut
16. Odwodnienie w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 85%, 90%, 95%, 2x100%) i ksylenie
17. Zamknięcie preparatów za pomocą balsamu kanadyjskiego i szkiełek nakrywkowych.

Za każdym razem przeprowadzano również kontrolę negatywną polegającą na pominięciu pierwotnego przeciwciała.

4.0 Wyniki

4.1. Analiza rozkładu wieku i rodności w grupie badanej i kontrolnej

Struktura wiekowa w populacjach badanych przedstawiała się następująco: w grupie pacjentek z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym średni wiek wynosił 29 +/- 6 lat, zaś w grupie pacjentek z ciąż przebiegających prawidłowo średni wiek z chwilą badania wynosił 31 +/- 5 lat.

Struktura rodności w grupie badanej przedstawiała się następująco: 60% pacjentek było nieródkami, zaś 40% wieloródkami, w grupie kontrolnej 23% pacjentek było w pierwszej ciąży, zaś 77% pacjentek było wieloródkami.

4.2. Wyniki oceny ekspresji mRNA PK1 i PKR1 w myometrium i łożysku

Tabela 5 przedstawia wartości ekspresji mRNA PK1 i mRNA PKR1 w łożysku i myometrium (myo), w grupie badanej i kontrolnej (CTRL). Porównywałem grupy o rozkładzie asymetrycznym, zatem w analizie statystycznej porównywałem mediany i percentyle, czyli 3 ostatnie kolumny tabeli, używając testów nieparametrycznych. Wartości liczbowe ekspresji odnoszą się do wartości referencyjnej jaką była ekspresja tych czynników w normalnym, wewnątrzmacicznym (eutropowym) endometrium, w II fazie cyklu.

Tab. 5 Wartości ekspresji mRNA PK1 i mRNA PKR1 w łożysku i myometrium (myo), w grupie badanej i kontrolnej (CTRL).

Grupa	n	Średnia	Odch. Std.	Błąd Std.	Max	Min	Mediana	25%	75%
Łožysko CTRL PKR1	20	3,22	9,24	2,07	41,43	0,04	0,48	0,11	1,63
Łožysko PKR1	12	0,79	0,44	0,13	1,53	0,13	0,93	0,39	1,02
Myo CTRL PKR1	13	3,34	6,27	1,74	20,07	0,03	0,29	0,13	2,65
Myo PKR1	11	0,33	0,34	0,10	1,23	0,05	0,22	0,11	0,37
Łožysko CTRL PK1	20	5,66	10,40	2,33	47,68	0,08	2,04	1,33	5,93
Łožysko PK1	12	1,06	1,44	0,42	5,22	0,11	0,58	0,17	1,27
Myo CTRL PK1	13	3,87	10,08	2,80	36,41	0,08	0,34	0,18	0,81
Myo PK1	11	2,48	6,89	2,08	23,24	0,03	0,36	0,16	0,73

W poniższe tabelach i rycinach porównuję grupy badaną i kontrolną, pod kątem istotności statystycznej (p) różnic ekspresji PK1 i PKR1 wyrażonych medianą. Porównałem następujące grupy:

- Łožysko PKR1 grupa kontrolna (CTRL) versus badana (Tabela 6 i Rycina 1)
- Myometrium PKR1 grupa kontrolna (CTRL) versus badana (Tabela 7 i Rycina 2)
- Łožysko PK1 grupa kontrolna (CTRL) versus badana (Tabela 8 i Rycina 3)

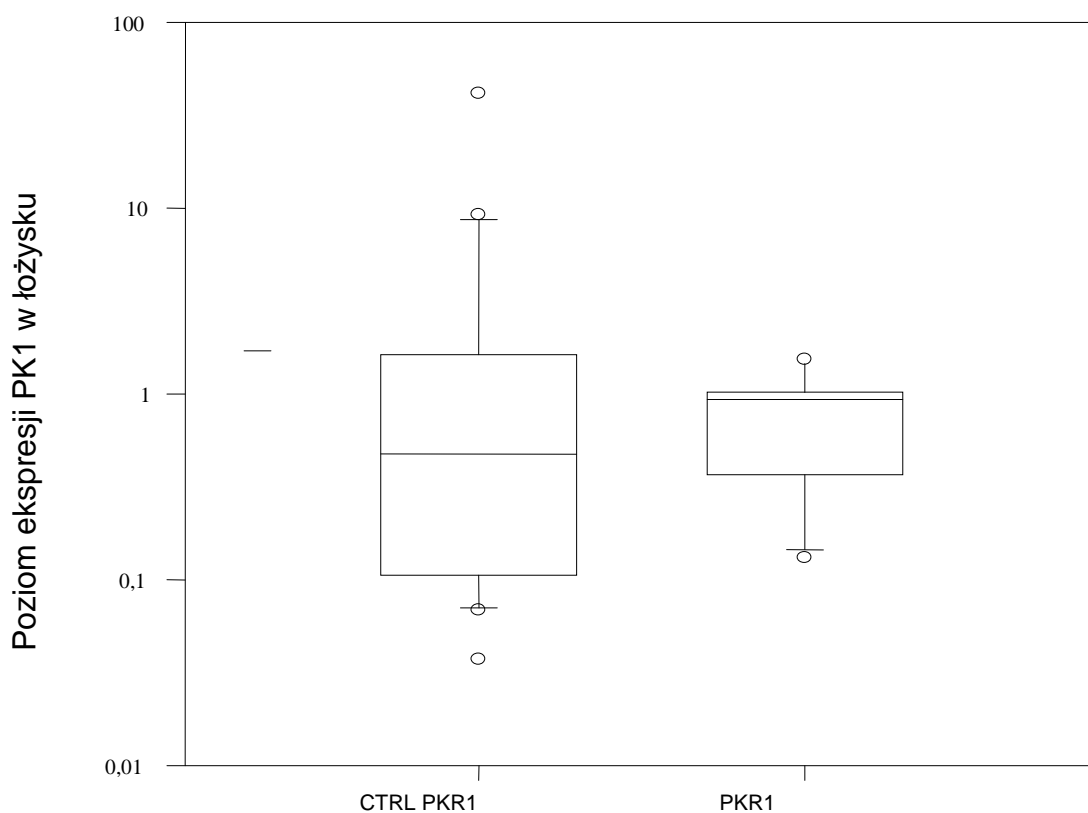
- Myometrium PK1 grupa kontrolna (CTRL) versus badana (Tabela 9 i Rycina 4)

Po przeprowadzeniu analizy, jedynie porównanie ekspresji PK1 w grupie kontrolnej versus grupa badanej w łożysku wykazało różnicę istotną statystycznie ($p=0,004$). W pozostałych badanych grupach takiej zależności nie stwierdziłem.

Tab. 6 Porównanie ekspresji PKR1 w grupie kontrolnej i badanej w łożysku.

Mann-Whitney Rank Sum Test					
Rozkład cechy normalny:	Nie				
Grupa	N	Utracone	Mediana	25%	75%
Łožysko CTRL PKR1	20	0	0,475	0,114	1,626
Łožysko PKR1	12	0	0,934	0,39	1,019
(p = 0,471)					

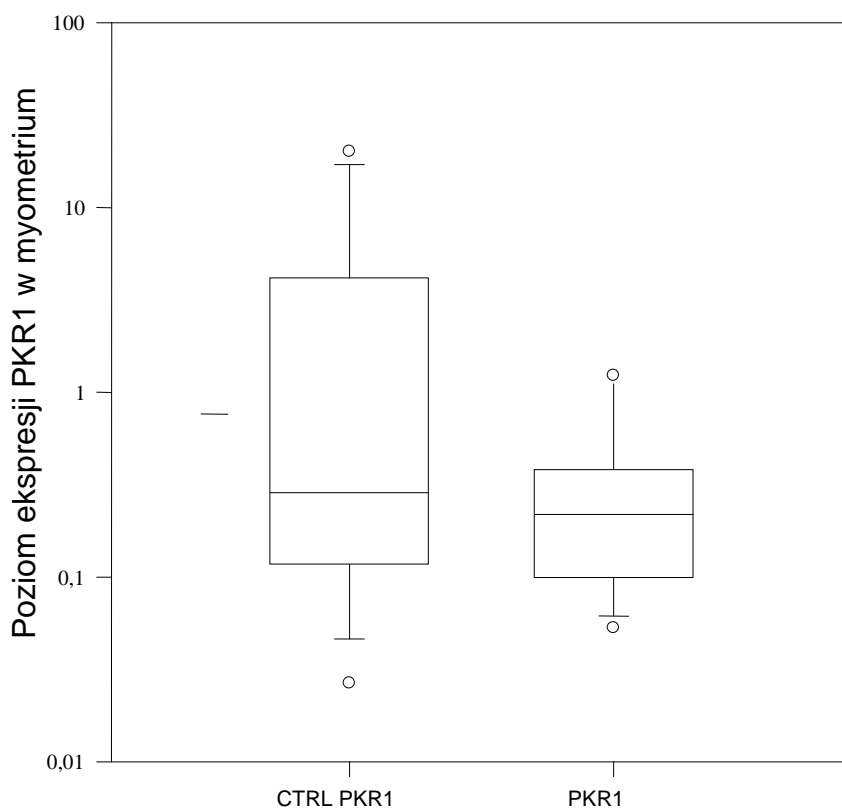
Rycina 1 Rozkład poziomu ekspresji PKR1 w łożysku w grupie kontrolnej i badanej.



Tab. 7 Porównanie ekspresji PKR1 w grupie kontrolnej i badanej w myometrium.

Mann-Whitney Rank Sum Test					
Rozkład cechy normalny:	Nie				
Grupa	N	Utracone	Mediana	25%	75%
Myometrium CTRL PKR1	13	0	0,286	0,134	2,646
Myometrium PKR1	11	1	0,218	0,109	0,371
(p = 0,487)					

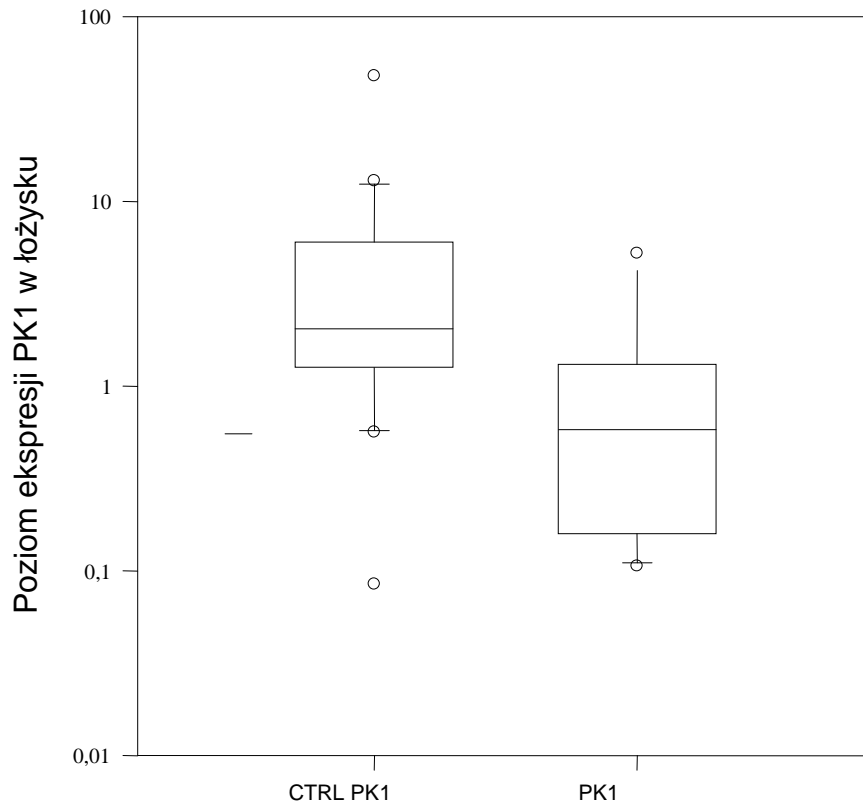
Rycina 2 Rozkład poziomu ekspresji PKR1 w myometrium w grupie kontrolnej i badanej.



Tab. 8 Porównanie ekspresji PK1 w grupie badanej versus kontrolnej w łożysku.

Mann-Whitney Rank Sum Test					
Rozkład cechy normalny:	Nie				
Grupa	N	Utracone	Mediana	25%	75%
Łożysko CTRLPK1	20	0	<u>2,041</u>	1,325	5,933
Łożysko PK1	12	0	<u>0,581</u>	0,171	1,265
(p = 0,004)					

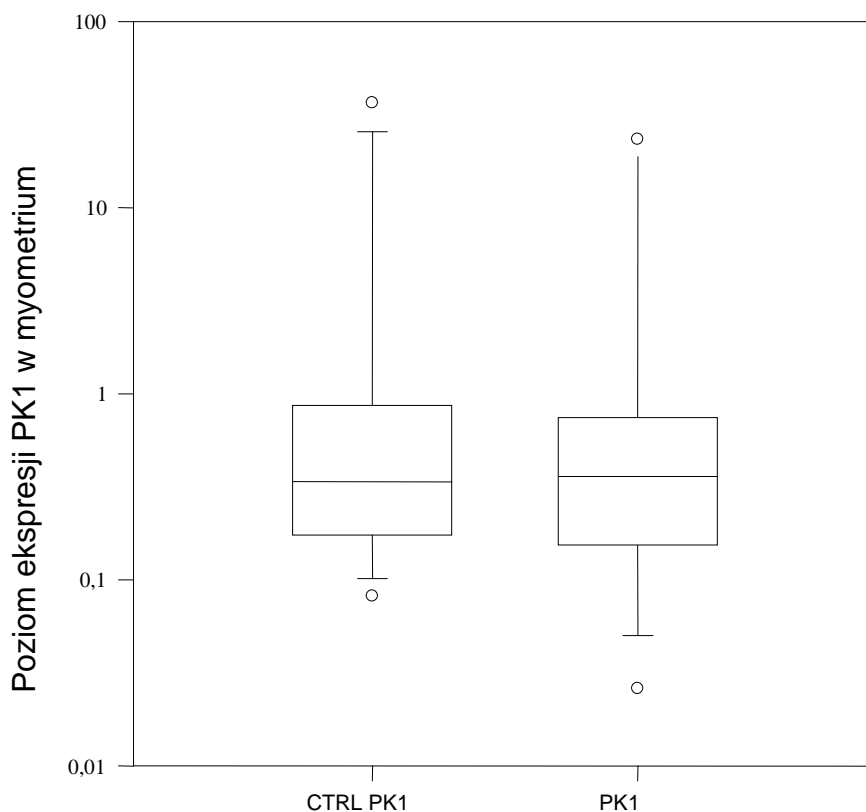
Rycina 3 Rozkład poziomu ekspresji PK1 w łożysku w grupie kontrolnej i badanej.



Tab. 9 Porównanie ekspresji PK1 w grupie badanej versus kontrolnej w mięśniówce.

Mann-Whitney Rank Sum Test					
Rozkład cechy normalny:	Nie				
Grupa	N	Utracone	Mediana	25%	75%
Myometrium CTRL PK1	13	0	0,337	0,182	0,808
Myometrium PK1	11	1	0,359	0,159	0,727
(p = 0,685)					

Rycina 4 Rozkład poziomu ekspresji PK1 w myometrium w grupie kontrolnej i badanej.

