

بررسی تغییرات فراساختاری غشای پایه اپی تلیوم لومینال رحم موش به دنبال استفاده از داروهای محرک تخمک گذاری

دکتر فرزاد رجایی* دکتر پرویز بزی**

The ultrastructural effects of superovulatory drugs on mouse endometrial basement membrane

F Rajaei* P Bazzy

دریافت: ۸۴/۹/۳۰ پذیرش: ۸۵/۸/۷

*Abstract

Background: The endometrial basement membrane has a major role in implantation of embryo. Studies have recently shown that the rate of successful implantation in stimulatory cycles is less than in normal cycles due to detrimental effect of superovulatory drugs on endometrium.

Objective: to investigate the effects of stimulatory drugs on ultrastructures of mouse endometrial basement membrane.

Methods: The endometrial samples were obtained from 30 naturally pregnant mice (control group) and 30 superovulated mice (experimental group) at the time of implantation (120 h after hCG injection). Induced with PMSG (10 IU) and hCG (10 IU) The specimens were processed for electron microscopic studies. Qualitative (based on electron density) and quantitative (thickness of basement membrane) studies were performed on micrographs. The data were analyzed using Mann-Whitney statistical test.

Findings: The qualitative observation of the case group revealed a well developed RER, increased number of mitochondria and high electron density of basement membrane. The quantitative data demonstrated that the thickness of basement membrane and lamina densa were significantly increased in the case group compared with control group (0.283 ± 0.0777 , 0.158 ± 0.00827 vs. 0.239 ± 0.0082 , 0.155 ± 0.0111 , $P < 0.05$).

Conclusion: It can be concluded that superovulation drugs may lead to low implantation rate by changing the endometrial basement membrane.

Keywords: Super Ovulation, Basement Membrane, Uterus, Endometer

* چکیده

زمینه: غشای پایه آندومتر رحم نقش مهم و اساسی در لانه‌گزینی جنین دارد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که میزان لانه‌گزینی در سیکل‌های تحریکی نسبت به سیکل‌های طبیعی به دلیل اثرات سوء داروهای به‌کار گرفته شده بر روی بافت آندومتر کمتر است. **هدف:** مطالعه به‌منظور تعیین تغییرات فراساختاری غشای پایه آندومتر رحم موش به دنبال استفاده از داروهای محرک تخمک گذاری انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۴ در بوشهر و قزوین انجام شد. نمونه‌های بافتی از آندومتر ۳۰ موش حامله با سیکل طبیعی (گروه شاهد) و ۳۰ موش حامله با سیکل تحریکی (گروه تجربی) در زمان لانه‌گزینی (۱۲۰ ساعت پس از تزریق hCG) تهیه شد. تحریک تخمک گذاری با تزریق PMSG (۱۰ واحد) و hCG (۱۰ واحد) انجام شد. نمونه‌ها برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی آماده شدند و مطالعه کیفی (از جهت کدورت الکترونی) و کمی (افزایش ضخامت غشای پایه) بر روی میکروگراف‌ها انجام گرفت. داده‌ها با آزمون آماری من ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: مطالعه کیفی، توسعه قابل ملاحظه RER، افزایش تعداد میتوکندری‌ها و افزایش کدورت الکترونی غشای پایه را در گروه تجربی نشان داد. مطالعه کمی نیز افزایش ضخامت کلی غشای پایه و ضخامت ناحیه تیره را در گروه تجربی (0.283 ± 0.0777 و 0.158 ± 0.00827) در مقایسه با گروه شاهد (0.239 ± 0.0082 و 0.155 ± 0.0111) نشان داد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها ممکن است داروهای محرک تخمک گذاری با تغییر در ساختمان غشای پایه آندومتر، سبب کاهش لانه‌گزینی شوند.

