

PREEKLAMPSİ HASTALARININ PLASENTALARINDA İMMÜNOHİSTOKİMYA METODU İLE VEGF, EGF-R VE TGF- α BAKIŞI

Teksin ÇIRPANLI*, Fuat AKERCAN, Mustafa Coşan TEREK*, Hasan Tayfun ÖZÇAKIR**,
Gülşen GİRAY***, Sermet SAĞOL*, Nedim KARADADAŞ*

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İzmir

** Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Manisa

*** Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Manisa

ÖZET

Amaç: Preeklampitik hastaların plasentalarında, immünohistokimyasal boyama yöntemi ile, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF-R) ve transforming büyüme faktörü alfa'nın (TGF- α) araştırılması.

Planlama: Prospektif vaka kontrol çalışması.

Gereç ve Yöntem: Çalışma grubuna 10 preeklampitik vaka ve kontrol grubuna da 10 normal gebelik vakası dahil edildi. Vakalardan sezaryen doğum esnasında plasenta biyopsileri alındı. Biyopsi örneklerinde, avidin-biotin-peroksidaz immünohistokimyasal yöntem ile ışık mikroskopu altında, VEGF, EGF-R ve TGF- α dağılımı araştırıldı. Boyanma yoğunluğu semikantitatif olarak derecelendirildi ve grupları bilmeyen 2 histolog tarafından H-skorumları hesaplandı.

Sonuçlar: Preeklampitik hastaların plasentalarında VEGF, EGF-R ve TGF- α ekspresyonu anlamlı olarak daha yüksek bulundu (sırasıyla; 271.2 \pm 22.65 versus 201.9 \pm 12.33, p=0.000; 186.3 \pm 4.98 versus 150.3 \pm 5.7, p=0.000; 185.1 \pm 7.48 versus 169.2 \pm 6.19, p=0.000).

Yorum: Preeklampitik hastaların plasentalarında VEGF, EGF-R ve TGF- α ekspresyonu anlamlı olarak yüksektir.

Anahtar kelimeler: EGF-R, plasenta, preeklampsi, TGF-ALFA, VEGF

Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, 2008; Cilt: 5 Sayı: 1 Sayfa: 40- 5

SUMMARY

Evaluation Of VEGF, EGF-R AND TGF- α In Placenta Of Pregnancies With Preeclampsia By Immunohistochemistry

Objective: The aim of the study is to determine VEGF, EGFR and TGF- α with the immunohistochemical staining in placenta biopsies of patients with preeclampsia.

Design: Prospective case control study.

Materials and Methods: Biopsies from the placenta were obtained from ten patients with preeclampsia and ten patients of control group during the cesarean section. Placenta biopsies were examined for VEGF, EGF-R and TGF- α distribution with avidin-biotin-peroxidase immunohistochemistry. The staining intensities were graded semi-quantitatively by the two histologists who were blinded to the groups and the H-score was calculated by light microscopic examination.

Results: The VEGF, EGFR and TGF- α expression was significantly higher in placenta biopsies of preeclamptic patient compared

Yazışma adresi: Yard. Doç. Dr. Teksin Çırpan. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı 35100 İzmir

Tel.: (0232) 388 19 63

e-posta: cirpanteksin@yahoo.com

Alındığı tarih:18.02.2007, revizyon sonrası alınma: 07.01.2008, kabul tarihi: 07.01.2008

to controls (271.2 \pm 22.65 versus 201.9 \pm 12.33, $p=0.000$; 186.3 \pm 4.98 versus 150.3 \pm 5.7, $p=0.000$; 185.1 \pm 7.48 versus 169.2 \pm 6.19, $p=0.000$; respectively).

Conclusion: Immunostaining of VEGF, EGF-R and TGF- α is significantly higher in placenta biopsies in patients with preeclampsia.