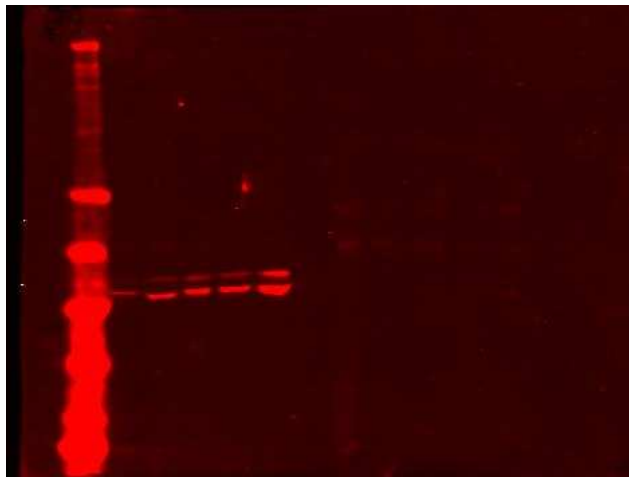


4.3. Badanie poziomu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

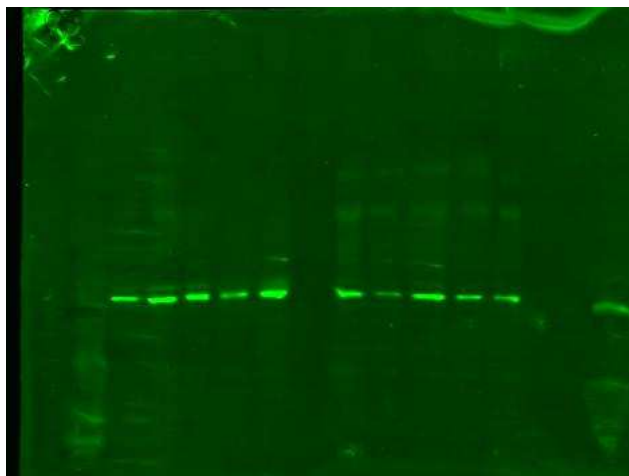
Ryciny 5 – 7 przedstawiają przykładowy blot uzyskany podczas oceny poziomu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Rycina 5 przedstawia obraz blotu uzyskanego w wyniku rozdziału elektroforetycznego białek metodą Western Blotting skanowanego na fosfoimagerze firmy Odyssey w długości fali 635 nm umożliwiający ocenę białka pERK. Rycina 6 przedstawia analogiczny obraz tego samego blotu ale skanowanego w długości fali 532 nm celem oceny białka tERK. Rycina 7 przedstawia obraz tego samego blotu z sumaryczną oceną pERK i tERK. Pierwsze pięć kolumn na blocie przedstawia rozdziel białek pobranych z próbek łożyska poddanych działaniu ligandu przez odpowiednio 0, 5, 10, 20, 30 minut, zaś następne pięć

kolumn przedstawia analogiczny rozdział białek w analogicznych przedziałach czasowych, ale pobranych z myometrium.

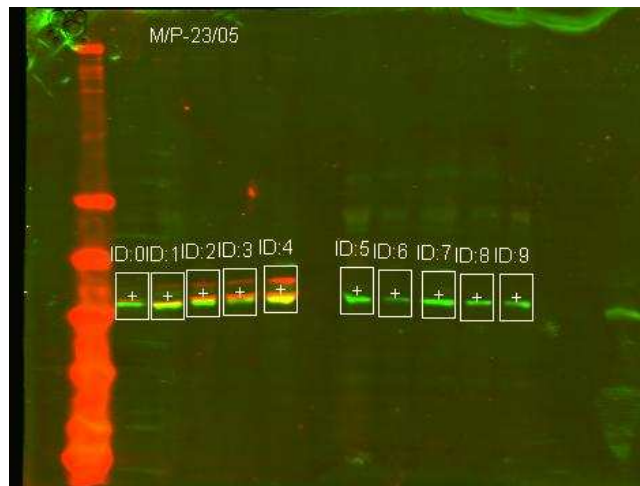
Mierzono intensywność prążków immunoreaktywnych (Rycina 7), zaś obraz był poddawany analizie komputerowej, podczas której analizowano średnią gęstość pikseli dla każdego paska, aby otrzymać względną wartość jednostek dla fosforylacji białek sygnalizujących ERK.



Rycina 5 Elektroforetyczny rozdział białka pERK z próbek łożyska i myometrium



Rycina 6 Elektroforetyczny rozdział białka tERK z próbek łożyska i myometrium



Rycina 7 Elektroforetyczny rozdział białka pERK i tERK z próbek łożyska i myometrium

W tabelach 10 i 11 przedstawiłem wyniki porównania par odpowiadających sobie przedziałów czasowych 5, 10, 20 i 30 minut po stymulacji ligandem w grupie badanej (PE) i kontrolnej (CTRL). Do porównania użyłem testu Mann – Whitney, gdyż porównywane zbiory były niejednorodne, a rozkład danych jest niesymetryczny.

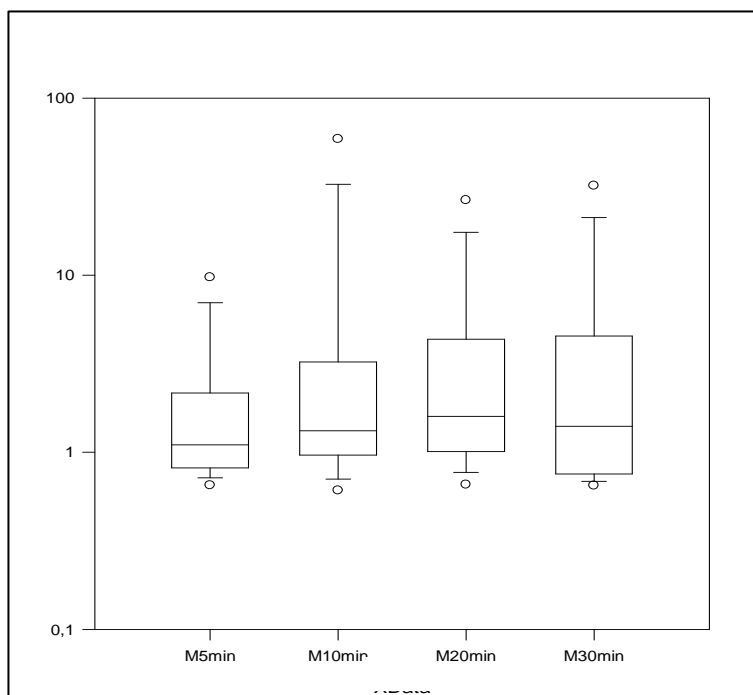
Tab. 10 Porównanie poziomów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w przedziałach czasowych po 5, 10, 20, 30 minutach stymulacji ligandem (PK1) próbek myometrium (M) w grupie kontrolnej (CTRL) i badanej (PE).

	Grupa (Tkanka i przedział czasowy)	p	Wielkość próbek	Mediana	25%	75%
1	M5minCTRL	NS	15	1,16	0,95	1,93
	M5min PE	NS	14	1,10	0,82	2,08
2	M10minCTRL	NS	15	1,77	1,27	2,16
	M10min PE	NS	14	1,32	0,99	3,24
3	M20minCTRL	NS	15	3,62	2,10	7,65
	M20min PE	NS	14	1,60	1,04	3,79
4	M30minCTRL	0,042	15	4,26	1,81	10,83
	M30min PE	NS	14	1,40	0,76	4,54

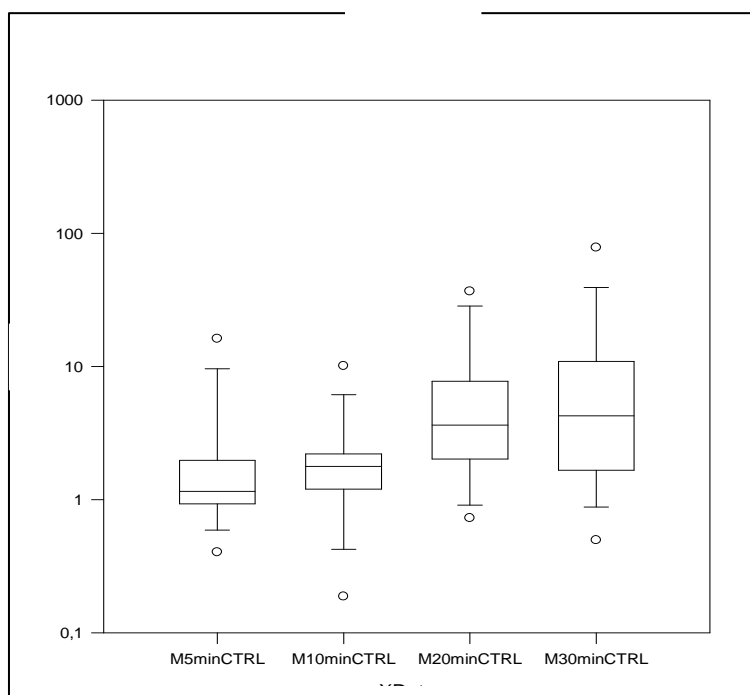
Tab. 11 Porównanie poziomów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w przedziałach czasowych po 5, 10, 20, 30 minutach stymulacji ligandem (PK1) próbek łożyska (P) w grupie kontrolnej (CTRL) i badanej (PE).

	Grupa (Tkanka i przedział czasowy)	p	Wielkość próbki	Mediana	25%	75%
1	P5PinCTRL	NS	16	1,56	0,49	2,91
	P5min PE	NS	14	1,72	0,89	5,34
2	P10minCTRL	NS	16	1,81	1,11	2,75
	P10min PE	NS	14	1,53	0,47	5,47
3	P20minCTRL	NS	16	3,79	1,52	6,76
	P20min PE	NS	14	1,79	0,70	9,24
4	P30minCTRL	NS	16	3,63	2,21	9,08
	P30min PE	NS	14	1,48	0,67	5,20

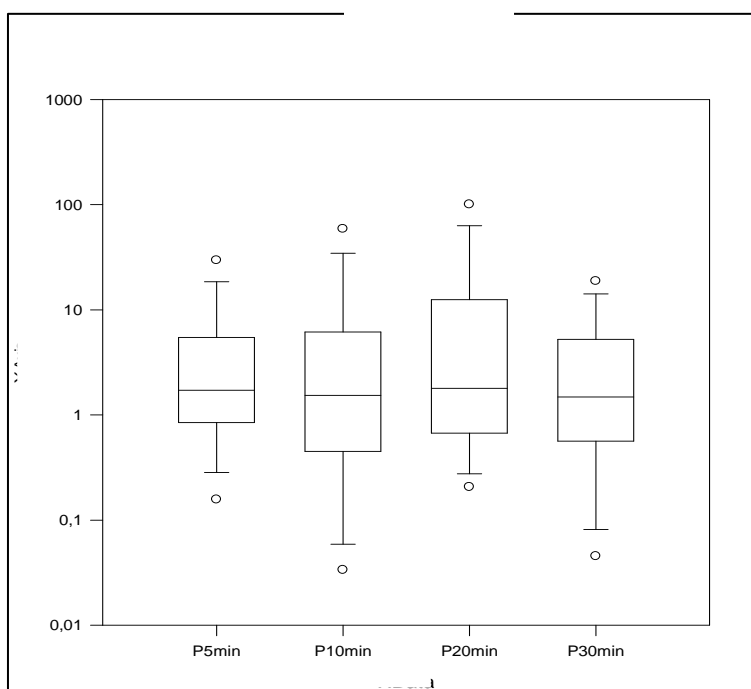
Poniższe ryciny 8 - 11 przedstawiają rozkład wyników w grupach badanych zarówno w myometrium jak i łożysku, w odpowiednich przedziałach czasowych, tj. poziom sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w 5, 10, 20 i 30 minucie



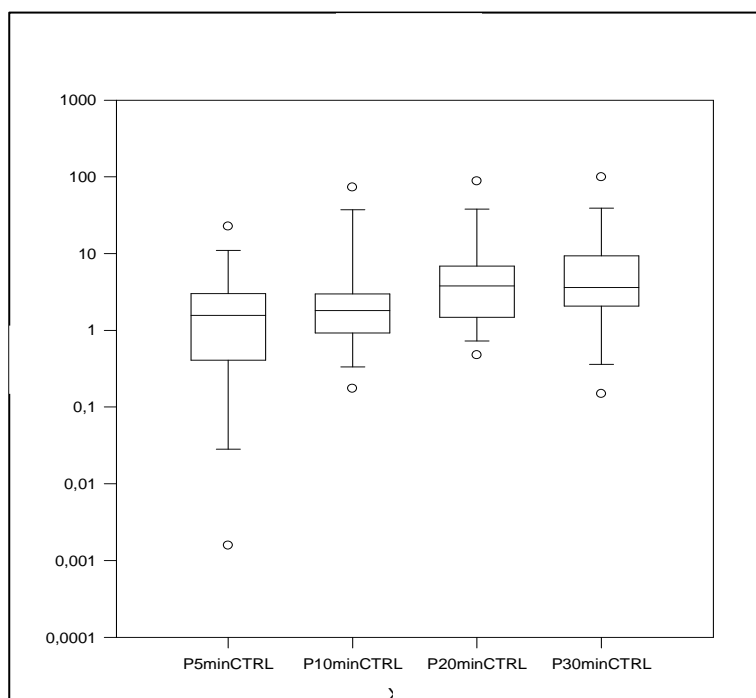
Ryc. 8 Rozkład wyników w grupie badanej w myometrium w przedziałach czasowych 5, 10, 20 i 30 minut po dodaniu ligandu



Ryc. 9 Rozkład wyników w grupie kontrolnej w myometrium w przedziałach czasowych 5, 10, 20 i 30 minut po dodaniu ligandu



Ryc. 10 Rozkład wyników w grupie badanej w łóżysku w przedziałach czasowych 5, 10, 20 i 30 minut po dodaniu ligandu.



Ryc. 11 Rozkład wyników w grupie kontrolnej w łóżysku w przedziałach czasowych 5, 10, 20 i 30 minut po dodaniu ligandu.

Statystycznie istotną różnicę uzyskałem jedynie w przypadku myometrium w grupie kontrolnej po 30 minutach stymulacji ligandem (EG-VEGF). Wzrost współczynnika pERK/tERK jest jednak także wyraźnie obserwowalny po 20 i 30 minutach stymulacji ligandem zarówno w myometrium jak i w łożysku.

W tabeli 12 przedstawiłem analizę zmian poziomów pERK/tERK w czasie wykorzystując test Spearmana. W grupie kontrolnej (ctrl) wzrost pERK/tERK korelował w czasie, ponieważ współczynnik korelacji zarówno myometrium (M) jak i łożyska (P) był dodatni. Możemy wyciągnąć stąd wniosek, iż zmienne te rosły wraz z czasem. W grupie badanej natomiast nie obserwuje się istotnej statystycznie korelacji w czasie wzrostu pERK/tERK.

Tab. 12 Analiza korelacji zmian poziomu pERK/tERK w czasie.