کلید واژه‌ها: تحریک تخمک گذاری، غشای پایه، رحم، آندومتر

* مقدمه :

در حال حاضر علی رغم گسترش و پیشرفت دانش پزشکی، نازایی و ناباروری یک معضل مهم است و حدود ۲۰ درصد از زوجین از مشکل نازایی رنج می‌برند.^(۱) غشای پایه، لایه نازکی بین بافت پوششی و بافت همبند زیرین است که علاوه بر نقش ساختمانی در تصفیه مواد (بافت‌های ریه و کلیه)، در تعیین قطبیت، القای مهاجرت، متابولیسم و سازمان‌دهی پروتئین‌های غشای سلولی، به عنوان مسیرهای اختصاصی مهاجرت عمل می‌کند.^(۲) در ضمن غشای پایه در اعمال متقابل بین آندومتر و لایه تروفوبلاست جنین نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند.^(۳) در دید میکروسکوپ الکترونی غشای پایه از دو لایه تشکیل شده است. یک لایه شفاف (lucida lamina) که بلافاصله در مجاورت غشای پلاسمایی قاعده‌ای سلول‌هایی که روی غشای پایه قرار می‌گیرند، دیده می‌شود و لایه متراکم (lamina densa) که زیر لایه شفاف قرار می‌گیرد. در بعضی موارد لایه سومی به نام لایه مشبک دیده می‌شود که غشای پایه را به بافت همبندی زیرین متصل می‌کند.^(۴) غشای پایه به‌طور عمده توسط سلول‌هایی که روی آن قرار می‌گیرند ساخته می‌شود. مطالعه‌های ایمونوهیستوشیمی نشان داده‌اند که غشای پایه حاوی کلاژن IV با ملکول‌های پروتئوگلیکان و گلیکوپروتئین و تناسین (در بافت‌های جنینی و رحمی) همراه است.^(۵) مطالعه‌های ملکولی پیشنهاد کرده‌اند که یکپارچگی آندومتر به اعمال متقابل سلول به سلول و سلول به ماتریکس خارج سلولی بستگی دارد.^(۶) این ملکول‌ها در سازمان‌دهی ساختمان استرومای آندومتر به هنگام لانه‌گزینی و در طول سیکل ماهانه نقش مهمی دارند.^(۷)

یکی از مسائل مهم در زمینه باروری، لانه‌گزینی موفق است.^(۸) لانه‌گزینی یک روند بسیار پیچیده و موزون است که به عملکرد متقابل جنین (بلاستوسیست) و رحم نیاز دارد.^(۹) از یک سو رحم با توجه به تغییرات فراساختمانی طبیعی در بافت‌های پوششی (اپی تلیوم لومینال)، غدد،

استروما و رگ‌های خونی، خود را برای پذیرش بلاستوسیست آماده می‌کند.^(۱۰ و ۱۱) و از سوی دیگر جنین باید قادر به واکنش با آندومتری که مولکول‌های مناسب اتصال را تولید می‌کند باشد.^(۱۲) تغییرات مورفولوژیکی که به لانه‌گزینی موفق منجر می‌شود، تحت تأثیر هورمون‌های مترشحه از تخمدان است که روی آندومتر اعمال می‌کنند.^(۱۳) به‌نظر می‌رسد حوادث سلولی و مولکولی که به پذیرش رحم منجر می‌شود، به غلظت مناسبی از هورمون‌های تخمدانی نیاز دارد. مطالعه‌ها نشان داده است که تکامل ترشحی آندومتر در لحظه لانه‌گزینی فقط تحت تأثیر پروژسترون و بدون نیاز به استروژن است.^(۱۴) مقدار بیش از حد استروژن بر پذیرش رحمی اثرات سوء دارد و به‌همین علت در سیکل‌های تحریکی که از داروهای تحریک‌کننده تخمدانی استفاده می‌شود، غلظت بیش از حد استرادیول از عوامل مهم نقص در لانه‌گزینی است.^(۱۵) امروزه به‌طور معمول در مراکز ناباروری به‌منظور به‌دست آوردن تعداد بیشتری تخمک از داروهای محرک تخمک‌گذاری استفاده می‌شود. به‌نظر می‌رسد که داروهای فوق با برهم زدن نظم اندوکرینی تخمدانی باعث بروز عدم هماهنگی در عملکرد متقابل رحمی- جنینی و تغییراتی در پذیرش، نفوذ و تهاجم بلاستوسیست می‌شوند.^(۱۶) اثرات داروهای محرک تخمک‌گذاری بیشتر با میکروسکوپ نوری مطالعه شده‌اند. غشای پایه نقش بسیار مهمی در حرکت، تمایز، تهاجم، مهاجرت و تغذیه بافت‌های اپی‌تلیال دارد و تاکنون تغییرات فراساختمانی آن کمتر مورد توجه قرار گرفته است.^(۱۷) با توجه به این‌که عوامل مختلفی بر روی عملکرد اساسی آندومتر (پذیرندگی آن) تأثیر می‌گذارند و یکی از مهم‌ترین عوامل، مداخله دارویی متعاقب استفاده از داروهای محرک تخمک‌گذاری در سیکل‌های تحریکی می‌باشد.^(۱۸ و ۱۹ و ۲۰) لذا به‌نظر می‌رسد این داروها اثرات سوئی بر سلول‌های اپی‌تلیال لومینال از جمله غشای پایه داشته باشند. مطالعه حاضر به تعیین تغییرات احتمالی غشای پایه و اجزای آن می‌پردازد.