Key words: EGF-R, placenta, preeclampsia, TGF-ALFA, VEGF

Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2008; Vol: 5 Issue: 1 Pages: 40- 5

GİRİŞ

Preeklampsi, fetal ve maternal morbiditeye neden olan major sebeplerden biridir⁽¹⁾. Gebeliğe bağlı oluşan bir multisistem hastalığıdır ve en etkin tedavi yöntemi doğumdur. Hastalığın patofizyolojisi halen tam olarak anlaşılamamıştır⁽²⁾. Başarılı bir gestasyon için implantasyon ve plasentasyon sırasındaki damar gelişimi çok önemlidir; plasentasyon sırasındaki vasküler yetmezlik çeşitli obstetrik komplikasyonlara neden olmaktadır. Bunun yanında plasenta anjiogenezinin regulasyonu hakkında bildiklerimiz çok azdır⁽³⁾. Maternal dolaşım ile plasental dolaşım arasındaki bariyer gestasyonun 8-12. haftalarında plasental yataktaki uteroplental spiral arterlerin ekstravillöz trofoblastlar (EVT) tarafından invazyonu ile yavaş yavaş bozulur. Plasental oksijen basıncı artar ve anjiogenezisde dallanma fazı 24. haftaya kadar devam eder. Bundan sonra dallanmanın olmadığı faza geçilir ve bu fazda yüksek akımlı düşük rezistanslı fetal-plasental sirkülasyon ve hızlı fetal büyüme için gerekli olan terminal villuslar oluşur. EVT'ın uteroplental spiral arterleri invaze etmedeki yetersizliği sonucunda plasental iskemi, preeklampsi gibi obstetrik kompli-kasyonlar gelişir. Plasental villuslarda sıklıkla anjiogenezisin dallanma fazının devam ettiğini gösteren bulgular mevcuttur. Bu yapısal değişiklikler hipoksi sonucu aktive olan VEGF'e bağlı olabilir^(4,5). Sorunlu gebeliklerde artmış VEGF-A ve VEGF-R1 mRNA düzeyleri plasentadaki hipoksiyi yansıtır⁽⁶⁾. VEGF, EGF ve TGF gibi anjogenik büyüme faktörleri plasenta tarafından üretilmektedir. VEGF anjiogenezisin uyarılmasında majör rol oynar ve VEGF gen ekspresyonu için hipoksi potent bir stimulatördür^(4,7). Bu çalışmanın amacı normotansif gebeler ile preeklampsili gebelerin plasenta biyopsilerinde VEGF, EGF-R ve TGF- α 'nın immünohistokimyasal boyama yöntemi ile dağılımının karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma ve kontrol grubu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne

başvuran ve yazılı onam alınan hastalardan oluşmuştur. Biyopsiler çalışma (n: 10) ve kontrol grubundan (n: 10) sezaryen doğum sırasında alınmıştır.

Kan basıncı, en az 6 saat, sistolik >140 mmHg ve diastolik >90 mmHg olan ve proteinürisi >300mg/dl/24 saat olan ya da dipstik yöntemi ile iki kez 2+ bulunan ve daha önce hipertansiyon, renal hastalık ve diabet hikayesi olmayan hastalar preeklampsi olarak kabul edildi. Çalışma grubunda ACOG kriterlerine göre ağır preeklampsi hastası mevcut değildi ve tanı sonrası oral antihipertansif (alfametil dopa) ve magnezyum sülfat tedavisine başlandı. Her iki grupta da çoğul gebelik mevcut değildi. Sezaryen doğum endikasyonları: fetal distres (n:3), baş-pelvis uygunsuzluğu (n:3), servikal distosi (n:3), mükerrer sezaryen (n:5), makat presentasyon (n:3), transvers situs (n:1), plasenta previa (n:2) idi.