Test korelacji rang Spearmana				
	M ctrl vs. czas	P ctrl vs.czas	M vs. czas	P vs.czas
Współczynnik korelacji rang	0,45	0,332	0,105	-0,056
Wartość p	<0,001	0,008	0,441	0,67
Ilość próbek	60	64	56	60

4.4. Badanie metodą immunohistochemiczną ekspresji białka PK1 i PKR1 w łożysku i myometrium

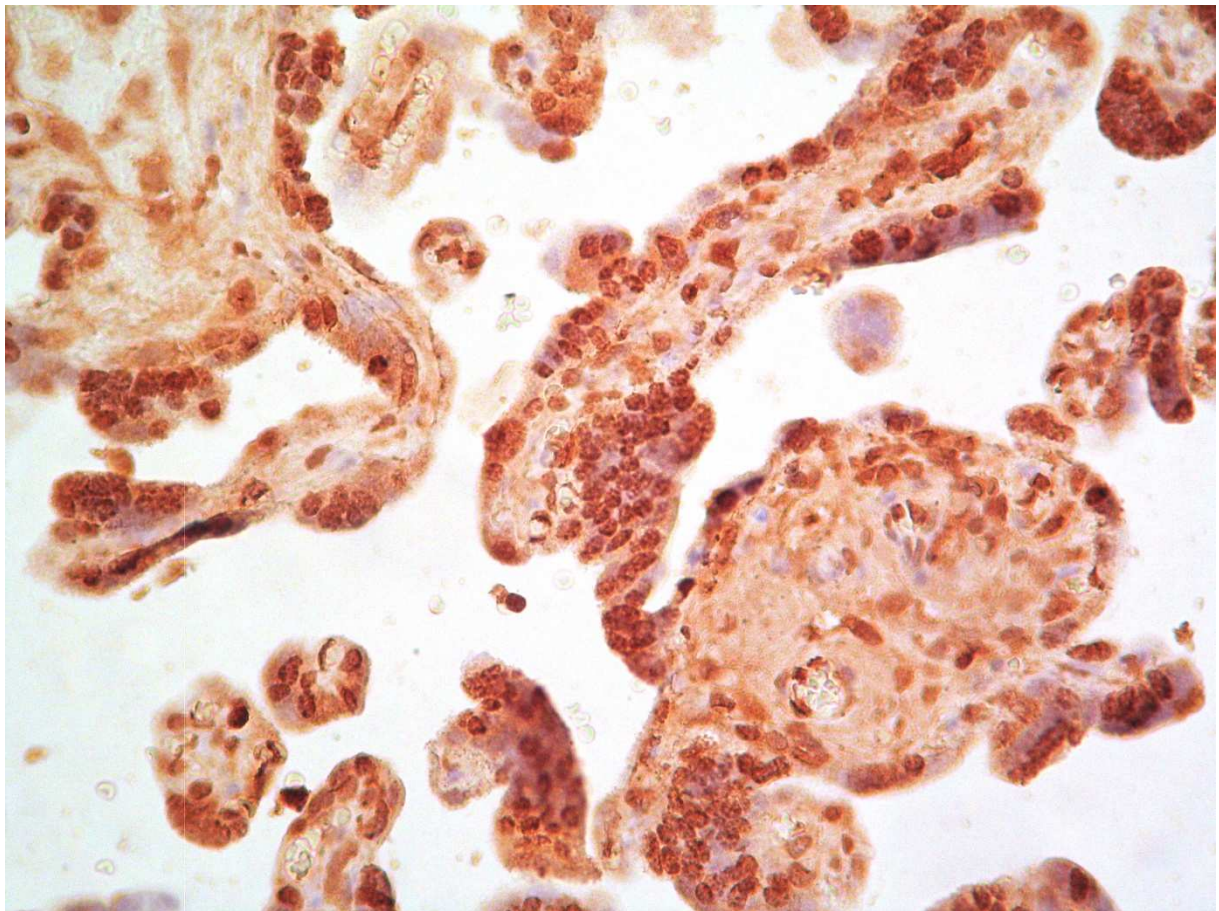
4.4.1 Łożysko

Nie stwierdzono różnic w występowaniu PK1 i PKR1 w łożysku ciężarnych zdrowych i ciężarnych z ciążą powikłaną wystąpieniem stanu przedrzucawkowego. W łożysku białko PK1 lokalizowało się głównie w jądрах syncytiotrofoblastu pokrywającym kosmki. W cytoplazmie stwierdzono delikatne dyfuzyjne podbarwienie. Podobnie pozytywną reakcję obserwowano w komórkach mezenchymalnych tworzących podścielisko kosmków (Fot.1).

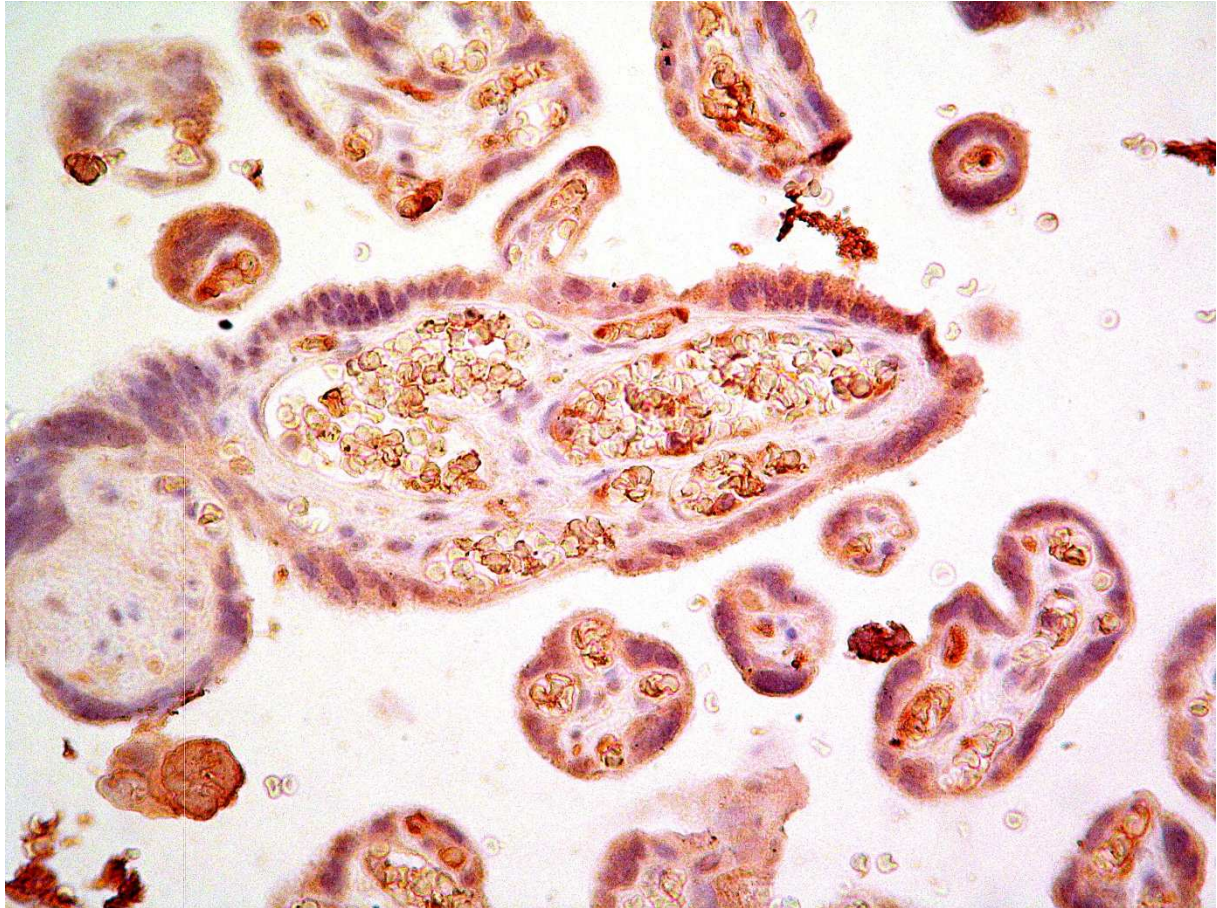
Białko receptorowe PKR1 zlokalizowane jest w cytoplazmie komórek trofoblastu, jądra były negatywne. W tkance mezenchymalnej kosmków, cytoplazma wybarwiała się jedynie w pojedynczych komórkach, przypuszczalnie komórkach Hofbauera (Fot. 2).

4.4.2 Mięsień macicy

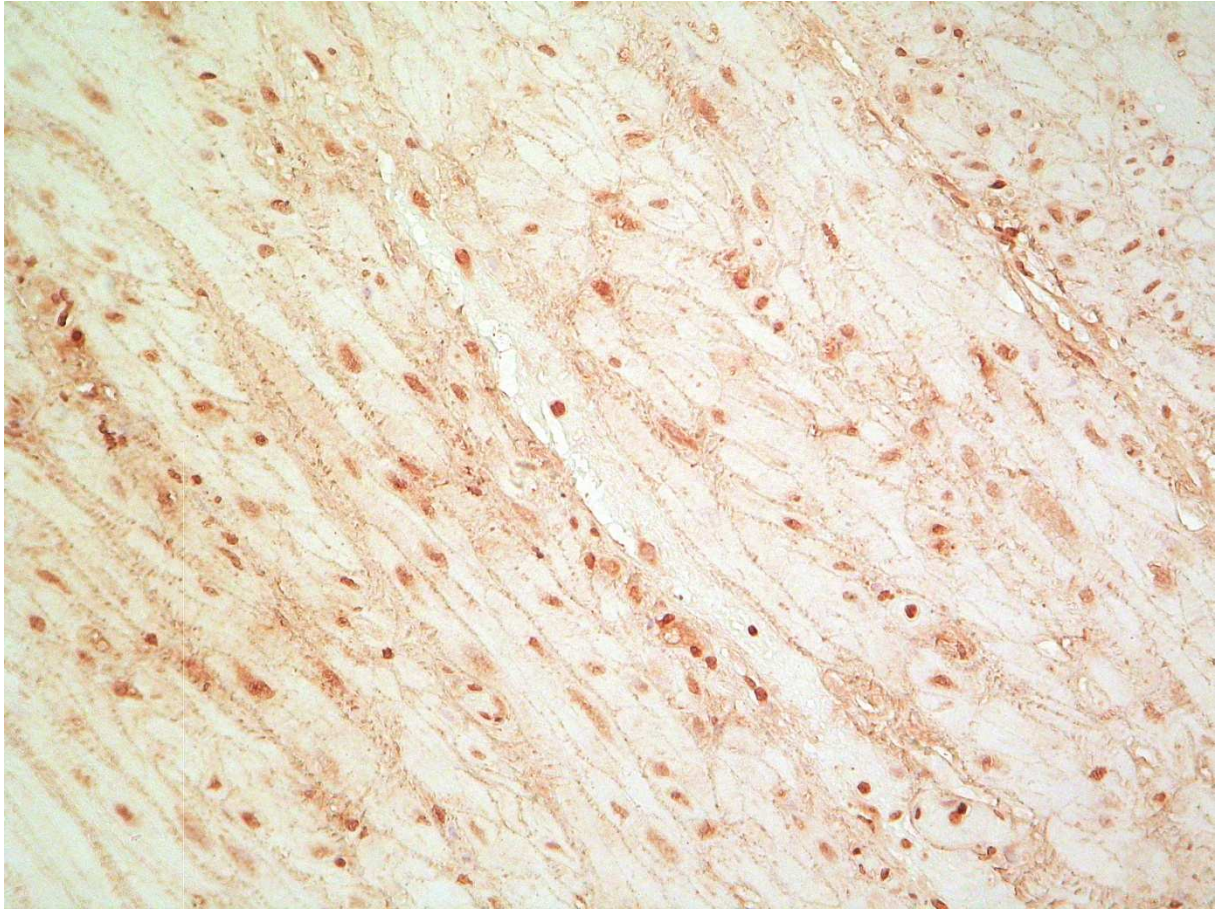
Nie stwierdzono różnic w występowaniu PK1 i PKR1 w myometrium ciężarnych zdrowych i ciężarnych z ciążą powikłaną wystąpieniem stanu przedrzucawkowego. Białko PK1 w komórkach mięśni gładkich macicy ciężarnej lokalizowało się w ich jądрах oraz w jądрах komórek podścieliska. Cytoplazma była negatywna (Fot. 3); podobnie wybarwiała się jądra cytotrofoblastu płyty łożyskowej i doczesnej. Ekspresja białka receptorowego PKR1 w mięśniu macicy była bardzo słaba i najczęściej negatywna, natomiast na błonie doczesnej immunoreakcja była pozytywna.



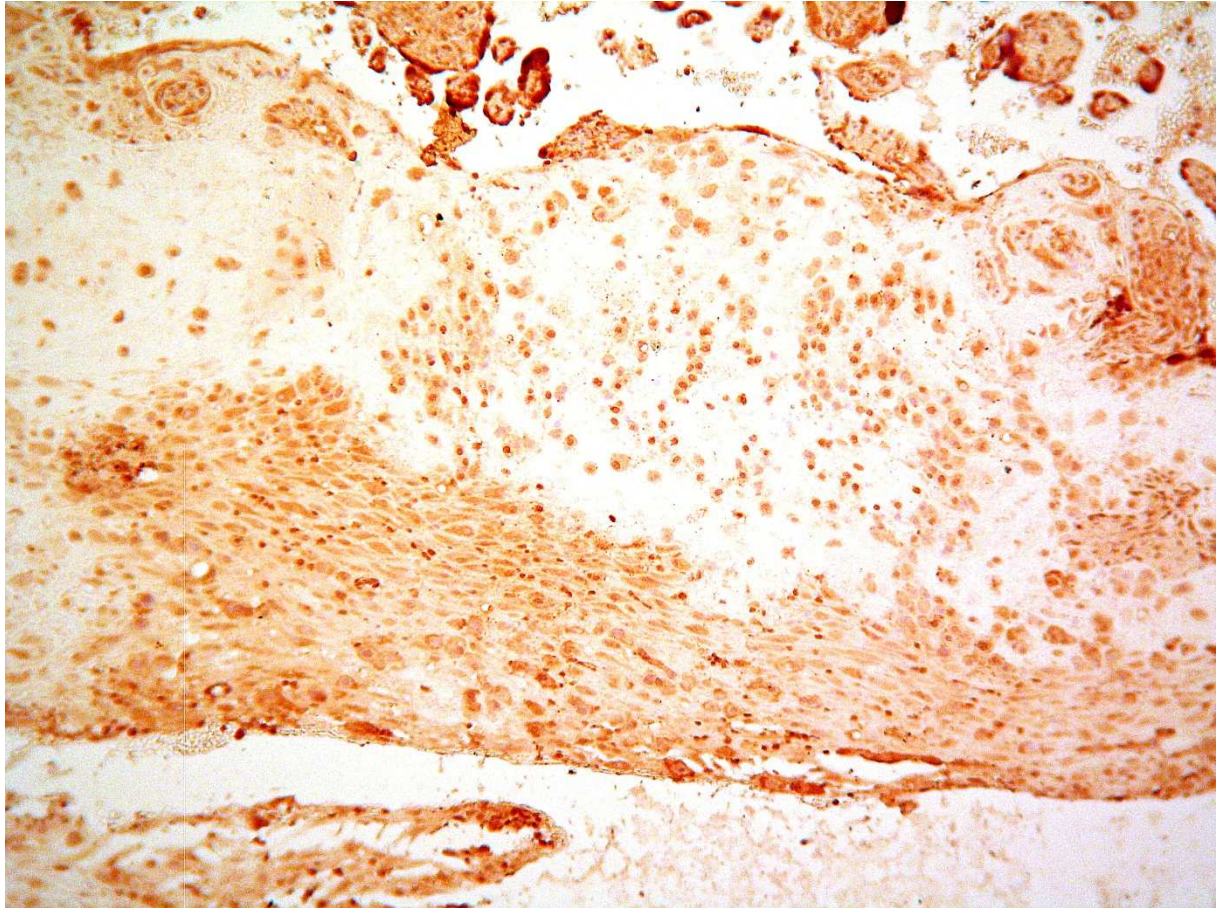
Fot. 1 Immunoreakcja na PK1 w ciąży powikłanej PE zlokalizowana w jądrach syncytiotrofoblastu z lekkim podbarwieniem cytoplazmy (powiększenie 270x)



