

## تغییر در ترکیبات غشاء پایه رگهای آندومتر در مصرف‌کنندگان نورپلانت

معضومه سیمبر، مرکز ملی تحقیقات بهداشت باروری،

ایران س. فرایزر

### The Study of Alteration of Endometrial Basement Membrane Composition in Norplant Users ABSTRACT

Breakthrough Bleeding (BTB) is the cause of 50% of discontinuations of use by long-acting progestogen-only contraceptive users. BTB appears to be associated with capillaries of abnormal morphology and fragility. Disturbances in vessels integrity, intercellular junctions or alteration of the basement membrane (BM) composition has been proposed to contribute toward the fragility of these capillaries.

In a clinical trial study, thirty-four healthy fertile volunteers were studied before and during use of levonorgestrel releasing subdermal contraceptive implant Norplant. Three endometrial biopsies were taken from each volunteer, one before insertion and two at different time intervals after exposure to Norplant. Then three major components of BM of endometrial vessels; Collagen IV (CIV), laminin and heparan sulphate proteoglycan (HSPG) were immunostained and studied. The density of immunostained vessels by each antibody were measured and compared with density of vessels stained by CD34. Double immunostain of CD34 and laminin was also used for demonstration of vessels without BM.

Significant decrease in vascular density showing BM components were shown in the study. The density of laminin-, CIV- and HSPG-positive vessels were decreased from  $176 \pm 8$ ,  $166 \pm 6.6$  and  $61 \pm 6$  vessels/mm<sup>2</sup> (Mean  $\pm$  SEM) in the endometrium of Norplant acceptors before use control samples to  $156 \pm 6$ ,  $144 \pm 6.2$  and  $33 \pm 2.9$  in the endometrium of Norplant acceptors after 2 to 13 weeks Norplant exposure, respectively ( $P < 0.05$ ). This was occurring at the same time as the overall density of small vessels in Norplant exposed endometrium was showing increase. Significant decrease was also demonstrated over 13 to 42 weeks of use in the densities of laminin and HSPG - positive vessels compared with control ( $P < 0.05$ ), although decrease in the density of CIV positive vessels was not significant.

Percentages of vessels showing BM were also calculated in the study. Significant decrease in the percentages of vessels showing BM were demonstrated after 2 to 13 weeks of Norplant use. The percentages of CD34 positive vessels showing laminin-CIV- and HSPG-positive BM in control samples were  $97 \pm 3\%$ ,  $88 \pm 3\%$  and  $31 \pm 2\%$  (Mean  $\pm$  SEM) which significantly decreased to  $79 \pm 3\%$ ,  $75 \pm 4\%$  and  $20 \pm 2\%$  in Norplant users, respectively ( $P < 0.05$ ).

Decrease in the percentage of vessels showing BM was thought to be due to disturbances in the integrity of BM in endometrial vessels of women using Norplant which could be a cause for the fragility of the vessels. The decrease could also be due to decrease in the density of arteriols and increase in the density of venules and appearance of solid cords of endothelial cells. Double immunostaining of the endometrial vessels with anti-CD34 and anti-laminin clearly demonstrated loss of BM or weak staining of BM in the endometrial vessels of Norplant users.

Clarification of the local mechanisms which leads to capillary fragility and abnormal endometrial bleeding may lead to the development of better treatments or prevention and ultimately improve the acceptability of these contraceptives.

**Key Words:** Breakthrough Bleeding; levonorgestrel; Basement Membrane; Vessels; Laminin; Collagen IV; Heparan sulphate proteoglycan; Norplant

## چکیده

علت ۵۰٪ از موارد قطع مصرف کتراسپتوهای حاوی پروژسترون تنها، خونریزی‌های غیرطبیعی (BTB) Breakthrough Bleeding می‌باشد که با تغییر در شکل و شکننده شدن دیواره مویرگها همراه است. تغییرات ساختمانی و ترکیباتی غشاء پایه می‌تواند منشأ شکنندگی مویرگهای آندومتر در مصرف‌کنندگان این وسایل باشد.

در یک مطالعه کارآزمایی بالینی، ۳۲ زن سالم بارور داوطلب قبل و در زمان استفاده از کاشتنی‌های زیرجلدی آزادکننده لونورجسترل نورپلانت مورد مطالعه قرار گرفتند. از هر زن سه بیوپسی از آندومتر، یکبار قبل از گذاشتن نورپلانت و دو بار پس از استفاده از نورپلانت گرفته شد. سپس با استفاده از روشهای ایمونوهیستوکیماکال لامینین، کلاژن IV و هپارن سولفات پرتوگلیکن موجود در غشاء پایه رگهای آندومتر رنگ‌آمیزی و مورد مطالعه قرار گرفت. تراکم رگهای رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی هر یک از آنها شمارش شد و با تراکم رگهای رنگ‌آمیزی شده با آنتی CD34 مقایسه گردید. رنگ‌آمیزی دوگانه CD34 و لامینین جهت نشان دادن رگهای بدون غشاء پایه نیز بکار برده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که، کاهش معنی‌داری در تراکم رگهای رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادی‌های مواد تشکیل‌دهنده غشاء پایه رخ می‌دهد، بطوری که تعداد رگهای آنتی‌لامینین - مثبت  $8 \pm 1179$ ، آنتی‌کلاژن IV - مثبت  $7 \pm 166$  و آنتی‌هپارن سولفات پرتوگلیکن  $6 \pm 61$  (میانگین  $\pm$  خطای معیار) رگ در  $mm^2$  در آندومتر طبیعی است که به ترتیب به تعداد  $6 \pm 156$ ،  $6 \pm 144$  و  $3 \pm 24$  رگ در  $mm^2$  پس از ۱۳-۲ هفته مصرف نورپلانت کاهش می‌یابد ( $P=0/01$ ). این کاهش علیرغم افزایش تراکم رگهای کوچک رنگ‌آمیزی شده با آنتی CD34 رخ می‌دهد [  $17 \pm 254$  رگ در  $mm^2$  پس از ۱۳-۲ هفته مصرف نورپلانت در مقایسه با  $8 \pm 193$  و قبل از مصرف نورپلانت،  $P=0/001$ ]. کاهش تراکم رگهای رنگ‌آمیزی شده با آنتی‌بادیهای اجزای غشاء پایه، نه تنها در سه ماه اول پس از استفاده از نورپلانت رخ می‌دهد، بلکه پس از سه ماه تا یکسال پس از استفاده از نورپلانت نیز مشاهده شد.

در این مطالعه همچنین درصد رگهایی که غشاء پایه را نشان می‌دهند، نیز محاسبه گردید. کاهش معنی‌داری در نسبت رگهایی که

غشاء پایه را نشان می‌دهند در مصرف‌کنندگان نورپلانت نشان داده شد. درصد رگهای CD34 مثبت که لامینین - مثبت، CIV - مثبت و HSPG - مثبت نیز بودند، به ترتیب از  $3 \pm 97$ ،  $3 \pm 88$  و  $2 \pm 31$  در آندومتر طبیعی به  $3 \pm 79$ ،  $4 \pm 75$  و  $2 \pm 20$  پس از مصرف نورپلانت ( $P < 0/05$ ) کاهش می‌یابد.

کاهش درصد رگهای کوچک آندومتر که غشاء پایه را نیز نشان می‌دهند، می‌تواند علت شکنندگی این رگها باشد. همچنین این کاهش می‌تواند به علت پدیدار شدن رشته‌هایی از سلولهای آندوتلیالی باشد که فاقد ساختمان لوله‌ای شکل هستند و یا ممکن است که بدلیل کاهش آرتریولها و افزایش سیاهرگها باشد. با رنگ‌آمیزی دوگانه رگها با آنتی CD34 و آنتی‌لامینین، فقدان غشاء پایه و یا کم‌رنگ بودن و ضعف آن به وضوح نشان داده شد.

شناخت مکانیسمهای موضعی خونریزی آندومتر رهگشایی برای پیدا کردن روش مناسب برای پیشگیری و درمان مناسب این نوع خونریزی و در نهایت افزایش میزان پذیرش این روشهای جلوگیری خواهد بود.

## مقدمه

تحقیقات نشان داده است که شکنندگی مویرگها، منشأ خونریزی در مصرف‌کنندگان وسایل جلوگیری از بارداری حاوی فقط پروژسترون می‌باشد (۳،۲،۱). اختلال و تغییر در ترکیب غشاء پایه می‌تواند موجب شکنندگی رگها و مویرگها باشد.