Plasenta biyopsilerinde avidin-biyotin-peroksidaz immünohistokimyasal yöntemi ile VEGF, EGF-R ve TGF- α dağılımı araştırıldı. Biyopsiler formol solüsyonunda maksimum 24-48 saat fikse edildi. Örnekler su ile yıkandı ve sırasıyla %60, 70, 80, 90, 100'lük etanol solüsyonlarına maruz bırakıldı ıslatılmıştır. Daha sonra bunlar 90 dk xylen solüsyonunda bekletildi ve 60°C'de parafine yerleştirildi. Histokimyasal ve immünohisto-kimyasal boyama için 5 μ m'lik kesitler hazırlandı. Histolojik inceleme için hematoksilin-eozin (H&E) boyası kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama için örnekler ilk olarak 60°C'de bir gece ve sonra xylen içinde 30 dk inkube edildi. Seri etanol konsantras-yonlarında (%95, 80, 70, 60) yıkanan örnekler daha sonra tekrar distile su ve fosfatlı tamponize salin (PBS) ile 10 dk yıkandı. %2'lik tripsinde 37°C'de 15 dk bekletilen örnekler, PBS ile 3 kez 5'er dk süreyle yıkandı. Kesitlerin sınırları Dako pen ile belirlendi (Dako, Glostrup, Denmark) ve %3'lük H2O2 solusyonunda 15 dk endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için inkube edildi. Sonra kesitler PBS ile yıkanarak, +4°C'de, bir gece, primer antikorlar ile VEGF 1/200 dilüsyon (Santacruz-sc-7269, CA), TGF- α Ab-1 1/100 dilüsyon (Neomarkers-MS-670-P1, CA) ve EGF Ab-10 1/100 dilüsyonda (Neomarkers-MS-378-P1, CA) inkube edildi. PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandıktan

sonra biotinli IgG ile inkube ve sonrasında streptavidin –peroksidaz ile konjuge edildi (Zymed 85-9042, Lot no: 20570999, CA). PBS ile tekrar 3 kez 5'er dk yıkamadan sonra, immunoreaktiviteyi saptamak için kesitler 5 dk süre ile diaminobenzidin (DAB; Zymed 00-2020, Lot = 21074104,CA) ve sonrasında Mayer's hematoksilin ile inkube edildi. Kesitler ışık mikroskopunda (x40) incelendi (Olympus, Tokyo, Japan). Kontrol örneklerine de, primer antikor basamağı dışında, aynı işlemler uygulandı. İmmün boyama yapılan plasenta örnekleri, bunların hangi grup hastaya ait olduğunu bilmeyen, 2 histolog tarafından incelendi. Lamlar, plasenta biyopsilerinin VEGF, EGF-R ve TGF- α boyaması olan bölgelerini saptamak için ışık mikroskopunda küçük büyütmede (x4 objektif) değerlendirildi. Rasgele seçilen beş alanda boyanma derecesi skorlaması yapıldı ve skoru en yüksek olan alan tespit edildi. Her iki grup içinde, her X40 büyütme alanında en az 100 hücre işaretlendi. Kesitlerde, boyanan hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin kriter olarak alındığı semikantitatif bir yöntemle, skorlama yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), +1(zayıf boyanma), +2 (orta boyanma), +3 (güçlü boyanma) olarak değerlendirildi. Her kesit için immünohistokimyasal boyanma skorlaması, H-SCORE adı verilen ve (I x PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) formülüyle hesaplanan bir skorlama algoritması kullanılarak yapıldı. Datalar ortalama \pm standart deviasyon olarak ifade edildi. Gruplar arası farklılık Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Pearson korelasyon analizi kullanıldı. İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 10.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı, (p<0.05, istatistiksel olarak anlamlı kabule dildi).

SONUÇLAR

Grupların demografik verileri, 1. ve 5. dk. Apgar skorları, bebeklerin doğum ve plasenta ağırlıkları Tablo I'de özetlendi. Preeklampsi grubunda 4 hasta (%40) ve kontrol grubunda 7 hasta (%70) nullipar idi.

Preeklampsi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, preeklampsi grubunda VEGF, EGF-R ve TGF- α ekspresyonu anlamlı olarak yüksek saptandı, (sırası ile; 271.222.65/201.912.33, p=0.000; 186.34.98 / 150.35.7, p=0.000; 185.17.48 / 169.26.19, p=0.000), (Tablo II).