Fot. 2 Immunopozytywna reakcja na obecność białka receptorowego (PKR1) w ciąży powikłanej PE jest zlokalizowana w syncytiotrofoblaście; jądra negatywne podbarwione hematoksyliną na kolor fioletowo-niebieski. Immunoreakcja w cytoplazmie barwy żółtawo – brązowej. (powiększenie 270x)

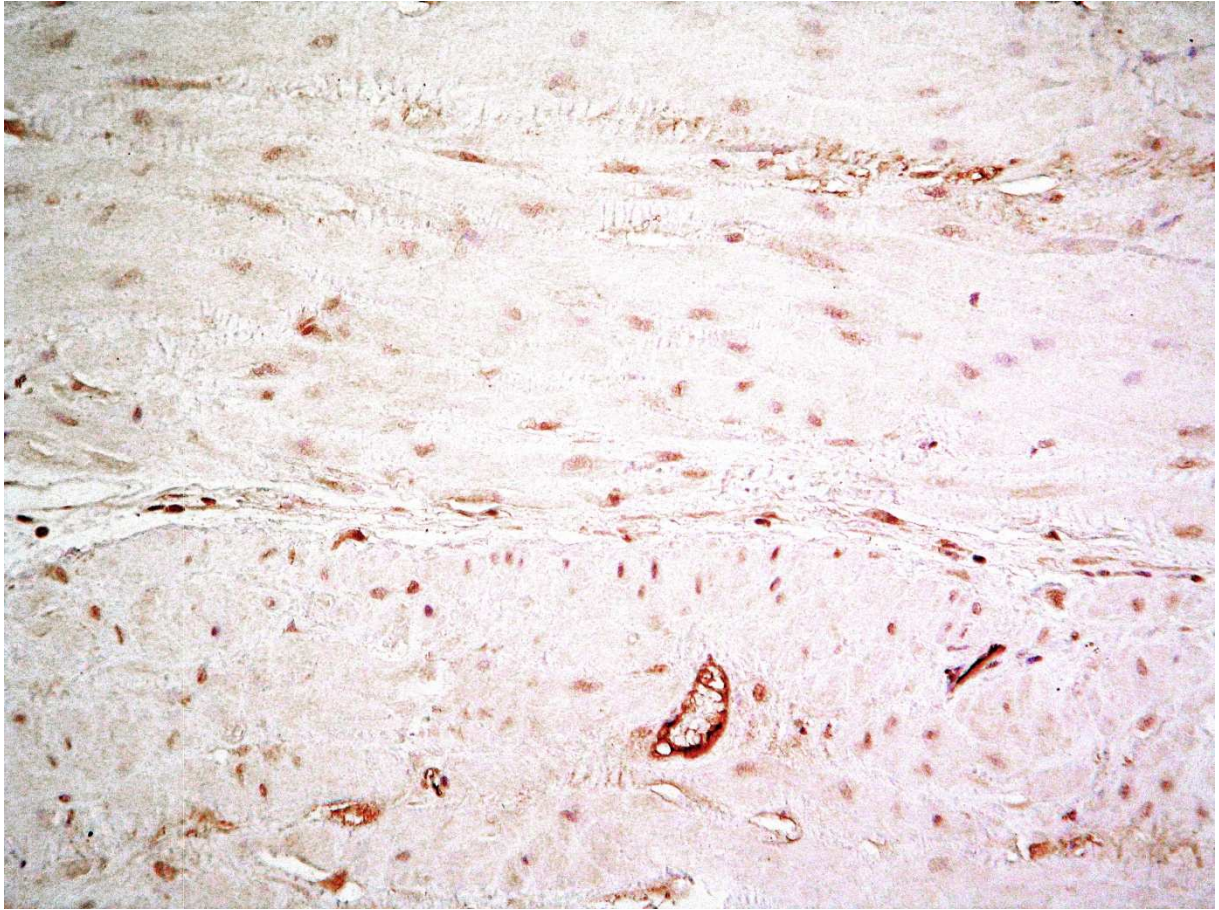


Fot. 3a

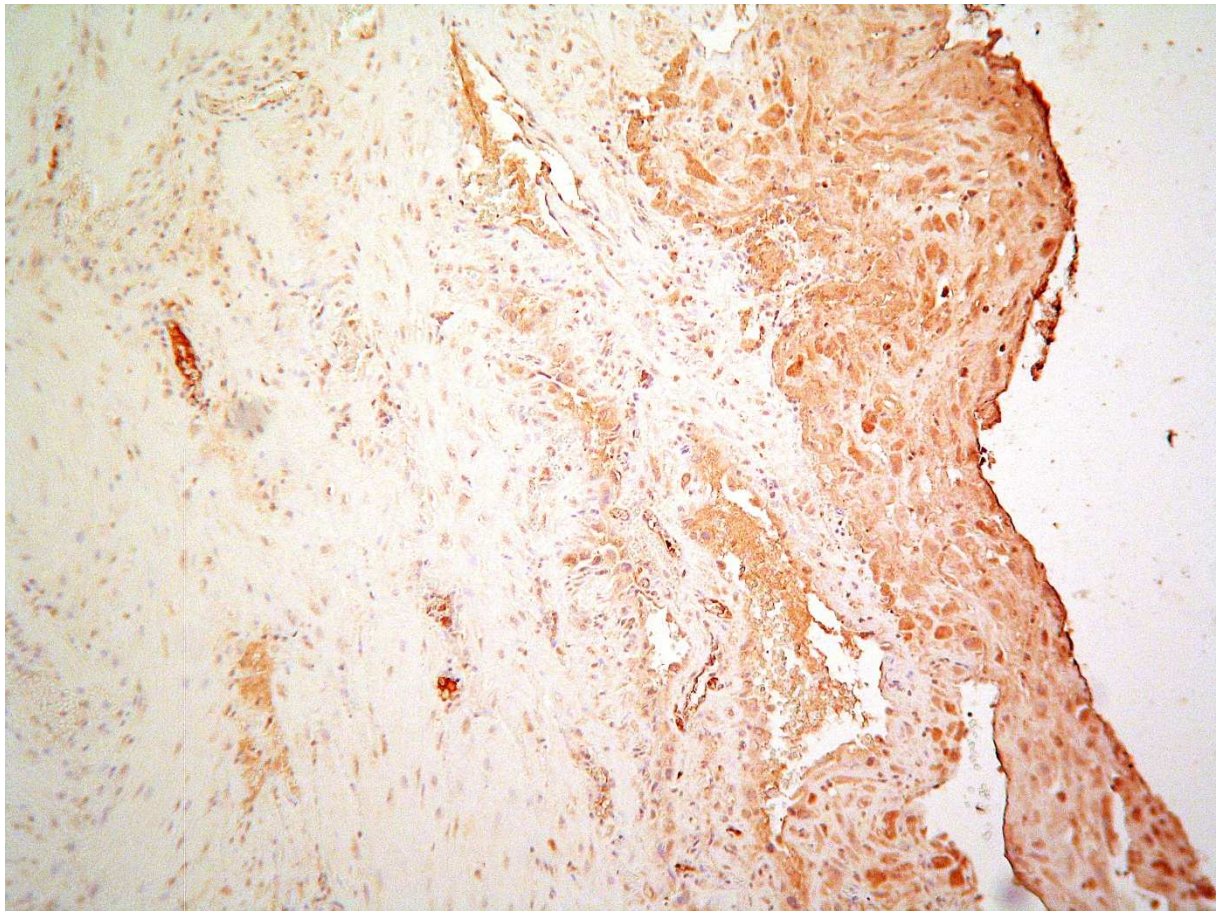


Fot. 3b

Fot 3a, b Immunopozytywna reakcja na PK1 w jądrach komórek mięśni gładkich macicy (Fot. 3a) i w płycie łożyskowej (Fot. 3b) z ciąży powikłanej wystąpieniem PE. Pozytywna reakcja w płycie łożyskowej jest widoczna w jądrach cytotroblastu i w doczesnej z delikatnym podbarwieniem cytoplazmy (a - powiększenie 270x, b – 150x).

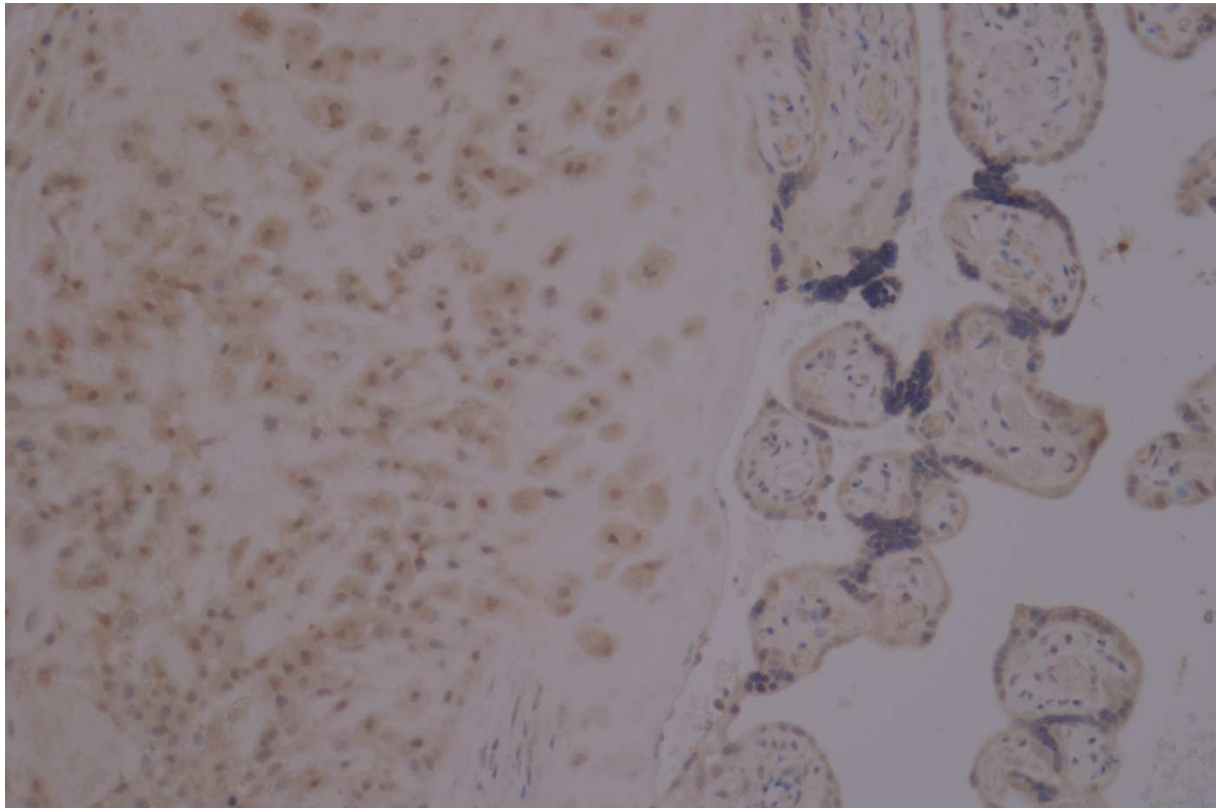


Fot. 4a

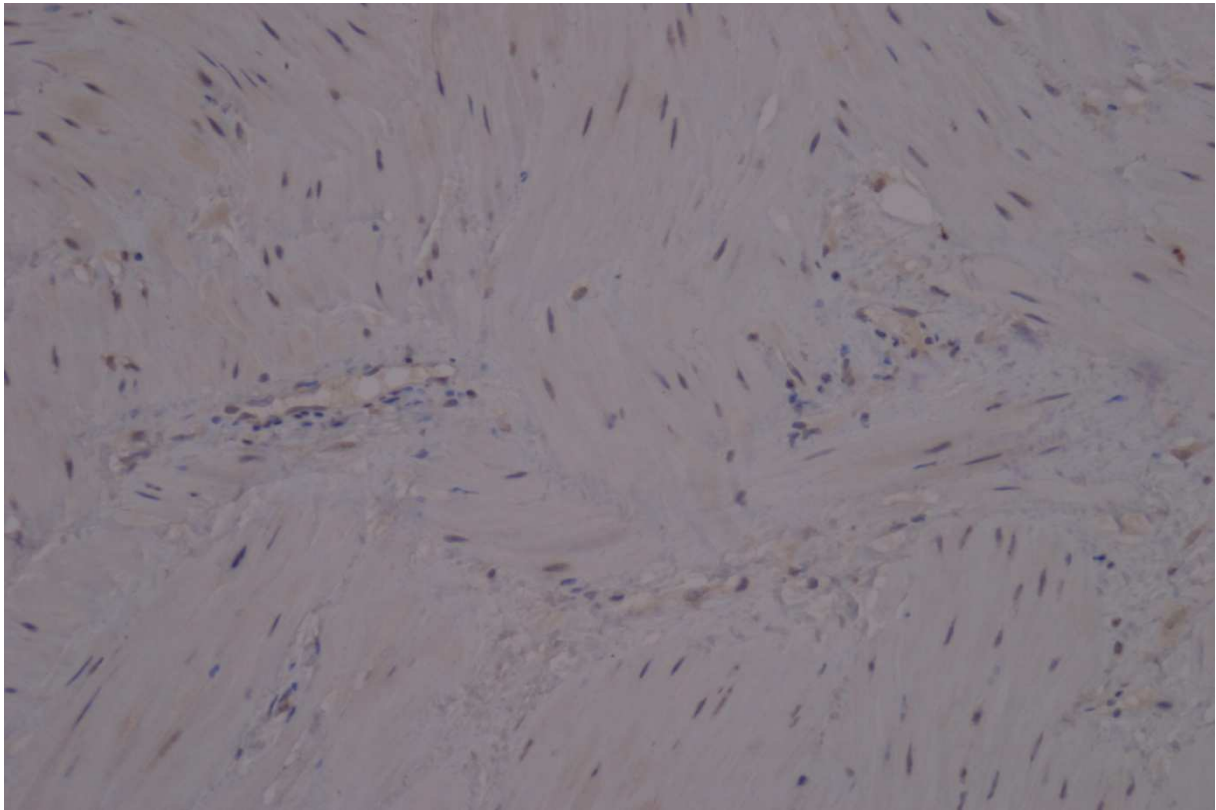


Fot. 4b

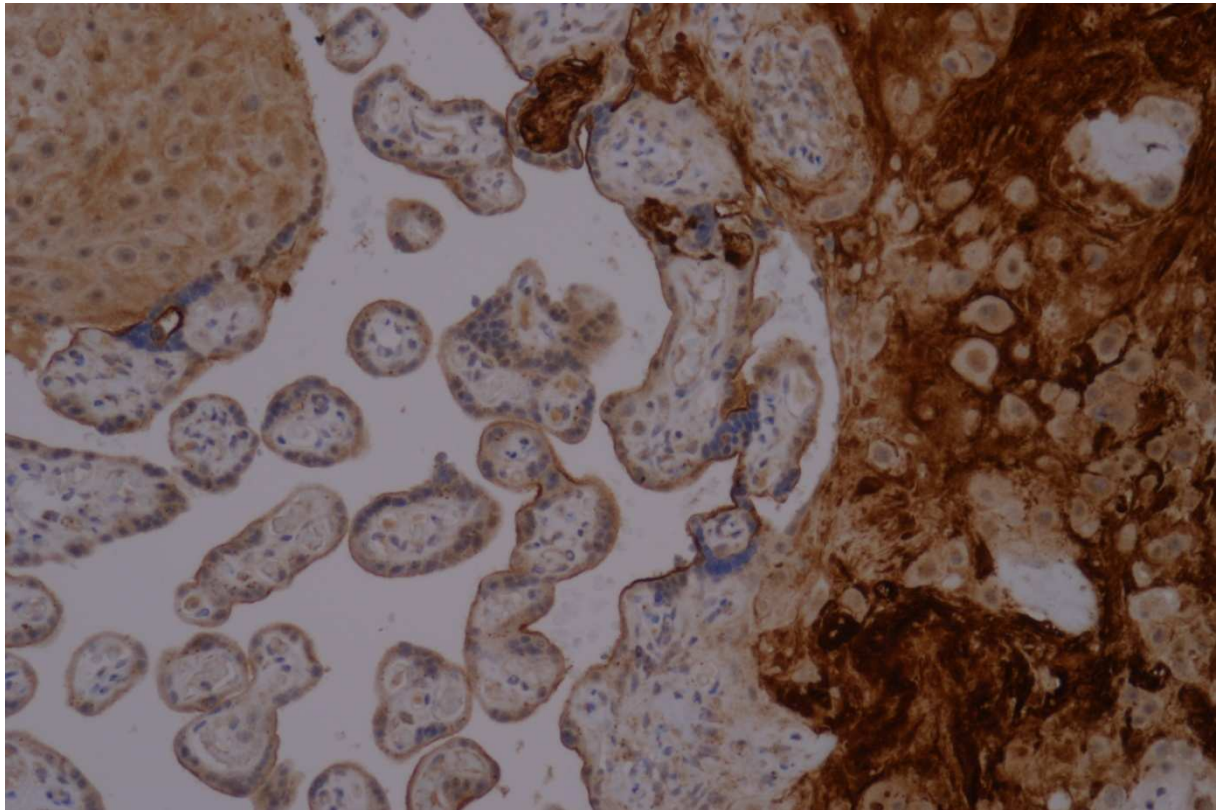
Fot 4a, b Immunoreakcja na obecność białka receptorowego (PKR1) w ciąży powikłanej PE. Fot. 4a – przekrój przez mięśnie gładkie ciężarnej macicy. Immunoreakcja negatywna, widoczne jądra komórek zabarwione hematoksyliną (powiększenie 200x). Fot. 4b – wycinek ze ściany mięśniowej wraz z doczesną. W ścianie mięśniowej reakcja ujemna, widoczne niebiesko-fioletowe zabarwione hematoksyliną jądra. W doczesnej reakcja immunopozytywna w cytoplazmie komórek doczesnowych (powiększenie 150x).