سلولهای آندوتلیال توسط غشاء پایه که نوع تخصص یافته ماتریکس بین سلولی هستند و در رشد، تکامل و انجام اعمالشان دارای اهمیت فراوانی می‌باشند احاطه گردیده‌اند. غشاء پایه نه تنها پوششی است که حفاظت و اتصال سلولها را بعهده دارد، بلکه محدوده بافتی را مشخص کرده و مانند فیلتری با قدرت نفوذ انتخابی عمل می‌نماید. تغییر در ساختمان غشاء پایه موجب تغییر در اعمال سلول نظیر حرکت، پرولیفراسیون و سنتز پروتئین خواهد شد (۴،۵،۶).

غشاء پایه رگها ترکیبی از چند ماکرومولکول مانند، لامینین (Lam)، کلاژن IV (CIV)، هپارن سولفات پرتوگلیکن (HSPG)، تیدروژن و احتمالاً آتناکتین است (۷،۸) که توسط خود

آندومتر با استفاده از روشهای ایمونوهیستوکمیکال مورد بررسی قرار دهیم. در این مطالعه سه ترکیب اصلی غشاء پایه رگهای آندومتر، لامنین، کلاژن IV، هپارن سولفات پروتوگلیکن مورد بررسی قرار گرفت.

### هدف

هدف خاص این مطالعه بررسی اثر لوونورجسترل موجود در نورپلانت بر ساختمان غشاء پایه رگهای آندومتر، با استفاده از روشهای هیستوکمیکال بود. این مطالعه تغییر در تراکم رگهای رنگ آمیزی شده با آنتی بادی اجزای تشکیل دهنده غشاء پایه را در زمان استفاده از نورپلانت با پیش از مصرف آن مقایسه کرد و برای اولین بار از همان افراد برای بررسی تغییرات زمانی ساختمان رگهای آندومتری که تحت تأثیر لوونورجسترل قرار گرفته بودند در مقایسه با سیکل طبیعی قبلی خود آنان استفاده کرد. استفاده از همان زنان بعنوان کنترل خود آنان ارزیابی این تغییرات را اعتبار بیشتری می بخشد. تراکم رگها در انواع مختلف آندومتر از لحاظ هیستولوژیک در مصرف کنندگان نورپلانت مقایسه گردید.

## روش و مواد

**افراد مورد مطالعه:** این مطالعه به بررسی آزمایشگاهی رگهای آندومتر در گروهی متشکل از ۳۴ زن داوطلب استفاده از نورپلانت، قبل و در زمان استفاده از نورپلانت می پرداخت. افراد ۲۰ تا ۴۰ ساله ای که حداقل صاحب یک فرزند سالم بودند و دچار بیماریهایی همچون بیماریهای قلبی - عروقی - کلیوی - شکنندگی مویرگها - اختلالات خونی نبودند و فاقد پاتولوژی داخل رحمی بودند وارد مطالعه گردیدند.

این مطالعه در دپارتمان زنان و زایمان دانشگاه سیدنی و مرکز تحقیقات بهداشت باروری سیدنی انجام گردید.

این افراد با اطلاع کامل از شرایط مطالعه و پس از پر کردن فرم اجازه نامه در این مطالعه شرکت جستند. تأیید کمیته های اخلاقی انجمن تنظیم خانواده و انجمن جمعیت نیز برای این مطالعه گرفته شد.

از داوطلبین تقاضا گردید تا چارت ثبت وضعیت قاعدگی خود

سلولها ساخته شده و قادر به انجام واکنش با یکدیگر و نیز دارای تأثیر بر رفتار سلول هستند (۹). دو جزء اصلی غشاء پایه، لامنین و کلاژن IV می باشند. لامنین در اتصال سلولها، رشد و تکامل و مهاجرت سلولهای آندوتلیال نقش عمده ای را ایفا می کند (۱۱،۱۰) و دارای سایتهای فعالی است که در پروسه آنژیوژنز و تشکیل تیوب شرکت می جویند (۱۲،۱۳،۱۴،۱۵). لامنین نقش خود را در پروسه آنژیوژنز، از طریق افزایش فعالیت پروتینازهایی که در تشکیل کاپیلاریها دارای اهمیت می باشند نیز ایفا می کند (۱۵،۱۶). کلاژن IV همانند داربستی در ساختمان غشاء پایه عمل می کند (۱۷) و وظیفه اصلی HSPG در کنترل رشد سلولهای آندوتلیال است (۱۸). استروژن، پروژسترون و پروژستروژنها در تشکیل غشاء پایه در آندومتر نقش مهمی را ایفا می کنند (۱۹، ۲۰) شواهدی مانند: تجمع دوره ای و تدریجی لامنین و کلاژن IV، در اطراف سلولهای استرومایی (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴، ۲۵) مشاهده ضعف و منفصل بودن غشاء پایه در اوایل فاز پرولیفراتیو و محکمتر شدن تدریجی آن، که با میکروسکوپ الکترونیکی نشان داده شده است (۲۶)، کاهش شدت رنگ آمیزی HSPG موجود در غشاء پایه رگها در فاز خونریزی سیکل قاعدگی (۲۷) همگی دال بر این مدعا است.

مطالعات ایمونوهیستوکمیکال انجام شده بطور خاص بر روی غشاء پایه رگهای آندومتر طبیعی، نشان داده است که رنگ آمیزی کلاژن IV و لامنین در انواع مختلف رگ و در مراحل مختلف سیکل قاعدگی تفاوتی ندارد و این دو جزء در کل رگهای موجود در آندومتر وجود دارند، در حالیکه در رنگ آمیزی با آنتی HSPG حدود ۵۵٪ از کل رگها رنگ آمیزی می شود (۲۷). مطالعه دیگری از همین نوع بر رگهای آندومتر طبیعی، شدت رنگ آمیزی غشاء پایه را در اوایل و اواسط فاز ترشهی سیکل طبیعی قاعدگی با شدت کمتری نشان داد. شدت رنگ آمیزی کلاژن IV و لامنین موجود در ماتریکس بین سلولی در آندومتر مصرف کنندگان نورپلانت شدیدتر و وسیعتر از فاز ترشهی سیکل طبیعی قاعدگی نشان داده شده است (۲۸).

اگرچه اثر پروژسترون و پروژستروژنها بر روی غشاء پایه رگها به اثبات رسیده است، اما نحوه این اثر، و تأثیر احتمالی پروژستروژنها بر اختلالات غشاء پایه رگهای آندومتر و فراهم کردن موجبات شکنندگی آنها و ایجاد خونریزیهای نامنظم رحمی در طول استفاده از کونتراسپتیوهای هورمونی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است.

لذا در این مطالعه، ما بر آن شدیم تا اثر کاشتنی زیرپوستی آزادکننده لوونورجسترل، نورپلانت را بر ساختمان غشاء پایه رگهای

استفاده از نورپلانت گرفته شد. این بیوپسی ها با استفاده از Pipplic suction انجام می گرفت. بیوپسی های آندومتری که پس از استفاده از نورپلانت جمع آوری می گردید، به دو گروه ۲-۱۳ هفته پس از استفاده و ۱۴ تا ۴۲ هفته پس از استفاده از نورپلانت تقسیم گردید.

### روش ایمنونوهیستوکمیستری جهت رنگ آمیزی نمونه ها

بیوپسی آندومتر بدست آمده از نمونه ها طی مراحل زیر مورد رنگ آمیزی قرار گرفت.

پس از گرفتن بیوپسی، سه بار بافت آندومتر در بافر فسفات سالین (PBS) شسته می شد و در بافر فرمالین ۱۰٪ به مدت ۸ ساعت فیکس می گردید و برای جلوگیری از فیکساسیون بیش از حد بافت به PBS منتقل می شد و در ۴°C برای ۸ تا ۱۲ ساعت تا زمان برش نگهداری می گردید. پس از مراحل دهیدراتاسیون، کلیرینگ و ایفتلتراسیون، قالب بندی می گردید. سپس بافت های قالب بندی شده توسط میکروتوم به ضخامت ۵ μm برش داده می شد و بر آب ۴۰°C شناور می گردید و سپس بر اسلایدهای سایلانایز شده گذارده و خشک می گردید. رنگ آمیزی این اسلایدها پس از مراحل دیپارافینازاسیون و رهایدراسیون انجام می گرفت.