Tablo I : Hastaların demografik verileri

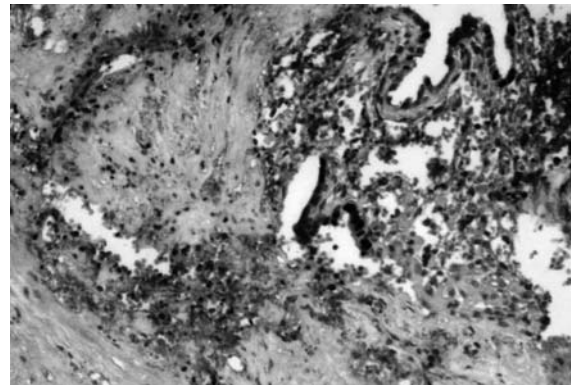
	Kontrol grubu (n=10)	Preeklampsi grubu (n=10)	p
Yaş	29.4 \pm 5.7	29.9 \pm 6.4	0.70
Gravida	1.5 \pm 0.7	1.3 \pm 0.69	0.32
Parite	0.6 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	0.68
Gebelik haftası	37.7 \pm 1.3	36.9 \pm 2.5	0.34
Doğum ağırlığı (g)	3055 \pm 482	2725 \pm 754.38	0.15
Plasenta ağırlığı (g)	506 \pm 76	390 \pm 112.25	0.06
Apgar skorları, 1. dk.	8.7 \pm 0.4	7.8 \pm 1.8	0.60
Apgar skorları, 5. dk.	9.9 \pm 0.3	9.1 \pm 1.247	0.45

Tablo II: Grupların VEGF, EGF-R ve TGF- immünboyanma skorları

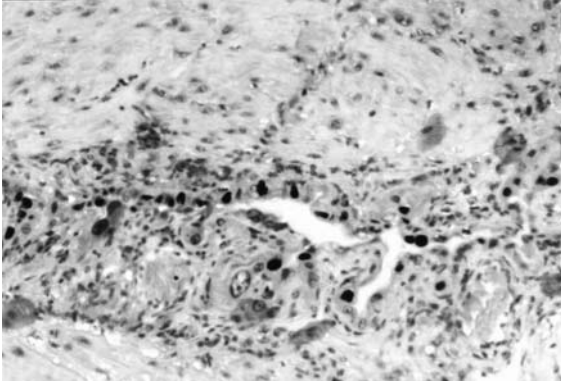
	Kontrol grubu (n=10)	Preeklampsi grubu (n=10)	p
VEGF	201.9 \pm 12.3	271.2 \pm 22.6	0.000
EGF-R	150.3 \pm 5.7	186.3 \pm 4.9	0.000
TGF-	169.2 \pm 6.19	185.1 \pm 7.48	0.000

VEGF: Vascular endothelial growth factor, EGF-R: Epidermal growth factor receptor, TGF-: Transforming growth factor alpha

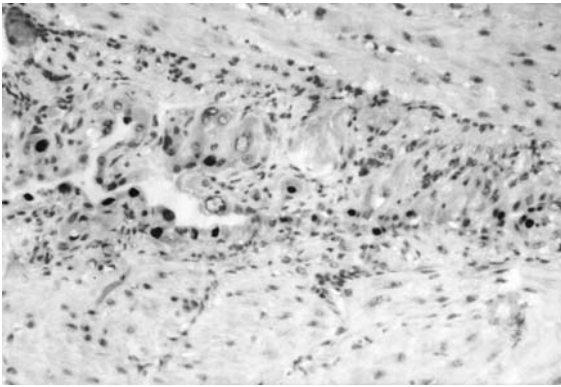
Işık mikroskobu ile değerlendirildiğinde, her iki grubun plasenta biyopsilerinde de villus dokusu tespit edildi. Her villus en dışta sinsityal tabaka, ortada sitotrofoblast ve içte ise mezenşim tarafından desteklenen fetal kapillerlerden oluşmuştu. Preeklampsi grubunda bu 3 tabakada da VEGF için güçlü boyanma tespit edildi, Figür: I. Kontrol grubunda hem en dıştaki sinsityal tabakada hem de içteki mezenşimal bölümde, EGF-R için, zayıf boyanma tespit edildi, Figür: II. Yine kontrol grubunda, TGF- α için, en dıştaki sinsityal tabakada orta ve içteki mezenşimal tabakada zayıf boyanma tespit edildi, Figür: III.