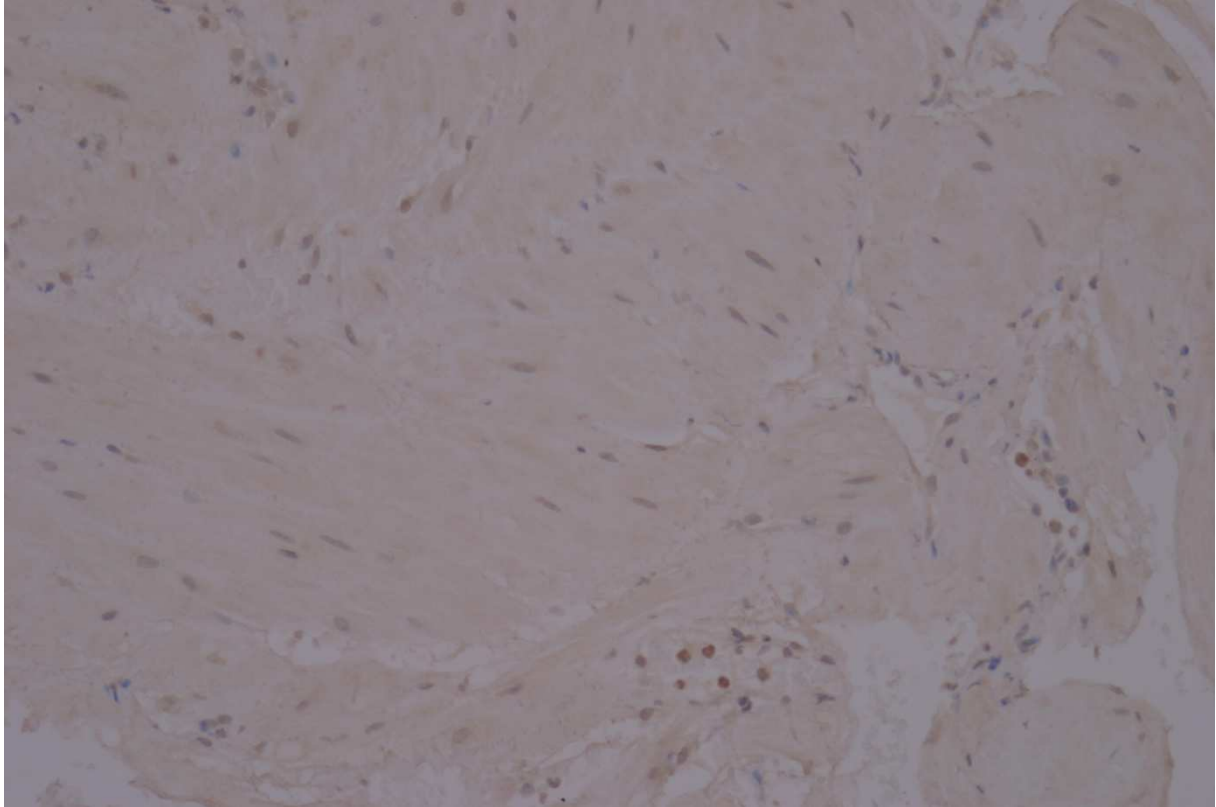
Fot. 5 Immunoreakcja na PK1 w łożysku z ciąż o prawidłowym przebiegu. Widoczne podbarwienie jąder komórkowych z podbarwieniem cytoplazmy zarówno w syncytiotrofoblastyce (prawa strona zdjęcia), jak i trofoblastyce pozakosmkowym (lewa strona zdjęcia). Powiększenie 200x.



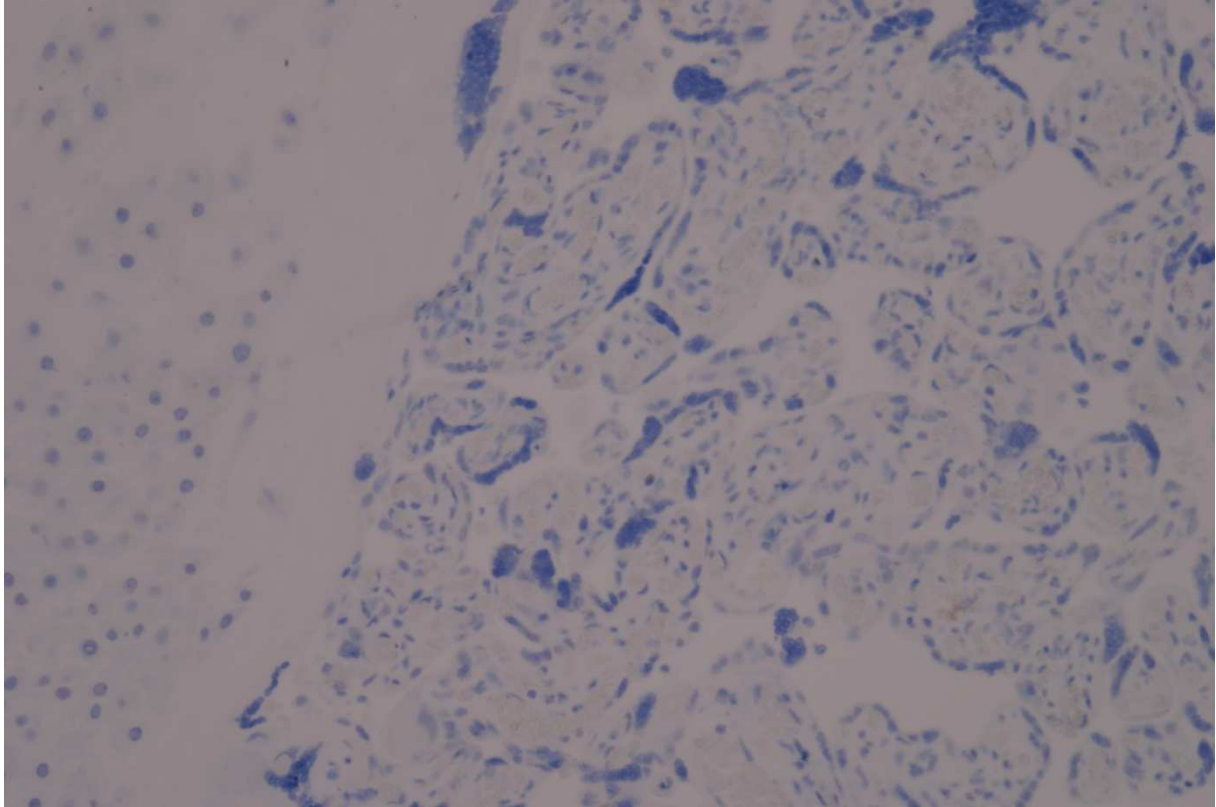
Fot.6 Brak immunoreakcji na PK1 w myometrium z ciąży o prawidłowym przebiegu.
Powiększenie 200x.



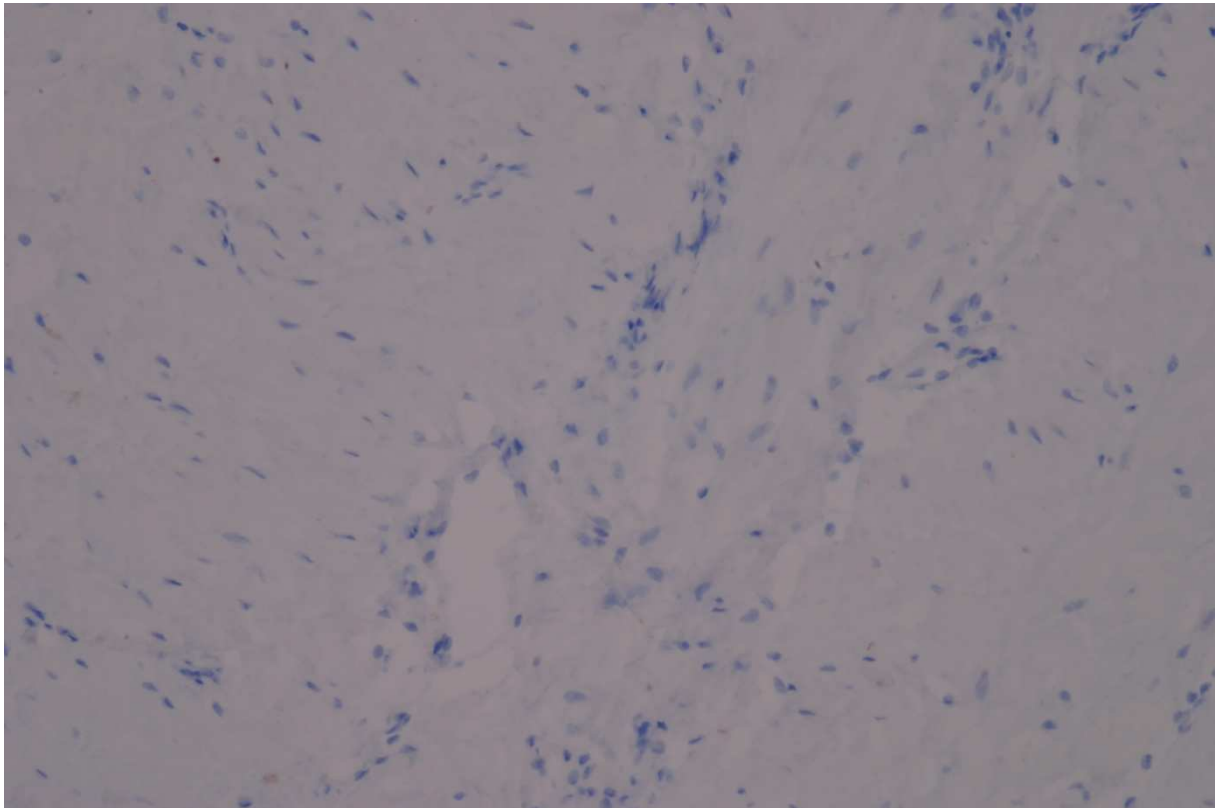
Fot. 7 Immunoreakcja na obecność białka receptorowego (PKR1) w ciąży o prawidłowym przebiegu. Przekrój przez syncytiotrofoblast (centrum pola widzenia) i trofoblast pozakosmkowy (prawa strona zdjęcia z artefaktem). W syncytiotrofoblaście jądra negatywne podbarwione hematoksyliną na kolor fioletowo-niebieski, immunoreakcja w cytoplazmie barwy żółtawo – brązowej. Powiększenie 200x.



Fot. 8 Brak immunoreakcji na PKR1 w myometrium z ciąż o prawidłowym przebiegu.
Powiększenie 200x.



Fot. 9a Negatywna kontrola (brak przeciwciała) - łożysko



Fot. 9b Negatywna kontrola (brak przeciwciała) - myometrium

5.0. Dyskusja

Etiopatogeneza stanu przedrzucawkowego nadal nie jest w pełni poznana. W piśmiennictwie ostatnich lat spotyka się doniesienia wskazujące na to, iż za wystąpienie tego powikłania odpowiedzialna jest nieprawidłowa inwazja trofoblastu. Do tej pory jednak przedmiotem kontrowersji pozostaje przyczyna zaburzonej inwazji trofoblastu. Proponowana ostatnio trójetapowa hipoteza powstawania stanu przedrzucawkowego wydaje się wymagać uzupełnienia o czwarty, a właściwie w kolejności pierwszy etap – etap zaburzeń genetycznych. Świadczą o tym m. in. prace Rasmussena i wsp. (74).

W literaturze z ostatnich paru lat podnosi się niejednorodność przebiegu stanu przedrzucawkowego u różnych kobiet. Uważa się, iż stan przedrzucawkowy różni się swą etiologią, przebiegiem i rokowaniem w zależności od momentu jego wystąpienia w ciąży (80). Dzielimy zatem stan przedrzucawkowy na ten o wczesnym początku (przed 34 tygodniem ciąży) i ten o późnym początku (po 34 tygodniu ciąży) (78,79). Uważa się je za różne formy tej samej choroby. Stan przedrzucawkowy o wczesnym początku stanowi mały procent wszystkich przypadków PE, ale są to przypadki o najcięższym klinicznym przebiegu. Typowe cechy wczesnego stanu przedrzucawkowego to:

- Nieadekwatna i niekompletna inwazja trofoblastu tętnic spiralnych u matki;
- Zmiany w przepływie krwi w tętnicach spiralnych, a co za tym idzie w tętnicach macicznych (wcięcia wczesno rozkurczowe tzw. notch'e, wzrost współczynnika pulsacji PI w dopplerowskim widmie przepływu i inne);
- Zwiększony opór obwodowy w naczyniach łożyskowych może być przyczyną nieprawidłowego przepływu w tętnicach pępowinowych (zwiększony współczynnik skurczowo/rozkurczowy przy nadal zachowanym przepływie końcoworozkurczowym, brak lub nawet wsteczny kierunek tego przepływu);
- Objawy ograniczenia wzrastania.

Późny stan przedrzucawkowy stanowi ponad 80% wszystkich przypadków. Większość z nich związanych jest z:

- Porodem dziecka bez cech ograniczenia wzrastania;

- Prawidłowym lub tylko nieznacznie zaburzonym przepływem w macicznych tętnicach spiralnych (bez zmian w dopplerowskim widmie przepływu w tętnicach macicznych lub tylko nieznacznie zwiększony PI – indeks pulsacji);
- Nie występowaniem zmian w przepływie krwi w tętnicach pępowinowych;
- Zwiększonym ryzykiem występowania u tych kobiet nadmiernej masy ciała lub powierzchni łożyskowej (cukrzyca, ciąża wielopłodowa, niedokrwistość, przebywanie na znacznej wysokości nad poziomem morza).