برای رنگ آمیزی اجزاء غشاء پایه رگهای آندومتر نیاز به مرحله پروتولیتیک دایجست (Proteolytic Digestion) برای unmusk کردن نواحی آنتی ژنتیک بود. بدین منظور پروتیناز K (DAKO) در ۲ ml محلول رقیق کننده آنتی بادی به مدت ۳ دقیقه بر روی بافت نمونه آندومتر، در حرارت اتاق انکوبات می شد. و سپس با تریس بافر سالین (TBS) به ملایمت آبکشی می گردید و به مدت ۵ دقیقه در محلول TBS قرار می گرفت.

قبل از انجام رنگ آمیزی نیاز به مرحله Target Retrieval بود. برای انجام این مرحله، یک ظرف از نوع کاپلین با مقدار کافی از محلول Target Retrieval پر می گردید و سپس برش ها در ظرف حاوی محلول قرار داده می شد. ظرف در ماکروویو گذارده می شد تا با قدرت زیاد، به سرعت به مرحله جوش برسد و به محض جوش آمدن، دستگاه خاموش می گردید تا محلول فرصت خنک شدن بیابد. بدنبال آن، ظرف حاوی اسلایدها باری دو دوره ۵ دقیقه ای دیگر، به فاصله یک دقیقه، اما این بار با قدرت پایین مایکروویو، در داخل دستگاه قرار می گرفتند. در طول انجام این مرحله می بایست دائماً مقدار محلول داخل ظرف چک شود؛ تا در صورت لزوم به

را بطور روزانه کامل کنند. تعداد روزهای خونریزی با محاسبه تعداد روزهای لک بینی خونریزی در طول ۳۰ روز قبل از گرفتن بیوپسی آندومتر بدست آمد.

تاریخ گذاری دوره قاعدگی بر اساس نمای هیستولوژیک آندومتر و بر طبق گروه بندی نويز و همکاران انجام گرفت (۴۷). طبقه بندی هیستولوژیک راجرز و همکارانش نیز برای طبقه بندی هیستولوژیک بیوپسی مصرف کنندگان نورپلانت به شرح زیر مورد استفاده واقع شد:

پرولیفراتیو: مشابه فاز پرولیفراتیو سیکل قاعدگی طبیعی است. ترشحي: مشابه فاز ترشحي سیکل قاعدگی طبیعی است.

ریزش: آثار ریزش، مثل شکستن بافت و لخته های فیبرین وجود دارد، اما آثاری از فاز ترشحي قبلی وجود ندارد.

آتروفیک: آندومتر آتروفیک است. بافت بسیار کم با استرومای غلیظ و کاهش غدد با سلولهای اپی تلیال مکعبی مشاهده می شود.

پروژستوژنیک: آثار پروژستوژنیک خارجی مانند غدد کوچک با اپی تلیوم مکعبی یا استوانه ای کوتاه و استروما با دسیدوای کاذب وجود دارد.

میومتر و آندومتر بازال: ظاهر آن مانند بازالیس روی میومتر است. اپی تلیوم سطحی در این نمونه ها وجود ندارد، در این مطالعه تراکم رگهای کوچک فقط برای بافت شبیه بازال معین گردید.

بیوپسی های آندومتر با هماتوکسلین و اتوزین رنگ آمیزی شد و توسط متخصص زنان پاتولوژیست طبقه بندی گردید. بیوپسی هایی که دارای اندازه و کیفیت کافی نبودند از مطالعه خارج گردیدند. نتیجه این طبقه بندی ۳۲ بیوپسی از داوطلبین نورپلانت گذاری قبل از گذاشتن نورپلانت (گروه کنترل) و ۵۸ بیوپسی در زمان استفاده از نورپلانت (گروه درمان) بود.

### روش جمع آوری نمونه های آندومتر

بیوپسی های آندومتر از افراد مراجعه کننده به انجمن تنظیم خانواده نیوساوت که داوطلب شرکت در مطالعه بوده و دارای سیکل طبیعی بوده و از وسایل پیشگیری از حاملگی هورمونی استفاده نمی کردند، گرفته شد. بیوپسی ها درست قبل از گذاشتن نورپلانت، با استفاده از راکت کورت در اواسط فاز ترشحي آندومتر گرفته شد. از شرکت کنندگان در مطالعه درخواست گردید تا بعداً برای گرفتن دو بیوپسی دیگر به کلینیک مراجعه کنند. اولین بیوپسی بین ۱ تا ۶ ماه پس از استفاده از نورپلانت و دومین بیوپسی بین ۳ تا ۶ ماه پس از

روی بافت آندومتر بکار برده می‌شد. پس از آبکشی و دوبار حمام TBS بافت، هر بار به مدت ۲ دقیقه، کروموزن ۳-دی آمینو بنزاداین تتراهیدرات - ۹- اتیل (DAB) برای قابل مشاهده کردن لامینین، CIV و HSPG موجود در غشاء پایه دیواره مویزگها، برای مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق بر روی بافت انکوبات می‌گردید. پس از یک آبکشی آرام با آب، اسلاید توسط هماتوکسیلین رنگ آمیزی می‌شد و توسط فارامونت DAKO و لامل مورد پوشش قرار می‌گرفت. جهت رنگ آمیزی کلیه رگهای موجود در آندومتر از DAKO Envision detection System Peroxidase (AEC) [Universal K1393] استفاده گردید و نیز آنتی CD34 (Mouse monoclonal, clone QB-END/10 Novacastra) به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق استفاده می‌شد در این سیستم مراحل رنگ آمیزی همانند مراحل فوق الذکر است، به جز اینکه فاند مراحل پروتئولیتیک دایجست و Target Retrieval است و نیز به جای کروموزن DBA از کروموزن AEC به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق استفاده می‌گردید.

روش شمارش رگهای آندومتر بدین قرار بود که رگهای رنگ آمیزی شده توسط DAB یا AEC با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر میکروسکوپ در ۳۰ محل مختلف بافت که بطور تصادفی انتخاب می‌گردید و مورد شمارش قرار می‌گرفت.

جهت مشاهده دقیقتر وضعیت غشا پایه رگهای آندومتر، تعداد محدودی از نمونه‌ها مورد رنگ آمیزی دوگانه (Double Immunohistochemical Staining) با آنتی CD34 مونوکلونال موشی با رقت ۱:۲۵ و آنتی لامینین پلی کلونال خرگوشی با رقت ۱:۲۵ (Rabbit anti-laminin, Prod. no. Z0097, DAKO, ۱:۲۵ P.C, 480mg/l) قرار گرفتند. بدین منظور از DAKO Double stain Kit استفاده گردید. در این سیستم مراحل دیپارافینزاسیون، رهیدراتاسیون، پروتئولیتیک دایجست، Target retrieval peroxidase Blocking همانند پروسه قبل انجام می‌شد. مخلوطی از آنتی CD34 و آنتی لامینین تهیه می‌گردید و به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷ °C بر روی بافت نمونه انکوبات می‌گردید. در این مرحله محلول کنترل نگاتیو موجود در خود کیت مورد استفاده قرار می‌گرفت. مراحل مربوط به Link آنتی بادی، آلکالین فسفاتاز - آنتی آلکالین فسفاتاز و پراکسیداز - آنتی پراکسیداز، به ترتیب و پس از آبکشی با TBS و حمام TBS بدینال هر مرحله و هر یک به مدت ۳۰ دقیقه انجام می‌گردید Fast red system جهت رنگ آمیزی

دائماً مقدار محلول داخل ظرف چک شود، تا در صورت لزوم به محلول اضافه گردد و از کاهش فراوان محلول و خشک شدن نمونه‌ها اجتناب بعمل آید. سپس ظرف از مایکروویو خارج می‌شد و به مدت ۲۰ دقیقه جهت خنک شدن در حرارت اتاق گذارده می‌شد. اسلایدها توسط آب مقطر شسته می‌شد و بعد در TBS قرار می‌گرفت.

جهت خنثی کردن فعالیت پراکسیداز داخلی بافت از هیدروژن پراکسیداز استفاده می‌شد. این مرحله به لحاظ وجود مقدار زیادی سلولهای قوز خونی در بافت آندومتر در این مطالعه ضروری بود. برای انجام این مرحله، ماده بلوکه کردن پراکسیداز ز کیست DAKO Envision به مقدار کافی برای پوشاندن کامل نمونه بکار برده می‌شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق گذارده می‌شد و سپس توسط آب خالص شسته می‌شد و دوبار، هر بار به مدت ۲ دقیقه در TBS قرار داده می‌شد.