Figür I: Preeklampitik hastada VEGF immünboyanma; her villus en dışta sinsityal, ortada sitotrofoblast ve içte mezenşimal destekli fetal kapiller tabakasından oluşmaktadır. Her üç tabakada güçlü VEGF immünreaktivitesi göstermektedir, (haematoxylin-eosin boyama, orijinal büyütme, 40x).



Figür II: Kontrol grubunda EGF-R immunboyaması; her villus en dışta sinsityal, ortada sitotrofoblast ve içde mezenkimal destekli fetal kapiller tabakasından oluşmaktadır. Sinsityal ve fetal kapiller tabakası zayıf EGF-R immünreaktivitesi göstermektedir, (haematoxylin-eosin boyama, orijinal büyütme, 40x).



Figür III: Kontrol grubunda TGF- α immunboyaması; her villus en dışta sinsityal, ortada sitotrofoblast ve içde mezenkimal destekli fetal kapiller tabakasından oluşmaktadır. Sinsityal tabaka orta ve fetal kapiller tabakası ise zayıf TGF- α immünreaktivitesi göstermektedir, (haematoxylin-eosin boyama, orijinal büyütme, 40x).

TARTIŞMA

VEGF gibi anjiogenik büyüme faktörlerinin ekspresyonu, insanlardan elde edilen term sitotrofoblastlarda ve in-vitro diferansiye sinsityotrofoblastlarda gösterilmiştir⁽⁸⁾. VEGF, selektif olarak endotelial hücreler için mitojeniktir; vaskülogenezis ve anjiogenezisin uyarılmasında majör rol oynar⁽⁹⁻¹⁴⁾. Hipoksi VEGF sentezini artıran potent bir uyarıcıdır. VEGF sistemi plasental hipoksiye yanıt olarak aktive olur⁽⁵⁾.

VEGF ve TGF- α , muhtemelen, uterin arterin yeniden yapılanmasında ve gebelik süresince büyüyen plasentada olan anjiogenezisde görev alır⁽¹⁵⁾. VEGF'in varsayılan diğer önemli bir görevi de trofoblast invazyonu, proliferasyonu

ve diferansiyasyonunun regulasyonudur^(8,16). TGF- α ve EGF-R normal plasental sitotrofoblast proliferasyonunu uyarır⁽¹⁷⁾. Plasentasyonun erken döneminde dominant büyüme faktörü VEGF'dir⁽¹⁸⁾.

Normal gebelikte spiral arterlerin trofoblastlar tarafından invazyonu ve bunların düşük rezistanslı damarlara dönüşümü vardır. Preeklampsi'de ise spiral arter yatağının trofoblastlarca invazyonunda yetersizlik vardır, bu da bozulmuş uteroplasental perfüzyona neden olur. Bunun sonucunda maternal dolaşıma endotelial disfonksiyon, vazokonstriksiyon ve hipertansiyondan sorumlu faktörler salınır^(19,20). Bununla birlikte trofoblast invazyonunu regüle eden bu faktörlerin ne olduğu halen bilinmemektedir.

Last ve ark. VEGF'in neden olduğu EVT motilitesindeki artışın trofoblast hücrelerini desidual invazyona yönlendiren ilk uyarı olabileceğini ve VEGF'in trofoblast hücre invazyonunu sınırlandırabileceğini ileri sürmüşlerdir⁽²¹⁾.

Preeklampside anormal desidual ve plasental villöz damar yapısı mevcuttur. Taylor ve ark. yaptıkları çalışmada preeklampside serum plasental büyüme faktörlerinin azaldığını göstermişlerdir⁽²²⁾. Plasental büyüme faktörünün sentezinin azalması (PIGF), diğer vaskulotropik büyüme faktörlerinin de dolaylıve dolaysız etkisiyle beraber anormal plasental anjiogenezise neden olacağını belirtmişlerdir.

Gebeliğe bağlı hipertansif hastalıklarda, normotansif gebelere göre, maternal serum ya da plazma VEGF konsantrasyonunun yada immunboyama ile plasental VEGF'in arttığını veya azaldığını belirten çalışmalar mevcuttur⁽²³⁻³³⁾.