Warto zauważyć, że wszystkie cechy charakterystyczne dla wczesnego stanu przedrzucawkowego (np. zaburzona inwazja trofoblastu) nie są specyficzne tylko dla tego powikłania, ale są również typowe dla wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrostania płodu (IUGR). Co więcej, badania przepływów dopplerowskich w tętnicach macicznych jako czynnika predykcyjnego stanu przedrzucawkowego wykonywane między 11 a 13 + 6 tygodniem ciąży, pozwalają przewidzieć wystąpienie stanu przedrzucawkowego w 33 – 40% (81,82), podczas gdy wystąpienie IUGR pozwalają przewidzieć w 100% (82). Nasuwa się zatem pytanie, czy w związku z tym zmiany wymienione powyżej są faktycznie związane z patogenezą wczesnego stanu przedrzucawkowego? (78) A może to współistnienie z IUGR powoduje, iż wczesny stan przedrzucawkowy jest tak poważnym schorzeniem? Poddaje to w wątpliwość, czy faktycznie istnieje różnica między wczesną a późną preeklampsją. Jeśli rozważyć objawy, to w obydwóch grupach spotykamy przypadki z maksymalnie wysokim ciśnieniem tętniczym i białkomoczem.

Huppertz zaproponował zatem nowy model patogenezы stanu przedrzucawkowego, uwzględniający moment rozpoczęcia choroby, jej łożyskowe pochodzenie i różny czas występowania objawów (78). Wynika z niego, iż preeklampsja może być spowodowana czynnikami wewnętrznymi uszkodzającymi we wczesnej ciąży różnicowanie i rozwój kosmkowego syncytiotrofoblastu (w przeciwieństwie do IUGR, gdzie uszkodzenie dotyczy cytotrofoblastu pozakosmkowego). W późniejszej ciąży, czynniki zewnętrzne takie jak cukrzyca, ciąża mnoga, niedokrwistość, czy przebywanie na dużej wysokości nad poziomem morza, mogą skutkować zwiększoną masą i/lub powierzchnią łożyska. Z tego też powodu, a także na skutek zaburzeń macicznych takich jak np. hiperlipidemia, może dojść do przeładowania lub nieprawidłowego usuwania apoptotycznie zmienionych

jąder syncytiotrofoblastu. Niesie to za sobą ich wtórną martwicę i wywołanie odpowiedzi zapalnej uszkadzającej endotelium naczyń matki (78), co może prowadzić do powstania późnego stanu przedzucawkowego. Warto podkreślić, iż kluczowy staje się w świetle tych ustaleń syncytiotrofoblast, jako miejsce powstawania zaburzeń wiodących do wystąpienia stanu przedzucawkowego.

Stan przedzucawkowy znacząco częściej występował u kobiet będących w pierwszej ciąży. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi mówiącymi o tym, iż ryzyko wystąpienia preeklampsji jest kilkakrotnie (niektóre dane mówią nawet o 6-8 razy większym ryzyku) większe u pierwsiaków, niż u wieloródek. W kolejnych ciążach, na skutek adaptacji układu immunologicznego matki, nadciśnienie o ile w ogóle, przebiega zazwyczaj łagodniej. Pierwotnie uważano, iż niemodyfikowalnym czynnikiem ryzyka preeklampsji jest macierzyństwo po raz pierwszy (primiparity), ale ostatnie badania, a zwłaszcza obserwacja, iż ryzyko rozwoju stanu przedzucawkowego wraca do poziomu pierwotnego, jeśli kolejna ciąża jest z nowym partnerem sugerują, iż ojcostwo po raz pierwszy (primiparity) jest czynnikiem ryzyka. (11)

5.1. Omówienie wyników oceny ekspresji PK1 i PKR1 w myometrium i łożysku

Łożysko jest przez wielu autorów uznawane za jedno z miejsc powstawania PK1 (uważanego za tożsame z EG-VEGF), jego produkcja jest szczególnie nasiloną w syncytiotrofoblaście (41), chociaż nowsze badania (75) sugerują jego obecność również w cytotrofoblaście i okazjonalnie w endotelium naczyń płodowych. Być może właśnie dlatego, jedynie w łożysku porównanie ekspresji PK1 u pacjentek z grupy badanej i kontrolnej (0,58 vs 2,04), wykazało istotnie statystyczną różnicę ($p=0,004$). Innymi słowy, ekspresja PK1 w łożysku kobiet z grupy kontrolnej była istotnie statystycznie wyższa niż w łożysku kobiet z grupy badanej. Nie uzyskano statystycznie istotnej różnicy dla ekspresji PKR1 w łożysku, ani statystycznie istotnych różnic ekspresji PK1 czy PKR1 w myometrium. Uzyskany wynik pokazuje, iż komórki syncytiotrofoblastu produkują o wiele więcej EG-VEGF u zdrowych ciężarnych, niż u ciężarnych ze stanem przedzucawkowym. Na tej podstawie można wysnuć wniosek, iż w preeklampsji produkcja PK1 jest upośledzona, a zatem dochodzi do zaburzeń funkcji wydzielniczej syncytiotrofoblastu. Otwartą pozostaje kwestia, czy są to zaburzenia pierwotne czy wtórne do stanu przedzucawkowego.

Pewne światło na ten problem rzucają badania Hoffmanna i wsp. (77). Z powodu uregulowań prawnych obowiązujących we Francji mieli oni dostęp do tkanek trofoblastu uzyskanych podczas terminacji ciąży, w związku z tym badania przeprowadzali również na tkankach pochodzących z 7-12 tygodnia ciąży. W badaniu swoim udowodnili oni, iż stężenie EG-VEGF w surowicy kobiet było najwyższe na początku ciąży, zaś w trzecim trymestrze spadało do poziomu charakterystycznego dla kobiet nie będących w ciąży, czyli około pięciokrotnie. Co do efektu PK1 na migrację trofoblastu pozakomórkowego *in vitro* to poprzez oddziaływanie przez PKR2, preferencyjnie występujący na powierzchni EVT (extravillous trophoblast – trofoblast pozakosmkowy), uzyskali oni zahamowanie migracji komórek (70% versus 40%). Szczególnie istotna jest zdolność EVT do różnicowania w kierunku fenotypu mającego zdolność do inwazji. W badaniu Hoffmann i wsp. uzyskali niemal całkowity brak inwazji, czy wzrostu EVT uzyskanego z fragmentów ludzkich kosmków *in vivo* do tzw. Matrigelu. Potwierdziłoby to rolę EG-VEGF jako czynnika ograniczającego inwazję trofoblastu, ale stoi w sprzeczności z uprzednimi doniesieniami tych samych autorów co do fizjologicznie występującego najwyższego stężenia EG-VEGF w pierwszym trymestrze ciąży. Podobnie w sprzeczności z powyższym są obserwacje tych samych autorów (77) wskazujące na ograniczenie w obecności PK1 organizacji struktur tabularnych dających następnie początek naczyń, a także ograniczenie w obecności EG-VEGF produkcji metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 odpowiedzialnych za przebudowę macierzy pozakomórkowej, będącą krytycznym momentem przekształcania endometrium w doczesną (tzw. decidualizacji).

W pierwszym trymestrze trudno prognozować, która ciąża obarczona jest ryzykiem rozwinięcia się stanu przedrzucawkowego. Na tym właśnie polega trudność badań mających wyjaśnić etiologię PE. Dlatego też ustalenie różnic w ekspresji PK1 w drugim i trzecim trymestrze ciąży jest niezbędne do oszacowania wpływu tego czynnika na etiologię PE. W moim badaniu stwierdziłem wyższą ekspresję mRNA PK1 w łożyskach kobiet z grupy kontrolnej w porównaniu z łożyskami kobiet z grupy badanej. Nasuwa się zatem wniosek, iż w ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym syncytiotrofoblast nie produkuje tak dużej ilości PK1 jak w przypadku ciąży o przebiegu prawidłowym. Uzyskane przeze mnie wyniki stoją zatem w sprzeczności z wynikami badania Hoffmanna i wsp. (77). W ich badaniu dokonywano pomiarów stężeń EG-VEGF w osoczu kobiet w II (n=18, 9 zdrowych ciężarnych i 9 pacjentek z ciążą powikłaną PE) i III trymestrze ciąży (n=35,

odpowiednio 20 i 15 pacjentek w obu grupach). Autorzy ci uzyskali wyższy poziom krążącego EG-VEGF u pacjentek z ciążami powikłanymi PE w II trymestrze (choć różnice te pozbawione były istotności statystycznej), oraz statystycznie wyższy poziom EG-VEGF u pacjentek z PE w porównaniu ze zdrowymi ciężarnymi w III trymestrze. Trudno jednak na tej tylko podstawie wnioskować, czy zwiększony poziom PK1 jest wynikiem jego zwiększonej produkcji przez łożysko. Jak wiadomo, EG-VEGF jest produkowany u kobiety również w innych miejscach takich jak przewód pokarmowy, jajniki, i nadnercza. Aby zatem ustalić jaka jest przyczyna wzrostu stężenia PK1 w osoczu ciężarnych z PE, należałoby oznaczyć ekspresję tej substancji we wszystkich wymienionych tkankach. Z uzyskanych przez mnie rezultatów wynika, iż na pewno za ewentualny wzrost PK1 nie jest odpowiedzialne łożysko. Co więcej można wywnioskować w oparciu o powyżej wspomniane badanie (77), iż obniżona ekspresja EG-VEGF w łożysku pacjentek z PE musi być w jakiś sposób kompensowana przez zwiększoną produkcję przez inne struktury. Konieczne jest zatem przeprowadzenie badania, które porówna u tych samych kobiet poziom ekspresji mRNA PK1, w miarę możliwości we wszystkich tkankach produkujących EG-VEGF, z osoczym poziomem stężenia. Pomimo iż uważa się pierwszy trymestr za początek zmian prowadzących do powstania PE, to w świetle nowych ustaleń (78) nie jest to już takie pewne. Nadal nie możemy zatem stwierdzić, czy zmiany w ekspresji PK1 w III trymestrze ciąży są pierwotne, czy wtórne dla PE.

Interesująco wygląda porównanie moich wyników z wynikami Chung'a i wsp.(73). W swoim badaniu skupili się na roli VEGF w patogenezie stanu przedrzucawkowego, ale też jako pierwsi porównywali ekspresję mRNA EG-VEGF w łożysku ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym z ekspresją w łożysku zdrowych ciężarnych i nie stwierdzili żadnych różnic. W publikacji autorzy nie podają jednak wielkości grupy badanej, ani trymestru w którym odbywał się poród, wątpliwe jest by był to trymestr II - do 24 tygodnia ciąży. Nie badają także ekspresji mRNA receptora PK1 (PKR1), zaś obiektem badanym jest tylko łożysko, a nie znacznie trudniejsze do obróbki immunologicznej myometrium. Brak wówczas komercyjnie dostępnego przeciwciała przeciw EG-VEGF uniemożliwił im ocenę sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w łożysku. Ich spostrzeżenia o braku różnicy w ekspresji mRNA PK1 pomiędzy ciążami prawidłowymi a powikłanymi PE są zatem, moim zdaniem, nietrafne.

Znamienne, iż nie uzyskałem statystycznie istotnej różnicy w ekspresji PKR1 w łożysku między badanymi grupami. Oznacza to, iż ilość miejsc receptorowych dla PK1 nie ulega zmianie w przypadku wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Zmniejszona ekspresja PK1 w łożysku pacjentek z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym nie jest zatem zależna od obecności receptorów PKR1. Ciekawe są wyniki przytaczanych już badań Hoffmanna i wsp. (41,77) jeśli chodzi o ekspresję PKR1 i PKR2. Potwierdzili oni, iż do ekspresji PKR1 dochodzi głównie w tym samym czasie co i PK1, czyli w pierwszym trymestrze ciąży, zaś ekspresja PKR2 jest stała przez cały pierwszy trymestr. Ekspresja PKR1 była 80 razy silniejsza w cytotrofoblaście niż ekspresja PKR2, zaś ekspresja PKR2 była 15 razy silniejsza w linii komórkowej HTR-8 (linii komórkowej trofoblastu pozakosmowego – EVT) transfekowanej wirusem SV40, a także syncytiotrofoblastu (ST) i komórek śródbłonna (EC) (76,77). Sugeruje to, iż PK1 może wywierać inny efekt na komórki niezróżnicowane trofoblastu (CT - cytotrofoblast) przez PKR1, zaś inny na komórki zróżnicowane trofoblastu (ST, ECV i EC) poprzez PKR2. Kluczowy wydaje się jednak wpływ PK1 na komórki niezróżnicowane trofoblastu, które są odpowiedzialne za inwazję trofoblastu.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż moja praca jest pierwszą w piśmiennictwie zajmującą się ekspresją mRNA PK1 i PKR1 w myometrium zdrowych ciężarnych i ciężarnych z ciążą powikłaną PE. Mogę na podstawie tych wyników stwierdzić, iż zjawiska patologiczne powodujące wystąpienie stanu przedrzucawkowego nie zmieniają ekspresji PK1 i PKR1 w myometrium, pomimo iż jest ona generalnie znacznie słabsza niż w łożysku. Wynika stąd moim zdaniem wniosek, iż mięśniówka macicy, jako miejsce na terenie którego dochodzi do nieprawidłowej inwazji trofoblastu w ciążach powikłanych wystąpieniem preeklampsji, nie bierze aktywnego udziału w etiopatogenezie tego powikłania, przynajmniej w aspekcie udziału w nim PK1 i PKR1.

5.2. Omówienie wyników badania poziomu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

Ocena sygnalizacji wewnątrzkomórkowej jest miarą aktywności komórki w odpowiedzi na ligand. Odpowiedź łożyska, czy mięśniówki macicy na ligand (EG-

VEGF) nie była jak dotąd badana, poza pracą Denison i wsp. (75). W piśmiennictwie występują co prawda doniesienia odnośnie występowania białka EG-VEGF w łożysku, czy jego wpływu na produkcję przez kosmki we wczesnej ciąży metalomieloperoksydaz MMP-2 i MMP-9, brak jednak prac oceniających biologiczny wpływ PK1 na aktywność komórek łożyska, oraz nie ma w ogóle prób oszacowania wpływu EG-VEGF na narząd docelowy w inwazji trofoblastu, którym jest myometrium. (41,77)

W badaniu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej *in vitro* jako wyznacznik aktywności komórki przyjąłem współczynnik fosforylowanego białka przekąźnikowego ERK do całkowitego białka ERK (pERK/tERK), czyli stopień fosforylacji pod wpływem stymulacji ligandem. Uzyskałem statystycznie istotną różnicę jedynie w przypadku myometrium w grupie kontrolnej po 30 minutach od stymulacji ligandem (EG-VEGF). Oznacza to, iż jedynie w tej grupie wzrost współczynnika pERK/tERK był znamieny statystycznie. Pomimo tego, wzrost współczynnika pERK/tERK był także wyraźnie obserwowalny po 20 i 30 minutach od stymulacji ligandem zarówno w mięśniu macicy jak i w łożysku grupy kontrolnej; podczas, gdy w grupie badanej nie odnotowałem wzrostu, a nawet zaobserwowałem spadki współczynnika.