برای بلوکه کردن رنگ آمیزی غیرخاص که ممکن است باعث اتصال پروتئین آنتی بادی به عناصر پرچارج بافت همبندی و کلاژن اتفاق افتد و موجب رنگ آمیزی مثبت غیرخاص شود، پس از خشک کردن اطراف نمونه، سرم ۵٪ خوک به مقدار کافی برای پوشاندن نمونه بکار برده می‌شد و به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق گذارده می‌شد و بعد طوری پاک می‌گردید که موجب رقیق شدن ماده بعدی نگردد.

پس از این مراحل نوبت اضافه کردن آنتی بادی اولیه بود. بدین منظور آنتی لامینین (پلی کلونال خرگوش) با رقت ۱:۳۰۰۰ به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷ °C انکوباتور، آنتی CIV با رقت ۱:۵۰ به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق و آنتی HSPG با رقت ۱:۲۵ به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷ °C انکوباتور گذارده می‌شد و پس از آبکشی ملایم و دوبار حمام با محلول TBS، هر بار به مدت ۲ دقیقه، مرحله بعدی آغاز می‌گشت.

قابل ذکر است که در هر نوبت از رنگ آمیزی یک اسلاید از آندومتر طبیعی بعنوان کنترل نگاتیو نیز گذارده می‌شد. ماده کنترل نگاتیو (DAKO<sup>R</sup>, Product No. L1826) با همان رقت و زمان انکوباسیون و درجه حرارت بر روی نمونه به کار برده می‌شد. آندومتر طبیعی نیز بعنوان کنترل مثبت در این آزمایش مورد استفاده قرار می‌گرفت.

پس از مصرف آنتی بادی اولیه مرحله استفاده از پلیمر پراکسیداز لایبل شده بود که این ماده به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق بر

۱۷ ± ۲۵۴ پس از ۲ تا ۱۳ هفته مصرف نورپلانت می‌رسید (paired t-test, P < ۰/۰۵, n = ۲۲). همچنین افزایشی معنادار از میزان ۷ ± ۱۸۶ پیش از مصرف به میزان ۱۰ ± ۲۱۳ رگ در mm<sup>2</sup> پس از ۱۴ تا ۴۲ هفته مصرف نورپلانت (P < ۰/۰۵, n = ۳۴).  
 (Paired t-test) مشاهده می‌گردید.

درصد رگهای CD34 مثبتی که لامینین - کلاژن IV- و HSPG- مثبت نیز بودند، به ترتیب از ۳/۳ ± ۰/۹۳، ۴ ± ۰/۸۶، و ۳/۳۱ ± ۰/۳ قبل از مصرف نورپلانت به میزان ۳/۳ ± ۰/۶۵، ۵ ± ۰/۶۲ و ۲/۱۹ ± ۰/۲ پس از ۲ تا ۱۳ هفته مصرف نورپلانت کاهش معناداری می‌یافت (paired t-test, P < ۰/۰۵, n = ۳۴).

درصد رگهای CD34 مثبتی که لامینین - کلاژن IV- و HSPG- مثبت نیز بودند، به ترتیب از ۳/۳ ± ۰/۹۷، ۳ ± ۰/۸۸، و ۳/۳۱ ± ۰/۲ قبل از مصرف نورپلانت به ترتیب به میزان ۳/۳ ± ۰/۷۹، ۴ ± ۰/۷۵ و ۲/۲ ± ۰/۲۰ پس از ۱۴ تا ۴۲ هفته مصرف نورپلانت کاهش معناداری می‌یافت (Paired t-test, P < ۰/۰۵, n = ۳۴). تصاویر ۷ تا ۱۰ رگهای فاقد غشای پایه و یا با غشاء پایه ضعیف را نشان می‌دهد. تراکم رگهای لامینین -، کلاژن IV- و HSPG- مثبت در وضعیتهای مختلف هیستولوژیک آندومتر مصرف‌کنندگان نورپلانت در این مطالعه تفاوت معناداری را نشان نداد.

(CIV, F = ۱/۵۵, P = ۰/۲؛ HSPG, F = ۰/۹۹, P = ۰/۴۲)

(Laminin, F = ۱/۳, P = ۰/۲۸)

نمودار ۱ و ۲ میانگین تراکم رگها را در وضعیتهای مختلف هیستولوژیک مختلف آندومتر در آندومتر طبیعی قبل از مصرف نورپلانت و نیز پس از مصرف نورپلانت به ترتیب نشان می‌دهد.

ارتباط معناداری نیز بین تراکم رگهای لامینین -، کلاژن IV- و HSPG- مثبت با طول مدت مصرف نورپلانت، سطح سرمی استروژن و پروژسترون و نیز تعداد روزهای لکبینی / خونریزی مشاهده نگردید. در نمونه‌های کنترل، رنگ‌آمیزی در غشاء پایه اطراف رگها و غدد، لامینین، کلاژن IV و HSPG، بصورتی بسیار دقیق و خطی نشان داده شد. علیرغم عدم وجود HSPG، لامینین و کلاژن IV در ماتریکس بین سلولی در اطراف سلولهای استروما نیز نشان داده شد. درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزی در این مطالعه بعلاوه اختلافات زیادی که در شدت رنگ‌آمیزی در بافتی که با فرمالین Fix می‌گردند و در پارافین قالب‌بندی می‌گردند، انجام نگرفت، اما بنظر می‌رسد که شدت رنگ‌آمیزی غشاء پایه رگها با آنتی HSPG، پس از مصرف نورپلانت بطور چشمگیری کاهش می‌یابد.

CD34 به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق و DAB جهت رنگ‌آمیزی لامینین به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق، بعنوان کروموژن مورد استفاده قرار گرفتند. Countestain و Mounting همانند قبل انجام می‌گرفت.

## روش آنالیز

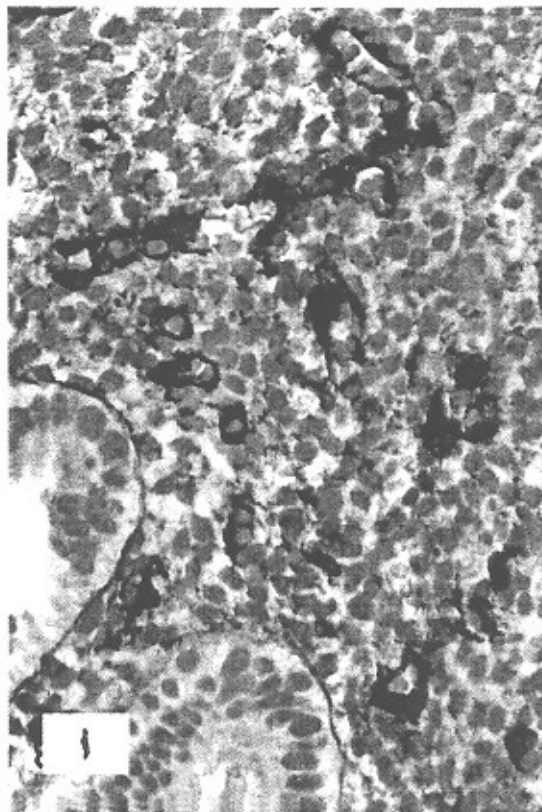
Paired t-test برای مقایسه تراکم رگها قبل و بعد از مصرف از نورپلانت مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز رگرسیون و ضریب همبستگی پیرسون نیز برای تعیین گرانش و بررسی وجود یا عدم وجود همبستگی بین تراکم رگها با طول مدت استفاده، سطح هورمونهای سرم و روزهای خونریزی و بالاخره ANOVA بای مقایسه تعداد مویرگها در طبقه‌بندی‌های مختلف بافت آندومتر مورد استفاده قرار گرفت.  
 نسبت رگهای رنگ‌آمیزی شده برای اجزاء غشاء پایه به رگهای رنگ‌آمیزی شده توسط آنتی CD34 در آندومتر هر فرد محاسبه و به درصد بیان گردید.