Cooper ve ark. preeklampsili gebelerin plasentalarında büyüme faktörü ekspresyonunda anormallik saptamışlardır⁽³⁴⁾. Bu plasentalarda terminal villuslarda büyüme ve diferansiyasyon yetersizliği, fetal kapiller dallanmada azalma ve bu morfolojik değişikliklere neden olan VEGF'in düzeylerinde de azalma olduğunu belirtmişlerdir. Sgambati ve ark. VEGF mRNA düzeylerinin, kontrol grubuna göre, gestasyonel hipertansiyon vakalarında daha yüksek, HELLP sendromunun eşlik ettiği preeklampsi vakalarında daha düşük ve preeklampsi vakalarında ise benzer düzeylerde olduğunu göstermişlerdir⁽³⁵⁾. Sonuç olarak gestasyonel hipertansiyonlu gebelerde VEGF düzeylerinin artmasının, kan akımını normal düzeye getirmek için oluşan bir kompensatuar mekanizma olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca preeklampsi ve HELLP sendromlu gebelerin plasentalarında zayıf VEGF

immünboyanma olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak preeklampsi ve HELLP sendromu gibi daha ciddi vakalarda da muhtemel bir kompensatuar mekanizma vardır fakat immünhistokimyasal boyama ile gösterildiği gibi plasentanın bazı bölümleri kompensatuar olarak VEGF üretebilmektedir.

Tsatsaris ve ark. gebeliğe bağlı hipertansif hastalıklarda artmış VEGF-A ve VEGF-R-1 mRNA düzeylerinin plasental hipoksiyi yansıttığını, fakat membran bağlı VEGF-R-1'in preeklampsi gebelerin plasental yataklarında düştüğünü rapor etmişlerdir⁽⁸⁾. Preeklampsi dolaşımdaki düşük PIGF düzeyi, artan total VEGF-A ve çözünebilir VEGF-R-1 düzeyleri ile ilişkilidir. Serbest VEGF-A maternal kanda saptanamayacak düzeydedir. İmmünhistokimyasal çalışmalar VEGF-A ve PIGF'nin trofoblastik hücrelerde lokalize olduğunu göstermiştir. Bütün bunlar preeklampsi ile ilişkili 2 farklı patofizyolojik mekanizma olduğunu düşündürmektedir. Birincisi çözünebilir kompetitif VEGF-R-1 üretiminin artması ki bu VEGF-A ve PIGF etkilerinin aşırı suprese olması ile sonuçlanır. İkincisi ise plasental yataktaki VEGF-R-1'in membran bağımlı formunun down-regüle olması ve bunun sonucunda defektif uteroplasental gelişimdir. Bu çalışmaya karşıt olarak, Chung ve ark. preeklampsi gebelerin plasentalarında, normal gebelerinkine göre, VEGF ve VEGF-R-1 mRNA ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını bulmuşlardır⁽³⁶⁾.

Bu sunulan çalışmada da immünboyanma ile preeklampsi gebelerin plasentalarında anjiyogenik büyüme faktörlerinin (VEGF, EGF-R ve TGF- α) anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.

Yaygın obstetrik komplikasyonlar plasental vasküler yapıda önemli değişiklikler yaparlar. Plasental vaskularizasyon regülatuar faktörlerin kompleks ilişkisine bağlıdır. Plasental vasküler yetmezliklerin anlaşılabilmesi için plasental vasküler gelişim regülasyonunun açıklanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Driul L, Damante G, D'Elia A, Springolo F, Ianni A, Di Leonardo C, Angelini M, Marchesoni D. Screening for pre-eclampsia in a low-risk population at 24 weeks: uterine artery Doppler flow velocimetry and genetic variants of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase. *Minerva Ginecol.* 2004; 56: 385- 90.
2. Levine RJ, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in

- preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol.* 2005; 48: 372- 86.
3. Torry DS, Hinrichs M, Torry RJ. Determinants of placental vascularity: Review. *Am J Reprod Immunol.* 2004; 51: 257- 68.
4. Kingdom JC, Kaufmann P. Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 474: 259- 75.
5. Trollmann R, Amann K, Schoof E, Beinder E, Wenzel D, Rascher W, Dotsch J. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188: 517- 23.
6. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Franckne F, Foidart JM. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 5555- 63.
7. Favier J, Corvol P. Physiological angiogenesis. *Therapie* 2001; 56: 455- 63.
8. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997; 18: 657- 65.
9. Eleonora Sgambati, Mirca Marini, Giorgia D. Zappoli Thyron, Elena Parretti, Giorgio Mello, Claudio Orlando, Lisa Simi, Camela Tricarico, Gherardo Gheri, Enzo Brizzi. VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG* 2004;111: 564- 70.
10. Khong TY, Liddell HS, Robertson WB. Defective haemochorial placentation as a cause of miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94: 649- 55.
11. Poston L. Maternal vascular function in pregnancy. *J Hum Hypertens* 1996; 10: 391- 4.
12. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblast to mimic a vascular adhesion phenotype: one cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99: 2152- 64.
13. Damsky CH, Fisher SJ. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 660- 6.
14. Roberts JM, Redman CWG. Preeclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447- 51.
15. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 2000; 55: 15- 35.
16. Slowey MJ, Verhage HG, Fazleabas AT. Epidermal growth factor, Transforming growth factor and Epidermal growth factor-receptor localization in the baboon (*Papio anubis*) uterus during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Soc Gynecol Investig.* 1994; 1: 277- 84.
17. Li RH, Zhuang LZ. The effects of growth factors on human

- normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Hum Reprod.* 1997; 12: 830- 4.
18. Leach L, Babawale MO, Anderson M, Lammiman M. Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res.* 2002; 39: 246- 59.
 19. Pijinenborg R. Trophoblast invasion. *Reprod Med Rev* 1994; 3: 53- 73.
 20. Benirschke K, Kaufmann P. Oxygen as regulator of villous development. In: Benirschke K, Kaufmann P, editors. *Pathology of Human Placenta.* Heidelberg: Springer-Verlag, 1995: 142-3.
 21. Lash GE, Cartwright JE, Whitley GS, Trew AJ, Baker PN. The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility. *Placenta.* 1999; 20: 661- 7.
 22. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188: 177- 82.
 23. VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res.* 2000; 47: 38- 48.
 24. Kupfermine MJ, Daniel Y, Englander T, et al. Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38: 302- 6.
 25. Lyall F, Young A, Boswell F, Kingdom JCP, Greer IA. Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia. *Placenta* 1997; 18: 269- 76.
 26. Reuvekamp A, Velsing-Aarts FV, Poulina IE, Capello JJ, Duits AJ. Selective deficit of angiogenic growth factors characterises pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106: 1019- 22.
 27. Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N. Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension* 2000; 36: 965.
 28. Bosio PM, Wheeler T, Anthony F, Conroy R, O'herlihy C, McKenna P. Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 146- 52.
 29. Cheng Z, Lin Q, Shen Z. Study on association of vascular endothelial growth factor with the pathogenesis of pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2001; 36: 72- 5.
 30. El-Salahy EM, Ahmed MI, El-Gharieb A, Tawfik H. New scope in angiogenesis: role of vascular endothelial growth factor (VEGF) NO, lipid peroxidation, and vitamin E in the pathophysiology of preeclampsia among Egyptian females. *Clin Biochem* 2001; 34: 323- 29.
 31. Jelkman W. Pitfalls in the measurement of circulation endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001; 47: 617- 23.
 32. Livingston JC, Chin R, Haddad B, McKinney ET, Ahokas R, Sibai BM. Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183: 1554- 7.
 33. Simmons LA, Hennessy A, Gillin AG, Jeremy RW. Uteroplacental blood flow and placental vascular endothelial growth factor in normotensive and pre-eclamptic pregnancy. *BJOG.* 2000; 107: 678- 85.
 34. Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996; 103: 1191- 6.
 35. Sgambati E, Marini M, Zappoli Thyron GD, Parretti E, Mello G, Orlando C, Simi L, Tricarico C, Gheri G, Brizzi E. VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders. *BJOG.* 2004; 111: 564- 70.
 36. 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- 90.