W Tabeli 12 przedstawiłem korelację poziomów pERK/tERK z przedziałami czasu (test Spearmana). W grupie kontrolnej wzrost pERK/tERK korelował w czasie, a ponieważ współczynnik korelacji zarówno dla myometrium (M) jak i dla łożyska (p) był dodatni, możemy wyciągnąć stąd wniosek, iż zmienne te rosły wraz z czasem. W grupie badanej natomiast nie obserwuje się statystycznie istotnej korelacji wzrostu pERK/tERK z czasem.

Powyższe rezultaty, mimo że nie wszystkie osiągnęły statystyczną znamienność, sugerują, iż sygnalizacja w komórkach tkanek pobranych od pacjentek z ciążą powikłaną stanem przedzucawkowym jest zaburzona. Może to świadczyć o zaburzeniu w funkcjonowaniu receptorów PKR1 w przypadku ciąż powikłanych stanem przedzucawkowym, gdyż ilościowo nie stwierdza się różnic w występowaniu PKR1 pomiędzy grupami badanymi. Czy zaburzenie funkcji PKR1 polega na zmianach strukturalnych w jego obrębie, czy nieprawidłowej transformacji w odpowiedzi na ligand (PK1) pozostaje niewyjaśnione i wymaga dalszych badań.

Publikacja będąca kontynuacją badania w którym brałem udział podczas pobytu w Edynburgu zawęziła ścieżki sygnalizacyjne, poprzez inkubację próbek łożyska z inhibitorami ścieżek sygnalizacyjnych w komórkach endotelium takimi jak EGFR, c-SRC, Gq, MEK (75). Denison i wsp. również uzyskali najwyższą odpowiedź po 30 minutach inkubacji w grupie kontrolnej. Dodatkowo inkubacja z PK1 zakończyła się fosforylacją EGFR, c-SRC. Jednakże czas początku fosforylacji był różny i wahał się w zależności od hodowanego fragmentu łożyska (pobranych z podobnie zlokalizowanych miejsc w płycie) pomiędzy 10 a 30 minut. Nadal nie wyjaśnioną jest kwestia, czy zmiany te są pierwotne, czy wtórne dla PE. W świetle dotychczasowych publikacji [9,10], a zwłaszcza pracy Huppertza (78), możemy przypuszczać, że zmiany te mogą być przyczyną wystąpienia stanu przedrzucawkowego, zwłaszcza przypadków preeklampsji o późnym początku. By w pełni wyjaśnić charakter zmian w ekspresji i sygnalizacji PK1 i PKR1 w łożysku kobiet z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym konieczne będzie zaprojektowanie prospektywnego badania mogącego ocenić kompleksowo pierwszy, drugi i trzeci trymestr ciąży. W badaniu uwzględnić trzeba będzie zwłaszcza pacjentki z wywiadem sugerującym możliwość wystąpienia PE.

5.3. Omówienie wyników badania metodą immunohistochemiczną ekspresji białka PK1 i PKR1 w łożysku i myometrium

W swoim badaniu analizowałem lokalizację EG-VEGF i jego receptora w łożysku i myometrium. Żadna z dotychczasowych prac w piśmiennictwie światowym nie analizowała występowania PK1, ani PKR1 w myometrium.

Nie stwierdzono różnic w występowaniu PK1 i PKR1 w łożysku i myometrium ciężarnych zdrowych i ciężarnych z ciążą powikłaną wystąpieniem stanu przedrzucawkowego. Ocena miała charakter jakościowy, nie przeprowadzono oceny ilościowej intensywności wybarwienia, jako poziomu ekspresji białka w danej lokalizacji.

Łožysko jest częstym obiektem badania immunohistochemicznego. Porównując wyniki mojego badania z pracą Hoffmann'a i wsp. (41) dochodzę do tego

że są podobne i prowadzą do podobnych wniosków. EG-VEGF jest głównie zlokalizowane w syncytiotrofoblaście, co sugeruje, że jest on miejscem syntezy tej substancji. Silnie zaznaczona obecność PK1 w syncytiotrofoblaście może sugerować, iż ekspresja jego jest zależna od zróżnicowania, a co za tym idzie stopnia inwazji trofoblastu. Potwierdzałyby to uzyskane przez nas wyniki ekspresji mRNA PK1, które wykazują jako jedyną statystycznie istotną większą obecność tej substancji właśnie w łożysku. Badanie Denison i wsp. (75) wykazało obecność PK1 także w cytotrofoblaście i endotelium płodowym. W innej pracy Hoffmann i wsp. (41) sugerują, iż obecność PK1 w syncytiotrofoblaście jest najwyższa pomiędzy 8 a 10 tygodniem ciąży, co może potwierdzać udział PK1 w krytycznym, hipoksycznym okresie placentacji.

Białko receptorowe PKR1 zlokalizowane jest w cytoplazmie komórek syncytiotrofoblastu, a nie w jądrach. W tkance mezenchymalnej kosmków, cytoplazma wybarwiała się jedynie w pojedynczych komórkach, przypuszczalnie komórkach Hofbauera, makrofagach występujących w rdzeniu kosmków. Zatem immunolokalizacja PKR1 jest w łożysku podobna jak PK1, ale inna niż PKR2 (76). Z kolei w swojej pracy Hoffmann (77) wykazuje obecność PKR1 głównie w cytotrofoblaście, słabą jedynie obecność notując w syncytiotrofoblaście i trofoblaście pozakosmkowym, gdzie dominuje PKR2. Jak widać doniesienia co do występowania receptorów PK1 wykazują różnice. Wykazana przeze mnie obecność PKR1 w komórkach Hofbauera może sugerować, iż kompleks PK1/PKR1 może pełnić rolę jako parakryny modulator odpowiedzi immunologicznej w makrofagach łożyskowych.

Mięśniówka macicy jest miejscem nie eksplorowanym jak dotąd w żadnych badaniach pod kątem różnic w lokalizacji PK1 i PKR1. PK1 w komórkach mięśni gładkich macicy ciężarnej lokalizowało się w ich jądrach oraz w jądrach komórek podścieliska. Cytoplazma była niewybarwiona; podobnie wybarwiała się jądra cytotrofoblastu płyty łożyskowej i doczesnej. Ekspresja białka receptorowego PKR1 w mięśni macicy była bardzo słaba i najczęściej negatywna, natomiast na błonie doczesnej immunoreakcja była pozytywna. Prokinetycyny były pierwotnie opisywane jako nowe czynniki mediujące mocny i trwały skurcz mięśniówki gładkiej jelita krętego świnki morskiej (19). Jednakże ostatnie badania (36) przyniosły sprzeczne wyniki, dowodząc, że PK1 powoduje rozkurcz proksymalnego odcinka

mysiego jelita grubego, w którym bierze udział NO. Sugeruje to, iż specyficzne środowisko komórkowe może determinować różne sprzężenie receptorowe i dlatego wywoływać różną manifestację fenotypową. Należy zatem zadać sobie pytanie czy zaburzenia w produkcji PK1 w syncytiotrofoblaście, czy też zaburzenia receptorowe PKR1 obserwowane w moim badaniu w ciążach powikłanych stanem przerzucawkowym mogą wpływać na kurczliwość ludzkiego myometrium podczas ciąży? Czy poprzez zaburzenia kurczliwości, a co za tym idzie poprzez wzrost oporu naczyniowego w tętnicach spiralnych, głównych naczyniach będących przedmiotem zainteresowania badaczy etiopatogenezy stanu przedrzucawkowego, może dojść do wzrostu ciśnienia tętniczego w PE nie wiadomo i wymaga to wyjaśnienia w dalszych badaniach.

6.0 Wnioski

1. W preeklampsji produkcja PK1 jest upośledzona. Na tej podstawie można wysnuć wniosek, że dochodzi w tej chorobie do zaburzeń funkcji wydzielniczej syncytiotrofoblastu.
2. Z powodu braku ilościowych różnic w występowaniu PKR1 pomiędzy grupami badanymi możemy podejrzewać zaburzenia w funkcjonowaniu receptorów PK1 w przypadku cięż powikłanych stanem przedrzucawkowym.
3. W łożysku PK1 i jej receptor w obydwu grupach badanych są głównie zlokalizowane w syncytiotrofoblaście, co sugeruje, iż jest on miejscem syntezy i działania PK1. Ekspresja ligandu i receptora w mięśniu macicy była bardzo słaba i w przypadku receptora najczęściej negatywna. Sugerować to może, iż myometrium nie jest narządem docelowym dla PK1.
4. Ekspresja PK1 jest istotnie statystycznie wyższa w łożysku zdrowych ciężarnych. Nie występują różnice w ekspresji PK1 w myometrium, czy PKR1 w łożysku i myometrium. Stan przedrzucawkowy upośledza produkcję PK1 przez łożysko, a zatem zaburza funkcję wewnątrzwydzielniczą tego narządu.
5. Poziom sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w stanie przedrzucawkowym jest zaburzony. W łożysku i myometrium ciężarnych z ciężą powikłaną stanem przedrzucawkowym brak jest zależności poziomu sygnalizacji od czasu. Preeklampsja może zatem zaburzać funkcjonowanie receptorów PKR1.
6. Nie ma bezpośredniej zależności między lokalizacją występowania białka PK1 i receptora PKR1 w myometrium i łożysku ciężarnych, a występowaniem stanu przedrzucawkowego.

7.0 Streszczenie

Słowa kluczowe: preeklampsja, prokinetycyna 1, receptor prokinetycyny 1, łożysko, myometrium

Wstęp: Stan przedrzucawkowy (PE) jest schorzeniem charakteryzującym się występowaniem nadciśnienia i białkomoczu po 20 tygodniu ciąży. Związany jest ze znaczną zachorowalnością i śmiertelnością okołoporodową noworodków. Nieprawidłowa inwazja trofoblastu w ściany tętnic spiralnych jest, niezależnie od etiologii, podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za początek schorzenia. Wysunięto ostatnio nową hipotezę, sugerującą że prokinetycyna 1 (PK1, analogiczna z EG-VEGF - naczyniowym śródbłonkowym czynnikiem wzrostu pochodzącym z gruczołów dokrewnych) i jej receptor (PKR1) mogą odgrywać ważną rolę w rozwoju łożyska u ludzi. W mojej pracy badałem ekspresję, lokalizację i sygnalizację wewnątrzkomórkową wyzwalaną przez PK1 i PKR1 w ludzkim łożysku i myometrium III trymestru ciąży. Starłem się też ocenić korelację pomiędzy ekspresją PK1 i PKR1 oraz wyzwalaną przez nie sygnalizacją wewnątrzkomórkową a występowaniem PE.

Materiał i metody: Utworzyłem dwie grupy badane: ciężarne chorujące na PE i i zdrowe ciężarne (grupa kontrolna). Tuż po pobraniu materiału tkankowego, fragmentów łożyska i myometrium, był on częściowo umieszczony w RNAlater celem ekstrakcji RNA. Część materiału umieszczano w 4% neutralnym roztworze zbuforowanej formaliny i następnie zatapiano w wosku do badań immunohistochemicznych. Częściowo materiał umieszczano w roztworze RPMI i transportowano do laboratorium gdzie przeprowadzano hodowlę tkankową *in vitro*, a następnie badano sygnalizację wewnątrzkomórkową. Zebrałem i opracowałem 40 łożyskowych i myometrialnych próbek. 19 próbek pochodziło od pacjentek z preeklampsją.

Wyniki: Porównanie ekspresji mRNA PK1 pomiędzy grupami PE a kontrolną w łożysku przy pomocy testu Mann-Whitney wykazało statystycznie istotną zmienność ($p=0,004$). W pozostałych grupach badanych wyniki nie osiągnęły statystycznie istotnej zmienności. W badaniu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (mierzoną współczynnikiem pERK/tERK) uzyskałem statystycznie istotną zmienność w myometrium grupy kontrolnej po 30 minutach od stymulacji ligandem (EG-VEGF). Nie uzyskałem statystycznie istotnej zmienności w pozostałych grupach, pomimo iż widoczny był wzrost współczynnika pERK/tERK w przedziałach czasowych 20 i 30

minut po podaniu ligandu w grupie kontrolnej. W grupie tej współczynnik pERK/tERK korelował w czasie. Nie stwierdziłem różnicy występowania PK1 i PKR1 w łożysku i myometrium w grupie PE i kontrolnej.

Dyskusja: W oparciu o powyższe wyniki możemy wnioskować, iż ilość miejsc receptorowych dla PK1 nie jest zredukowany w PE. Zmniejszona ekspresja mRNA PK1 nie jest zatem zależna od ekspresji mRNA PKR1. Uzyskane wyniki pokazują, iż syncytiotrofoblast (ST) produkuje znacznie więcej PK1 u zdrowych ciężarnych niż u ciężarnych z PE. Z tego powodu możemy stwierdzić, iż w PE produkcja PK1 jest zaburzona, a zatem zaburzone jest funkcjonowanie ST. Czy zaburzenia te są pierwotne czy wtórne musi zostać jeszcze wyjaśnione. Nie stwierdziłem jakościowej różnicy w lokalizacji badanego ligandu (PK1) czy jego receptora (PKR1) pomiędzy grupą PE a kontrolną. Warto podkreślić, iż w mojej pracy po raz pierwszy w piśmiennictwie zajmowałem się ekspresją i lokalizacją PK1 i PKR1 w myometrium jako możliwym miejscu etiologii stanu przedrzucawkowego.

8.0 Abstract

Key words: preeclampsia, prokineticin 1, prokineticin receptor 1, placenta, myometrium, trophoblast invasion

Background: Preeclampsia (PE) is a hypertensive complication of the pregnancy and is associated with significant perinatal morbidity and mortality of the newborns. The improper invasion of the trophoblast into the wall of the spiral arteries is, regardless of the etiology, the basic mechanism responsible for the origin of the placenta. Recently, a new hypothesis has been proposed, suggesting important role of PK1 and PKR1 in human placentation. In our study we investigate the expression, localization, and signaling pathways of PK1 and PKR1 in third-trimester human placenta and myometrium and assess the correlation between the PK1 and PKR1 expression and signaling and the incidence of the PE.

Materials and methods: We designed two study groups: pregnant PE patients and otherwise healthy, pregnant women. Shortly after collection, tissue was placed in RNAlater for RNA extraction, fixed in 4% neutral buffered formalin, and wax embedded for immunohistochemistry or placed in RPMI and transported to the laboratory for *in vitro* culture. We have collected and processed placental and myometrial biopsies from 40 patients. Among those 19 were PE patients.

Results: The PK1 mRNA expression comparison between PE and CTRL in placenta using Mann-Whitney test showed statistically significant difference ($P=0,004$). Those comparisons didn't reach statistical significance in any other groups. There was statistically significant difference in cell signaling (measured with pERK/tERK ratio) in myometrium controls in 30 minutes after ligand stimulation (EG-VEGF/PK1). There was no statistically significant difference between other groups, although the rise in pERK/tERK ratio is clearly visible in time intervals 20 and 30 minutes in controls. In the controls rise in pERK/tERK ratio correlated in time and correlation index was positive, so we can conclude that those variables were rising in time. In PE group there was no statistically significant difference ($P \text{ value} > 0,05$), so the variables didn't rise in time. There was no difference in PK1 and PKR1 localization in the placenta and myometrium of the controls and PE patients.

Discussion: Only in the placenta the comparison of the mRNA expression between PE and control group reached in our data statistical significance ($P=0,004$). We can

therefore conclude that the number of receptor places for PK1 is not reduced in PE. The reduced PK1 mRNA expression is not than dependent on PKR1 mRNA expression. The data obtained shows that ST produces much more PK1 in healthy pregnant women than those suffering from PE. On this basis we can conclude that in PE the production of PK1 is impaired and so are the endocrine functions of the ST. Whether this impairment is primary or secondary to PE needs to be elucidated. It needs to be highlighted that our paper is the first exploring mRNA PK1 and PKR1 expression in the myometrium of the healthy pregnant women and women with pregnancies complicated by the PE. There was no qualitative difference in the localization of the examined ligand nor its receptor between patients with PE and healthy controls. The immunolocalization of the PK1 or PKR1 was never explored in the myometrium hence our study is the first in the literature. The PK1 and PKR1 expression in the smooth muscle cells of the myometrium is generally weak and sometimes negative.