## یافته‌ها

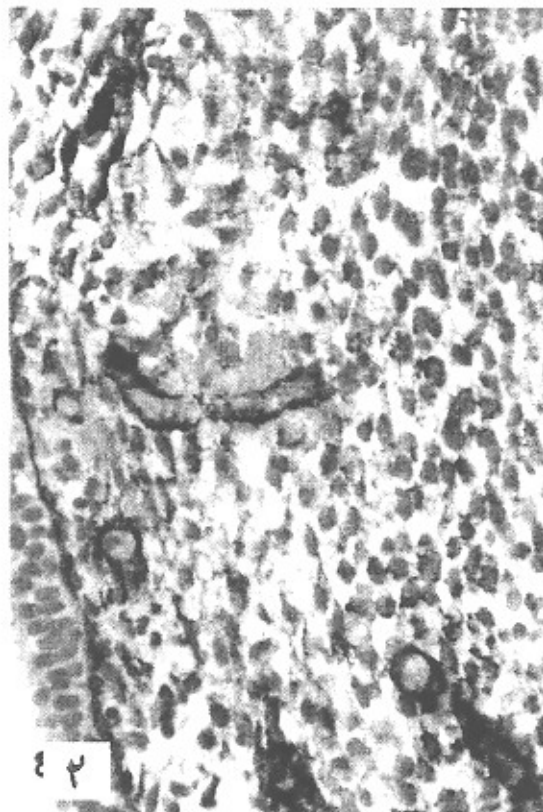
پس از ۲ تا ۱۳ هفته مصرف نورپلانت کاهش معناداری در تراکم رگهای لامینین - کلاژن IV-HSPG مثبت به ترتیب ۷/۶ ± ۱۷۹، ۶/۶ ± ۱۵۶ رگ در mm<sup>2</sup> قبل از مصرف نورپلانت به ۶ ± ۱۵۶، ۶/۲ ± ۱۴۴ و ۲/۹ ± ۴۴ پس از مصرف نورپلانت مشاهده گردید (Paired t-test, P < ۰/۰۵, n = ۲۲).

کاهش معناداری نیز در تراکم رگهای لامینین - کلاژن IV- و HSPG- مثبت به ترتیب از ۵/۵ ± ۱۷۵، ۶ ± ۱۶۲ و ۴ ± ۵۷ رگ در mm<sup>2</sup> قبل از مصرف نورپلانت به ۴/۲ ± ۱۶۲، ۴/۹ ± ۱۵۱ و ۲/۹ ± ۴۱ پس از ۱۴ تا ۴۲ هفته مصرف نورپلانت مشاهده شد. (Paired t-test, P < ۰/۰۵, n = ۳۴). تصاویر ۱ تا ۶ کاهش تراکم رگهایی که غشاء پایه را نشان می‌دهند، پس از مصرف نورپلانت نشان می‌دهد.

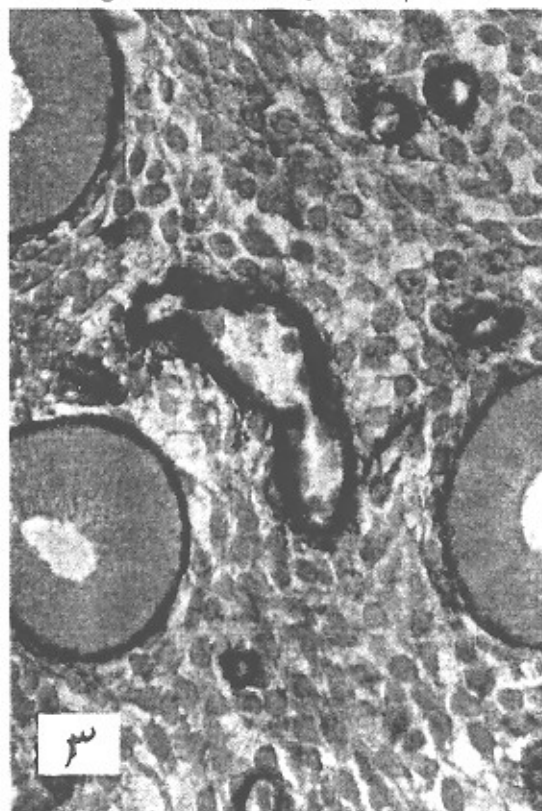
این کاهش در حالی اتفاق می‌افتاد که افزایش معناداری در تراکم رگهای CD34 مثبت هم پس از ۲-۱۳ هفته مصرف و هم پس از ۱۴ تا ۴۲ هفته مصرف نورپلانت مشاهده می‌گردید. بطوری که تراکم رگهای CD34 مثبت از ۸ ± ۱۹۳ قبل از مصرف نورپلانت به میزان



شکل ۱- تراکم رگهای لامین مثبت در آندومتر طبیعی (x400)



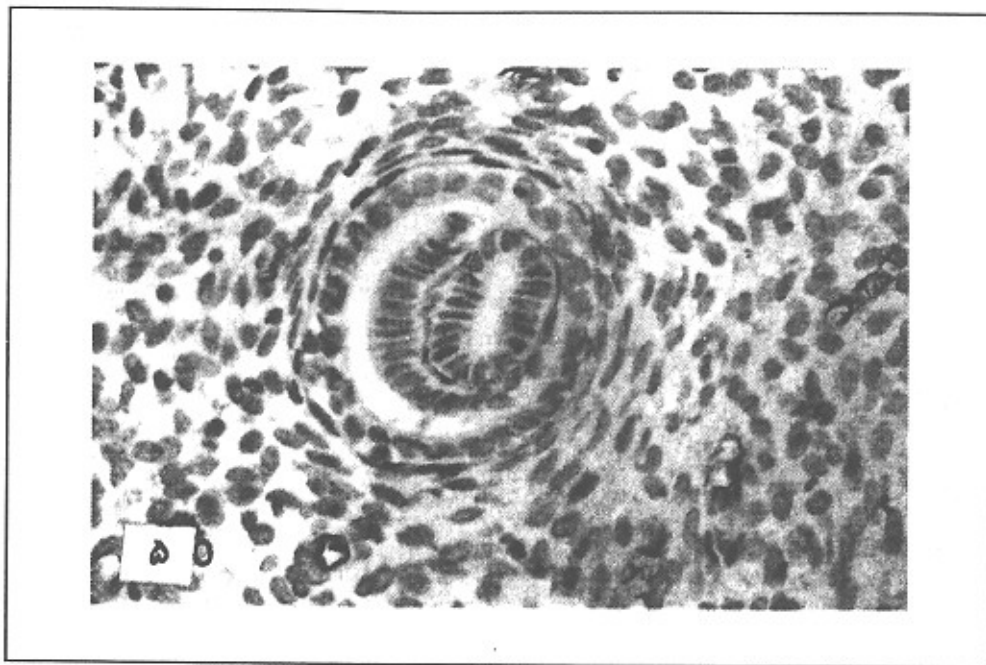
شکل ۲- کاهش تراکم لامین مثبت پس از ۸ هفته مصرف نورپلات (x400)



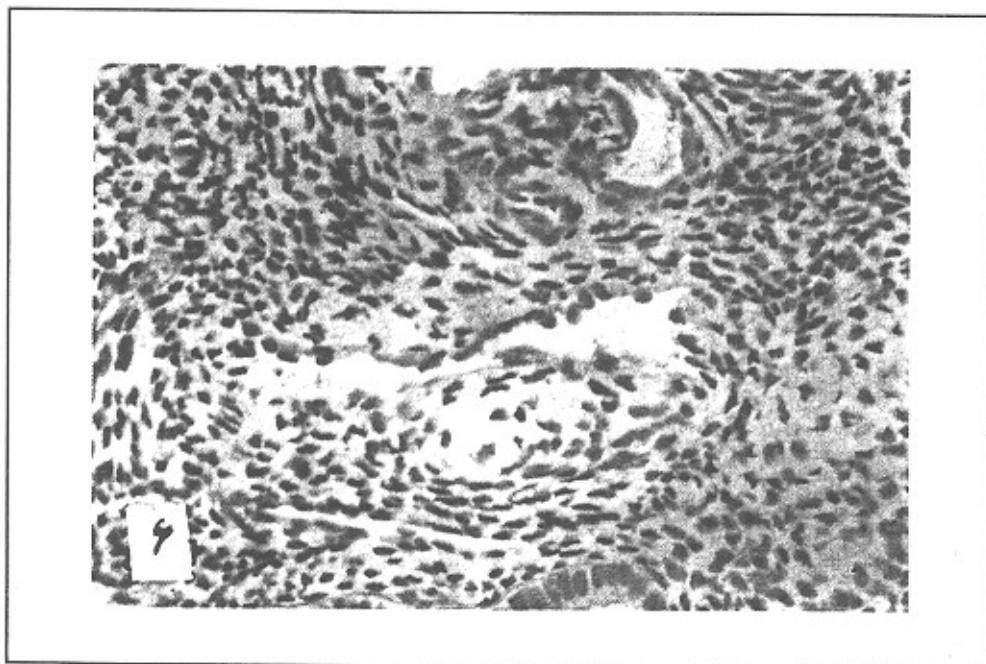
شکل ۳- تراکم رگهای CIV مثبت در آندومتر طبیعی (x400)



شکل ۴- کاهش تراکم CIV مثبت پس از ۴۰ روز مصرف نورپلات (x400)



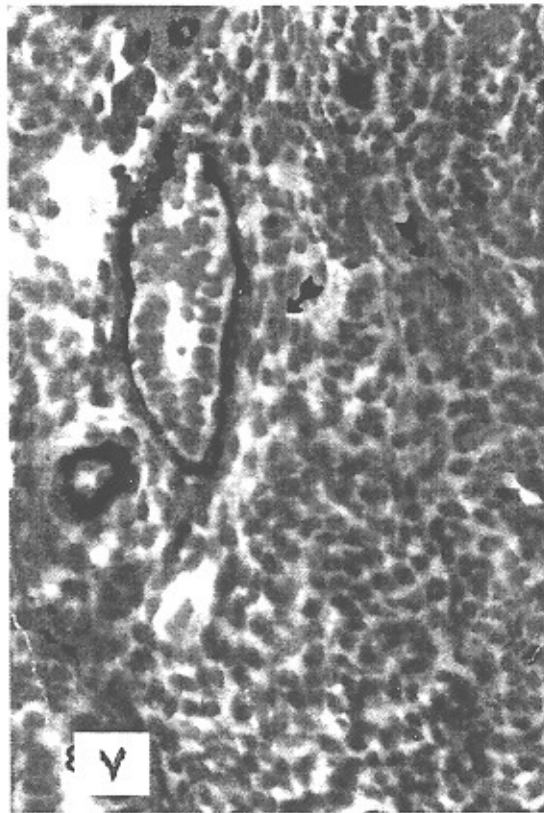
شکل ۵- تراکم رگهای HSPG مثبت در آندومتر طبیعی (×۴۰۰)



شکل ۶- کاهش تراکم HSPG مثبت پس از ۷ هفته مصروف تورپلانت، کاهش

شدت رنگ آمیزی نیز بوضوح قابل مشاهده است (×۴۰۰).





شکل ۷- رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال رگها



شکل ۸- با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال



شکل ۹- رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال رگها با استفاده از آنتی



شکل ۱۰- با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال، رگهایی با

رنگ آمیزی ضعیف و گاه فاقد رنگ در غشاء پایه اطراف رگها مشاهده می گردد CD34 و آنتی لامنتین. غشا پایه بطور مشخصی در اطراف کلیه رگها به وضوح

مشاهده می گردد (x ۴۰۰).

(x ۴۰۰)

CD34 و آنتی لامینین. این تصویر رنگ آمیزی ضعیف و حتی فقدان غشاء پایه را در اطراف مویرگها و رگهای کوچک نشان می دهد (x۴۰۰).

شکل ۸- با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال، دو رگ، یکی با رنگ آمیزی قوی غشاء پایه و دیگری با رنگ آمیزی ضعیف و منفصل غشاء پایه، در آندومتر پس از مصرف نورپلانت نشان داده شده است (x۱۰۰۰).

شکل ۹- رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال رگها با استفاده از آنتی CD34 و آنتی لامینین. غشاء پایه بطور مشخصی در اطراف کلیه رگها بوضوح مشاهده می گردد (x۴۰۰).

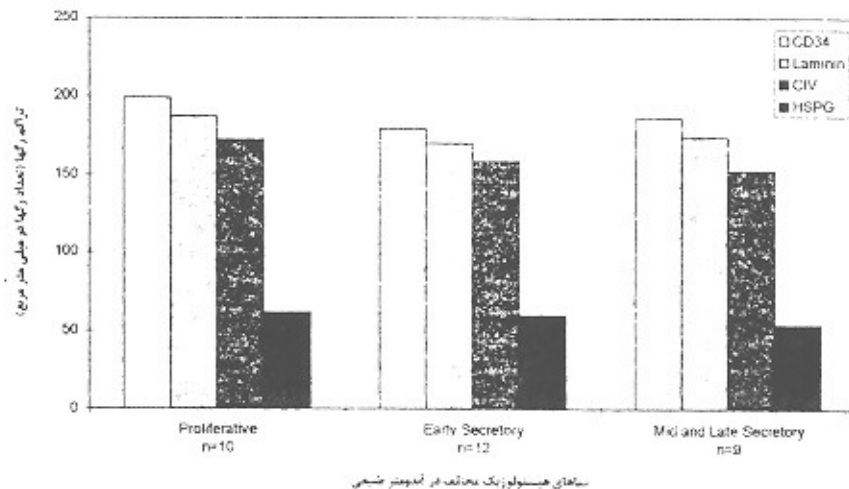
شکل ۱۰- با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال، رگهایی با رنگ آمیزی ضعیف و گاه فاقد رنگ در غشاء پایه اطراف رگها مشاهده می گردد (x۴۰۰).

نمودار ۱- تراکم رگها در آندومتر طبیعی قبل از مصرف نورپلانت، رنگ آمیزی شده توسط آنتی بادی های مختلف

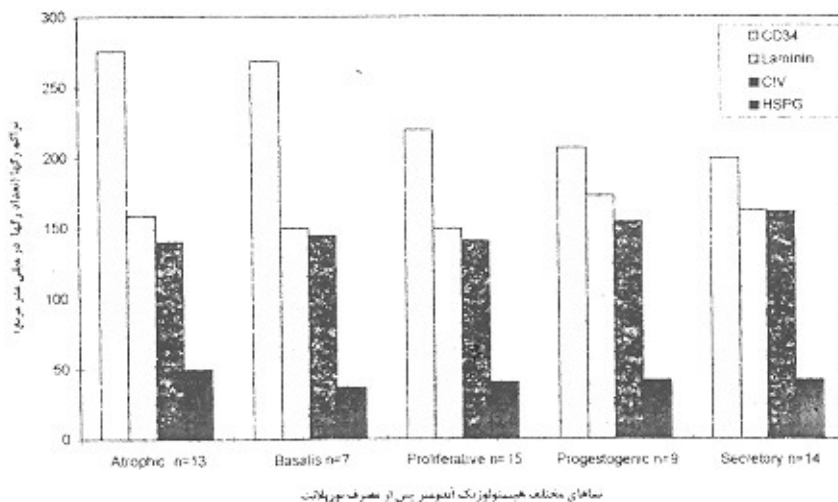
نمودار ۲- تراکم رگها پس از مصرف نورپلانت در نواحی هیستولوژیک مختلف آندومتر رنگ آمیزی شده توسط آنتی بادهای مختلف

شکل ۱- تراکم رگهای لامینین مثبت در آندومتر طبیعی (x۴۰۰)  
 شکل ۲- کاهش تراکم لامینین مثبت پس از ۸ هفته مصرف نورپلانت (x۴۰۰)  
 شکل ۳- تراکم رگهای CIV مثبت در آندومتر طبیعی (x۴۰۰)  
 شکل ۴- کاهش تراکم CIV مثبت پس از ۴۰ روز مصرف نورپلانت (x۴۰۰)  
 شکل ۵- تراکم رگهای HSPG مثبت در آندومتر طبیعی (x۴۰۰)  
 شکل ۶- کاهش تراکم HSPG مثبت پس از ۷ هفته مصرف نورپلانت، کاهش شدت رنگ آمیزی نیز بوضوح قابل مشاهده است (x۴۰۰).  
 شکل ۷- رنگ آمیزی دوگانه ایمونوهیستوکیمال رگها با استفاده از آنتی

نمودار ۱. تراکم رگها در آندومتر طبیعی قبل از مصرف نورپلانت. رنگ آمیزی شده توسط آنتی بادی های مختلف



نمودار ۲. تراکم رگها پس از مصرف نورپلانت در نواحی هیستولوژیک مختلف آندومتر رنگ آمیزی شده توسط آنتی بادی های مختلف