9.0 Piśmiennictwo

1. Mugo M., Govindarajan G., Kurukulasuriya L. R., Sowers R.J., McFarlane S.I. *Hypertension in pregnancy*. Current Hypertension Reports 7:348-354. 2005
2. De Swiet M. *The physiology of normal pregnancy*. W:P.C. Rubin. (red.) Handbook of hypertension. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam-New York-Oxford, tom 10. 1988
3. Leyva F., Coats A. *Nadciśnienie tętnicze u kobiet – ciąża, doustna antykoncepcja i menopauza*. W: Nadciśnienie tętnicze i choroby współistniejące. Gdańsk, Wydawnictwo Via Medica 149 – 167. 2001
4. *National High Blood Pressure Education Programme (USA) – aktualny raport: Podwyższone ciśnienie tętnicze u kobiet w ciąży*. Med. Prakt. 4: 39 – 65, 2001
5. European Society of Hypertension – European Society of Cardiology *Guidelines for the management of the arterial hypertension*. J. Hypertens. 21: 1011 – 1053. 2003
6. Magee L.A., Ornstein M.P., von Dadarszen P. *Management of hypertension in pregnancy*. BMJ 318: 1332 – 6. 1999
7. Sibai B. M. *Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia*. Obstet. Gynecol. 102: 181 – 92. 2003
8. Teliga – Czajkowska J. *Ogólnoustrojowe zaburzenia w przebiegu nadciśnienia ciążowego – zespół HELLP*. Nadciśnienie tętnicze. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków: 729 – 732. 2004
9. O'Brien J. M., Barton J.R. *Cotroversies with the diagnosis and management of the HELLP syndrome*. Clin. Obstet. Gynecol. 48(2): 460 – 77. 2005
10. Sibai B. M. *Diagnosis, controversies and management of the Syndrome of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet Count*. Obstet. Gynecol. 105: 402 – 10. 2004

11. Robillard P.Y., Dekker G.Y., Hulseley T.C. *Revisiting the epidemiological standard of pre-eclampsia. Primigravidity or primipaternity?* Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1999; 84: 37-41
12. Kobashi G. *A case-control study of pregnancy-induced-hypertension with a genetic predisposition: association of a molecular variant of angiotensinogen in Japanese women.* Hok. J. Med. Sci. 2004; 70: 649 - 665
13. Bręborowicz G.H. *Ciąża wysokiego ryzyka.* II wydanie, OWN, Poznań, 2006.
14. Granger J., Alexander B.T., Llinas M.T. *Patophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischaemia with endothelial dysfunction.* Hypertension 2001; 38: 718 - 722
15. Naicker T., Khedun S., Moodley J., Pijnenborg R. *Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia.* Acta Obstet. Gynecol. Scand. 2003; 82: 722 - 729
16. Lorentzen B., Henriksen T. *Plasma lipids and vascular dysfunction in preeclampsia.* Semin. Reprod. Endocrinol. 1998; 16: 33 - 40
17. Darmady J., Postle A. *Lipid metabolism in pregnancy.* Br. J. Obstet. Gynecol. 1982; 82:211 – 215
18. Kanasaki K., Kalluri R. *The biology of preeclampsia.* Kidney Int. 2009 Oct;76(8):831-7. Epub 2009 Aug 5. Review. PubMed PMID: 19657323.
19. Li M., Bullock CM., Knauer DJ., Ehlert FJ., Zhou QY. *Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle.* Mol. Pharmacol. 2001;59:692–698.
20. LeCouter J., Kowalski J., Foster J., Hass P., Zhang Z., Dillard-Telm L., Frantz G., Rangell L., DeGuzman L., Keller GA., Peale F., Gurney A., Hillan KJ., Ferrara N. *Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium.* Nature. 2001;412:877–884.
21. Joubert FJ, Strydom DJ. *Snake venom. The amino acid sequence of protein A from Dendroaspis polylepis polylepis (black mamba) venom.* Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 1980;361:1787–1794.

22. Schweitz H., Bidard JN., Lazdunski M. *Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (Dendroaspis polylepis) venom.* *Toxicon.* 1990;28:847–856.
23. Schweitz H., Pacaud P., Diochot S., Moinier D., Lazdunski M. *MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction.* *FEBS Lett.* 1999;461:183–188.
24. Kaser A., Winklmayr M., Lepperdinger G., Kreil G. *The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions.* *EMBO Rep.* 2003;4:469–473.
25. Mollay C, Wechselberger C., Mignogna G., Negri L., Melchiorri P., Barra D., Kreil G. *Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats.* *Eur. J. Pharmacol.* 1999;374:189–196.
26. Wechselberger C., Puglisi R., Engel E., Lepperdinger G., Boitani C., Kreil G. *The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes.* *FEBS Lett.* 1999;462:177–181.
27. Jilek A, Engel E., Beier D., Lepperdinger G. *Murine Bv8 gene maps near a synteny breakpoint of mouse chromosome 6 and human 3p21.* *Gene.* 2000;256:189–195. .
28. Bullock CM., Li JD., Zhou QY. *Structural determinants required for the bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists.* *Mol. Pharmacol.* 2004;65:582–588.
29. Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Colucci MA, Mignogna G, Barra D, Grohovaz F, Codazzi F, Kaiser A, Kreil G, Melchiorri P. *Biological activities of Bv8 analogues.* *Br. J. Pharmacol.* 2005;146:625–632.
30. Boisbouvier J, Albrand JP, Blackledge M, Jaquinod M, Schweitz H, Lazdunski M, Marion D. *A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis.* *J. Mol. Biol.* 1998;283:205–219.
31. Aravind L, Koonin EV. *A colipase fold in the carboxy-terminal domain of the Wnt antagonists – the Dickkopfs.* *Curr. Biol.* 1998;8:R477–R478.

32. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. *Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor*. J. Biol. Chem. 2002;277:19276–19280.
33. Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M. *Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002;293:396–402.
34. Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K. *Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors*. Biochim. Biophys. Acta. 2002;1579:173–179.
35. Lin R., LeCouter J., Kowalski J., Ferrara N. *Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells*. J. Biol. Chem. 2002;277:8724–8729.
36. Hoogerwerf WA. *Prokineticin 1 inhibits spontaneous giant contractions in the murine proximal colon through nitric oxide release*. Neurogastroenterol. Motil. 2006;18:455–463.
37. Bassil AK., Dass NB., Murray CD., Muir A., Sanger GJ. *Prokineticin-2, motilin, ghrelin and metoclopramide: prokinetic utility in mouse stomach and colon*. Eur. J. Pharmacol. 2005;524:138–144.
38. LeCouter J., Lin R., Tejada M., Frantz G., Peale F., Hillan KJ., Ferrara N. *The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: localization of Bv8 receptors to endothelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003;100:2685–2690.
39. Ferrara N., Frantz G., LeCouter J., Dillard-Telm L., Pham T., Draksharapu A., Giordano T., Peale F. et al. *Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries*. Am. J. Pathol. 2003;162:1881–1893.

40. Fraser HM., Bell J., Wilson H., Taylor PD., Morgan K., Anderson RA., Duncan WC. et al. *Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005;90:427–434.
41. Hoffmann P., Feige JJ., Alfaidy N. *Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy*. Endocrinology. 2006;147:1675–1684.
42. Dorsch M., Qiu Y., Soler D., Frank N., Duong T., Goodearl A., O’Neil S., Lora J., Fraser CC. *PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation*. J. Leukoc. Biol. 2005;78:426–434.
43. LeCouter J., Zlot C., Tejada M., Peale F., Ferrara N. *Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004;101:16813–16818.
44. Melchiorri D., Bruno V., Besong G., Ngomba RT., Cuomo L., De Blasi A., Copani A., Moschella C., Storto M., Nicoletti F., Lepperdinger G., Passarelli F. *The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways*. Eur. J. Neurosci. 2001;13:1694–1702.
45. Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. *Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus*. Nature. 2002;417:405–410.
46. Matsumoto S., Yamazaki C., Masumoto KH., Nagano M., Naito M., Soga T., Hiyama H., Matsumoto M., Takasaki J., Kamohara M., Matsuo A., Ishii H., Kobori M., Katoh M., Matsushime H., Furuichi K., Shigeyoshi Y. *Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006;103:4140–4145.
47. Li JD., Hu WP., Boehmer L., Cheng MY., Lee AG., Jilek A., Siegel JM., Zhou QY. *Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene*. J. Neurosci. 2006;26:11615–11623.

48. Ng KL., Li JD., Cheng MY., Leslie FM., Lee AG., Zhou QY. *Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling*. Science. 2005;308:1923–1927.
49. Dode C., Teixeira L., Leyilliers J., Fouveat C, Bouchard P., Kottler ML., Lespinasse J., Lienhardt-Roussie A., Mathieu M., Moerman A., Murat A., Toubanc JE., Wolczynski S., Delpech M., Petit C., Young J., Hardelin JP. *Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2*. PLoS Genet. 2006;2:1648–1652.
50. Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Metere A., Colucci M., Barra D., Kreil G., Melchiorri P. *Nociceptive sensitization by the secretory protein Bv8*. Br. J. Pharmacol. 2002;137:1147–1154.
51. Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Colluci M., Margheriti F., Melchiorri P., Vellani V., Tian H., De Felice M., Porreca F. *Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior*. J. Neurosci. 2006;26:6716–6727.
52. Negri L., Lattanzi R., Giannini E., De Felice M., Colluci M., Melchiorri P. *Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats*. Br. J. Pharmacol. 2004;142:181–191.
53. Samson M, Peale FV Jr, Frantz G, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Ferrara N. *Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004;89:4078–4088.
54. Dejucq N, Jegou B. *Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001;65:208–231.
55. Hales DB., Diemer T., Hales KH. *Role of cytokines in testicular function*. Endocrine. 1999;10:201–217.
56. Pasquali D., Rossi V., Staibano S., De Rosa G., Chieffi P., Prezioso D., Mirone V., Mascolo M., Tramontano D., Bellastella A., Sinisi AA. *The endocrine gland derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) /prokineticin 1 and 2 and*

receptor expression in human prostate: up-regulation of EG-VEGF /prokineticin 1 with malignancy. Endocrinology. 2006;147:4245–4251.

57. Battersby S., Critchley HO., Morgan K., Millar RP., Jabbour HN. *Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004;89:2463–2469.

58. Zhang L., Yang N., Conejo-Garcia JR., Katsaros D., Mohamed-Hadley A., Fracchioli S., Schlienger K., Toll A., Levine B., Rubin SC., Coukos G. *Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma.* Clin. Cancer Res. 2003;9:264–272.

59. Kisliouk T., Podlovni H., Spanel-Borowski K., Ovadia O., Zhou QY., Meidan R. *Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells.* Endocrinology. 2005;146:3950–3958.

60. Kisliouk T., Podlovni H., Meidan R. *Unique expression and regulatory mechanisms of EG-VEGF/prokineticin-1 and its receptors in the corpus luteum.* Ann. Anat. 2005;187:529–537.

61. Ngan ES., Lee KY., Yeung WS., Ngan HY., Ng EH., Ho PC. *Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma.* Endocrinology. 2006;147:88–95.

62. Horne AW, White JO, Lalani EN. *The endometrium and embryo implantation. A receptive endometrium depends on more than hormonal influences.* BMJ. 2000;321:1301–1302.

63. Martel D., Malet C., Gautray JP., Psychoyos A. *Surface changes of the luminal uterine epithelium during the human menstrual cycle: a scanning electron microscopic study.* In: de Brux J, et al., editors. *The Endometrium: Hormonal Impacts.* Plenum Press; 1981. p. 15.

64. Plaks V., Kalchenko V., Dekel N., Neeman M. *MRI analysis of angiogenesis during mouse embryo implantation.* Magn. Reson. Med. 2006;55:1013–1022.

65. Dosiou C, Giudice LC. *Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives*. *Endocr. Rev.* 2005;26:44–62.
66. Clark DE., Smith SK., Sharkey AM., Charnock-Jones DS. *Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy*. *Hum. Reprod.* 1996;11:1090–1098.
67. Kaufmann P., Mayhew TM., Charnock-Jones DS. *Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy*. *Placenta.* 2004;25:114–126.
68. Chung JY., Song Y., Wang Y., Magness RR., Zheng J. *Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;89:2484–2490.
69. McClure N., Healy DL., Rogers PA., Sullivan J., Beaton L., Haning RV Jr., Connolly DT., Robertson DM. *Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome*. *Lancet.* 1994;344:235–236.
70. Bouley R., Sun TX., Chenard M., McLaughlin M., McKee M., Lin HY, Brown D., Ausiello DA. *Functional role of the NPxxY motif in internalization of the type 2 vasopressin receptor in LLC-PK1 cells*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003;285:C750–C762.
71. Kalatskaya I., Schussler S., Blaukat A., Muller-Esterl W., Jochum M., Proud D., Faussner A. *Mutation of tyrosine in the conserved NPXXY sequence leads to constitutive phosphorylation and internalization, but not signaling, of the human B2 bradykinin receptor*. *J. Biol. Chem.* 2004;279:31268–31276.
72. Chen J., Kuei C., Sutton S., Wilson S., Yu J., Kamme F., Mazur C., Lovenberg T., Liu C. *Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1*. *Mol. Pharmacol.* 2005;67:2070–2076.
73. Jin-Young Chung, Yang Song, Yuping Wang, Ronald R. Magness and Jing Zheng, *Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Endocrine Gland Derived-VEGF, and VEGF Receptors in Human Placentas from*

Normal and Preeclamptic Pregnancies, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 89, No. 5 2484-2490

74. Rasmussen S, Irgens LM. *Pregnancy-induced hypertension in women who were born small*. Hypertension. 2007 Apr;49(4):806-12.
75. Denison FC, Battersby S, King AE, Szuber M, Jabbour HN. *Prokineticin-1: a novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta*. Endocrinology. 2008 Jul;149(7):3470-7. Epub 2008 Mar 27.
76. Hoffmann P, Feige JJ, Alfaidy N. *Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor-1) and PKR2 throughout mouse gestation*. Placenta. 2007 Oct;28(10):1049-58.
77. Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, Graham CH, Schaal JP, Mazouni C, Feige JJ, Alfaidy N. *Role of EG-VEGF in human placentation: physiological and pathological implications*. J Cell Mol Med. 2008 Oct 16.
78. Huppertz B. *Placental Origins of Preeclampsia: Challenging the Current Hypothesis*, Hypertension 2008;51;970-975
79. Valensise H., Vasapollo B., Gagliardi G. and Novelli GP. *Early and Late Preeclampsia: Two Different Maternal Hemodynamic States in the Latent Phase of the Disease*, Hypertension 2008;52;873-880
80. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM, *Subclassification of preeclampsia*, Hypertension in Pregnancy. 2003;22(2):143-8
81. Nicolaides KH, Bindra R, Turan OM, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, Tal J, Cuckle HS. *A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound*. Ultrasound Obstet Gynecol. 2006;27:13–17.
82. Pilalis A, Souka AP, Antsaklis P, Basayiannis K, Benardis P, Haidopoulos D, Papantoniou N, Mesogitis S, Antsaklis A. *Screening for pre-eclampsia and small for gestational age fetuses at the 11–14 weeks scan by uterine artery Dopplers*. Acta Obstet Gynecol Scand. 2007;86:530–534