## بحث

تشکیل ساختمان لوله‌ای در مویرگها نیاز به یک ماتریکس غنی از کلاژنهای IV و V و لامنین دارد (۳۴). لامنین و نوع IV کلاژن در میان سایر پروتئینهای غشا پایه موجب تشکیل ساختمان مویرگی می‌گردد (۳۵). جذب این ترکیبات توسط غشاء پایه سلولهای آندوتلیال رگها برای تشکیل ساختمان لوله‌ای شکل از ماتریکس بین سلولی نیاز به فعالیت Integrins دارد (۳۶). سلول رگهای کوچک چندین نوع Integrins را در سطح خود نشان می‌دهند، مانند  $\alpha 3\beta 1$  و  $\alpha 2\beta 1$  و  $\alpha 1\beta 1$  که گیرنده‌های لامنین و کلاژن IV هستند و  $\alpha 6\beta 1$  که گیرنده لامنین است (۳۶). هرگونه اختلال در ظهور Integrins در آندومتر مصرف کنندگان نورپلات می‌تواند منجر به اختلال در تشکیل غشا پایه و موجب شکنندگی مویرگها گردد. بعلاوه فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) که یک فاکتور رشد وابسته به HSPG در ماتریکس بین سلولی است، از طریق بیوسنتز ساب یونیت‌های  $\alpha$  و  $\beta$  فعالیت اینتگرینها را تنظیم می‌کند (۳۶، ۳۷). بنابراین، بررسی فعالیت اینتگرینها و سایر عوامل واسطه‌ای در آندومتر مصرف کنندگان کنتراستپتوهای حاوی فقط پروژسترون نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

## ۲- اختلال در فعالیت پروتئولیتیک ماتریکس بین سلولی

متالوپروتئینازهای ماتریکس بین سلولی نقش بسیار مهمی را در پروسه آنژیوژنز و رگرسیون ماتریکس بین سلولی در آندومتر و در طول قاعدگی ایفاء می‌کنند (۳۸). تعادل دقیقی از فعالیت پروتئاز آنتی پروتئازها نیاز است تا در طول مهاجرت و تکامل سلولها، ماتریکس خارج سلولی را از انهدام و تخریب نامناسب حفظ نماید. فعالیت بیش از حد پروتئولیتیک موجب تشکیل رگهای معیوب می‌گردد. از طرفی، فقدان فعالیت پروتئولیتیک کافی موجب ممانعت در تشکیل ساختمان لوله‌ای مویرگها می‌گردد (۳۹، ۴۰، ۴۱). بنابراین، نامنظم بودن شکل رگها و ظهور رگهای متسع و کاهش در تراکم رگهایی که ترکیبات غشاء پایه را نشان می‌دهند، همگی می‌توانند عدم تعادل و اختلال در فعالیت پروتئاز - آنتی پروتئاز را در آندومتر مصرف کنندگان کنتراستپتوهای حاوی پروژسترون تنها را پیشنهاد کنند. بعنوان مثال در آندومتر پرولیفراتیو و ترشحی اوروکیناز فعال کننده پلاسمینوژن و با کلاژناز وجود ندارد (۴۲). حضور غیرطبیعی اینگونه پروتئازها در آندومتر کنتراستپتوهای مورد نظر می‌تواند موضوعی برای به تحقیقات آینده باشد.

به علاوه، تشکیل غشاء پایه در اطراف سلولهای استروما،

حضور سه جزء اصلی ساختمان غشاء پایه یعنی لامنین، کلاژن IV و HSPG در اطراف رگهای آندومتر مورد تأیید قرار گرفت (۲۷، ۲۵، ۲۳). در این مطالعه نشان داده شد که رگهای لامنین - کلاژن IV و HSPG - مثبت به ترتیب ۹۵٪، ۸۷٪ و ۳۰٪ از رگهای آندومتر را تشکیل می‌دهند. ظهور لامنین اولین نشانه ماچوراسیون رگهاست (۲۹) و در پروسه ثنواوزکولاریزاسیون و تشکیل غشاء پایه، رسوب لامنین مقدم بر کلاژن IV است (۹). بنابراین درصدهای ارائه شده می‌تواند نشان‌دهنده میزان رگهای ماچور باشد.

کاهش معنی‌دار در تراکم رگهایی که توسط غشاء پایه احاطه گردیده‌اند، با استفاده از آنتی لامنین، آنتی کلاژن IV و آنتی HSPG نشان داده شد. این کاهش تا حدود زیادی می‌تواند مربوط به ساختمانهای پیش مویرگی و یا انتهای آزاد آنان در پروسه ثنواوزکولاریزاسیون باشد که هنوز فاقد ساختمان لوله‌ای شکل و در نتیجه فاقد غشا پایه و یا فاقد ترکیبات مربوطه قابل تشخیص از لحاظ ایمونوهیستوکمیکال باشند. همانطوری که در رنگ آمیزی دوگانه رگهای آندومتر نیز نشان داده شد، قسمت اعظم رگهایی که در این مطالعه غشاء پایه را نشان ندادند، ساختمانهای پیش مویرگی هستند که فاقد ساختمان لوله‌ای شکل می‌باشند و باید خاطر نشان کرد که یک مویرگ زمانی عمل می‌کند که ساختمان لوله‌ای شکل پیدا کند (۴۵ و ۴۶). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در مصرف کنندگان نورپلات بسیاری از این ساختمانها فاقد عملکرد هستند.

این کاهش می‌تواند مربوط به کاهش سرخرگها، افزایش نسبت مویرگها و سیاهرگها باشد. ضعیفتر بودن غشاء پایه سیاهرگها و لنتفاتیکیها نسبت به سرخرگها (۳۰، ۳۱، ۳۲) بعلت اندک بودن لامنین و کلاژن IV و فقدان HSPG و فیبرونکتین در آنها است (۳۲). اصولاً رنگ آمیزی ایمونوهیستوکمیکال ضعیف و غیرممتد سیاهرگها و لنتفاتیکیها در مقابل رنگ آمیزی قوی و ممتد سرخرگها یکی از وجوه تمایز آنها از یکدیگر محسوب می‌گردد (۸). لازم به ذکر است که کاهش آرتریولهای ماریچ و افزایش رگهای کوچک و ونولها، قبلاً نیز در مصرف کنندگان لوونورجسترل نشان داده شده است (۳۳).

کاهش تراکم رگهای احاطه شده توسط غشاء پایه در مصرف کنندگان نورپلات می‌تواند به دو علت عمده زیر رخ دهد: ۱- کاهش یا اختلال در تشکیل غشاء پایه در پروسه آنژیوژنیز

پرولیفراسیون سلولی و تولید فعال کننده‌های پلاسمینوژن در سلولهای آندوتلیال دارد (۴۴). ظاهراً در زمان آنژیوژنیز، واکنشهایی هماهنگ بین سلولهای آندوتلیال مویرگهای آندومتر و اجزاء ماتریکس بین سلولی انجام می‌شود (۳۶) که احتمال مختل شدن آن در مصرف‌کنندگان کنتراستپتوهای مورد بحث می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد.

ارتباطی بین تراکم رگهای لامینین-، کلاژن IV- و HSPG- مثبت با سطح استروژن و پروژسترون سرم دیده نشد که نشان‌دهنده کنترل این تغییرات توسط فاکتورهای موضعی است.

بصورت تدریجی و پیشرونده در طول سیکل قاعدگی نرمال پیشنهاد می‌کند که این پدیده وابسته به پروژسترون است (۲۴). اگرچه عمل پروژسترون و پروژستونها در کنترل تکامل غشاء پایه هنوز ناشناخته است ولی تصور می‌شود که از طریق اثر بازدارنده در تشکیل کلاژناز در آندومتر اعمال می‌گردد (۴۳). اختلال در این روند نیز نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

لامینین، کلاژن از ترکیبات غشاء پایه هستند که دارای واکنش با bFGF در شرایط *in vivo* می‌باشند و بر فسفوریلاسیون آن با پروتوگیناز A تأثیر می‌گذارند. واکنش bFGF با پروتوگلیکان‌های سطح سلول نیاز به فرم باند شده bFGF برای تحریک

### منابع

- Blackwell PM, Fraser IS. A morphometric and ultrastructural study of the microvessels of the functional zone of normal human endometrium with some notions on possible secretory functions of endothelial cells. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynecol.* (1988) 14, 233-50.
- Fraser IS. Toward a better understanding of the effects of progestogens on the mechanisms of endometrial bleeding: recommendation for research. In: D'Arcangues C, Fraser IS, Newton JR, Odland V (eds): *Contraception and Mechanism of Endometrial Bleeding*. Cambridge University press. Cambridge, New York, Portchester, Melbourne, Sydney (1990). pp 467-91.
- Hickey M., Fraser IS, Dwarde D, Graham S. (1996) The endometrial vasculature in Norplant users: an hystoscopic study. *Hum. Reprod.* 11, Suppl 2, In press.
- Yurchenco D.Y., Schittiny JC. Molecular architecture of basement membrane. *FASEB* (1990), 4, 1577-90.
- Yurchenco PD, Tsilibary AC, Chronis AS, Furthmayr H. Models for the self-assembly of basement membrane. *J Histochem. Cytochem* (1986), 34, 93-102.
- Charonis A, Koliakos N, Koliakos G, Fields G, Rogger L, Lynch C, Spreeman M, Hunter A, Higson H. A novel laminin domain involved in adhesion of endothelial cells. In: Maragoudakis M E, Gullino PM, and Lelkes PI(eds.) *Angiogenesis: Molecular Biology, Clinical Aspects NASO ASI Series, Series A: life sciences Vol. 263, Plenum press, New York, (1993) pp 119-23.*
- Timple R, Martin GR. Composition of basement membranes. In: Furthmayr H(ed). *Immunohistochemistry of the extra cellular matrix; Vol 2, CRC Press, Boca Raton (1982) pp 119-50.*
- Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab. Invest.* (1983) 49, 140-2.
- Furthmayr H. Extracellular matrix. In: True LD, Roasi J (eds.) *Diagnostic Immunohistopathology*, Gower Medical Publishing, New York (1990) pp 16.2-16.25.
- Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassel JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dalcq M. Biological activities of laminin. *J. Cell Biochem.* (1985) 27, 317-25.
- Beck C, Hunter I, Engel. Structure and function of laminin: Anatomy of a multidomain glycoprotein *FASEB J* (1990), 4, 148-60.
- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ Role of laminin and basement membranes in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary like structures. *J cell biol.* (1988) 107, 1589-98.
- Grant DS, Kleinman HK, Martin GR The role of basement membrane in vascular development. *ANY Acad Sci.* (1990) 588, 61-72.
- Schnaper HW, Kleinman HK, Grant DS Role of laminin in endothelial cell recognition and differentiation. *Kidney Internat.* (1993), 43, 20-5.
- Kleinman HK, Grant DS and Kibbey MC Basement membrane laminin-derived peptide skivan promote angiogenesis and tumor growth. In: Maragoudakis ME, Gullino PM and Lelkes PI (eds). *Angiogenesis: Molecular Biology, Clinical Aspects NASO ASI Series, Series A: life Sciences Vol. 263, Plenum Press, New York, (1993) pp 135-41.*
- Rifkin DB, Moscatelli D, Gross J, Jaffe E. Proteases, angiogenesis, and invasion. In: Nicolson GL, Milas L, *Invasion and metastasia Biologic and therapotic aspects*, raven press, New York, (1984) pp 187-200.
- Kuhn K. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol.* 14, 439-45.
- Fransson LA, Carlstedt I, Coster L, Malmstrom A. (1986) The

- function of the heparan sulfate proteoglycans. Ciba Foundation symposium, (1995) 124, 124-42.
- 19- Whitehead MI, King RJB, MacQueen J, Campbell S. Endometrial histology and biochemistry of the endometrium of postmenopausal women receiving low dose oestrogen therapy. *Am J Obstet Gynecol* (1982) 142, 791-95.
  - 20- Jassoni VM, Bulletti C, Balducci M, Naldi S, Martinelli G, Gallassi A, Flamiginin C. The effect of progestin on factors influencing growth and invasion of endometrial carcinoma. In: Bulletti C, Gurpide E (eds.) *The Primate Endometrium*. AN Acad Sci, (1991) 622, 463-76.
  - 21- Dallenbach-Hellweg G., Poulsen H. *Atlas of endometrial histopathology*. Munksgarard, Copenhagen, (1950) pp - 88.
  - 22- Wewer VM, Faber M, Liotta LA, Albrechtsen R. Immunohistochemical and ultrastructural assessment of the nature of pericellular basement membrane of human decidual cells. *Lab. Invest*, (1985) 53, 624-27.
  - 23- Faber M, Wewer UM, Berthelsen JG, Liotta LA, Albrechtsen R. Laminin production by human endometrial stromal cells relates to the cyclic and pathologic state of endometrium. *Am J Pathol* (1986) 124, 384-98.
  - 24- Bulletti C, Galassi A, Jassoni VM, Martinelli G, Tabanelli S, Flamigni C. Basement Membrane Components in Normal Hyperplastic and Neoplastic Endometrium. *Cancer*, (1988) 62, 142-49.
  - 25- Aplin JD, Charlton AK and Ayad S. An immunohistochemical study of human extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *Cell Tissue Res*, (1988) 253, 231-40.
  - 26- Roberts DK, Parmley TH, Walker NJ, Horbelt DV. Ultrastructure of the microvasculature in the human endometrium throughout the normal menstrual cycle. *Am. J Obstet Gyn*, (1992) 166, 1393-406.
  - 27- Kelly FD, Tawia SA, Rogers PAW. Immunohistochemical characterisation of human endometrial microvasculature basement membrane components during the normal menstrual cycle. *Hum. Reprod*, (1995) 10, 267-86.
  - 28- Palmer JA, Lau T, Hickey M, Simbar M, Rogers PAW. Immunohistochemical study of endometrial microvascular basement membrane components in women using Norplant FSA 71 (1995).
  - 29- Risau, W, Lemmon V. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Develop. Biol* (1988) 125, 441-50.
  - 30- Kumar S., West DC and Ager A. Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation*, (1987) 36, 57-70.
  - 31- Otsuki Y, Kubo H, Magari S. immunohistochemical differentiation between lymphatic vessels and blood vessels-use of anti-basement membrane antibodies and anti factor VIII-related antigen. *Arch Histol Cytol*, (1990) 53 (suppl), 95-105.
  - 32- Norlich AG and Schleicher E. Identification of lymph and blood capillaries by immunohistochemical staining for various basement membrane components. *Histochem*, (1991) 96, 449-53.
  - 33- Hourrihan HM, Sheppard BL, Belsey EM, Brosens IA. Endometrial vascular features prior to and following exposure to levonorelrel. *Contraception*, (1991) 43, 375-85
  - 34- Fajardo LF. The complexity of endothelial cells. *An J Clin Pathol* (1989) 92, 241-250.
  - 35- Grant DS, Toshiro KI, Segue-Real B, Yamada Y, Martin GR, and Kleinman HK. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells in capillary like structures in vitro. *Cell* (1989) 58, 933-43.
  - 36- Klein S, Giancotti FG, Presta M, Clayton A, Rifkin D. and Rifkin B. Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Molec. Biol*, (1993) 4, 973-82.
  - 37- Klagsbrun M. Mediators of angiogenesis: the biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF) - heparin and heparan sulfate interactions. *Cancer Biol*, (1992) 3, 81-87.
  - 38- Salamonsen LA. Matrix metalloproteinases and endometrial remodelling. *Cell Biol. Intern* (1994) 18, 1139-44.
  - 39- Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. Angiogenesis in vitro: cytokine interactions and balanced extracellular proteolysis. In Maragoudakis ME, Gullino PM and Lelkes PI (eds.) *Angiogenesis: Molecular Biology, Clinical Aspects NASO ASI Series, Series A: life Sciences Vol. 263*, Plenum Press New York. (1993) pp 149-71.
  - 40- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res Commun* (1993) 189, 824-31.
  - 41- Pepper MS, Vassalli JD, Wilks JW, Schweigerer L, Orci L, Montesano R. Modulation of bovine microvascular endothelial cell proteolytic properties by inhibitors of angiogenesis. *J Cell Biochem*, (1994) 55, 419-34.
  - 42- Bulletti C, Jassoni VM, Polli V, Cappuccini F, Galassi A, and Flamigni C. Basement membrane in human endometrium: Possible role of proteolytic enzymes in developing hyperplasia and carcinoma. In: Bulletti C, Gurpide E. (eds.) *The Endometrium*. AN Acad Sci, (1991) 622, 376-82.
  - 43- Marbaix E, Kokorine I, Henrist P, Dones J, Courtery PJ, Eexkhout Y. The expression of interstitial collagenase in human endometrium is controlled by progesterone and by oestradiol and is related to menstruation. *Biochem. J*, (1995). 305, 1027-30.
  - 44- Presta M, Rusnati M, Gualandris A, Dell'Era P, Urbinati C, Coltrini D, Tanghetti, and Belleri M. Human basic fibroblast growth factor; Structure - function relationship of an angiogenic molecule. In: Maragoudakis ME, Gullino PM and Lelkes PI (eds.) *Angiogenesis: Molecular Biology, Clinical Aspects NASO*

- AS1 Series, Series A: life Sciences Vol. 263, Pelumn Press, New York (1993) pp 39-51.
- 45- Folkman J and Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science, (1987) 235, 442-47.
- 46- Klagsbrun M. and D'Amore P. Regulators of angiogenesis. Ann Ren Physiol, (1991) 53, 217-39.
- 47- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. Fertil Steril, (1950) 1: 3-25.