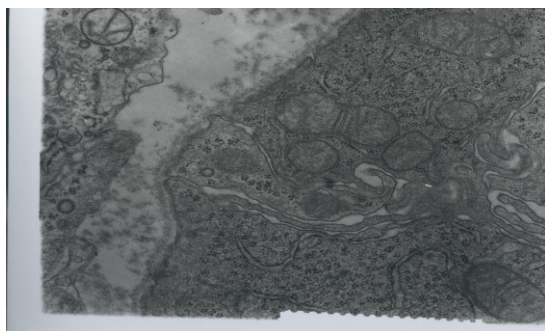
* مواد و روش ها :

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۴ در بوشهر و قزوین انجام شد. ابتدا ۶۰ سر موش سوری ماده از نژاد Swiss Albino که سن آنها ۶ تا ۸ هفته بود، انتخاب و به دو گروه شاهد و تجربی (هر کدام شامل ۳۰ سر موش) تقسیم شدند. موش‌ها به مدت یک هفته در حیوان‌خانه در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند. به هر یک از موش‌های گروه تجربی به منظور تحریک تخمک‌گذاری، مقدار ۱۰ واحد Pregnant Mare Serum Gonadotropine (PMSG) به طریق داخل صفاقی تزریق شد و حدود ۴۸ ساعت بعد ۱۰ واحد هورمون گنادوتروپین انسانی (hCG) به طریق داخل صفاقی تزریق شد. موش‌های گروه شاهد که سیکل قاعدگی طبیعی داشتند، به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر سالین نرمال دریافت نمودند. موش‌های ماده از گروه شاهد و تجربی در مجاورت موش‌های نر به مدت یک شب به منظور جفت‌گیری قرار داده شدند. صبح روز بعد تشکیل پلاک واژنی بررسی گردید و موش‌های پلاک مثبت به عنوان موش‌های حامله تلقی شده و در روز چهارم (حدود ۱۲۰ ساعت پس از تزریق hCG یعنی زمان لانه‌گزینی)، موش‌های حامله به روش جابجایی مهره‌های گردنی بی‌هوش شدند. پس از باز کردن شکم، نمونه‌های آندومتر از رحم موش‌ها برداشته شد. برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های بافتی از رحم هر دو گروه به دقت با محلول فسفات بافر سدیم (PH=۷/۴) شستشو و سپس به مدت ۵ تا ۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با محلول گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد تثبیت شدند. پس از ثبوت، سایر مراحل آماده سازی نظیر آبگیری، آغشتگی با رزین، قالب‌گیری، اصلاح قالب‌ها، مقطع‌گیری نازک و نیمه نازک و در نهایت رنگ آمیزی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز انجام شد. مقاطع توسط میکروسکوپ الکترونی فیلپس عکس‌برداری و سپس فتومیکروگراف‌ها اسکن شدند.

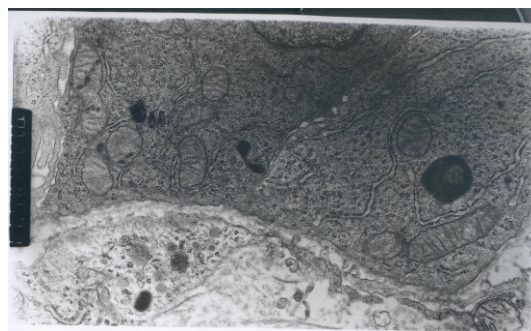
اسکن فتومیکروگراف‌ها توسط نرم افزار فتوشاپ مورفومتری شدند. اندازه ضخامت کلی غشای پایه و همچنین اندازه ضخامت بخش تیره و بخش روشن غشای پایه در هر گروه توسط ابزار اندازه‌گیری کننده نرم افزار فوق، اندازه‌گیری شد و نسبت این دو جزء به ضخامت کلی غشای پایه ارزیابی شد. پس از به دست آوردن نتایج مورفومتری یک فتومیکروگراف‌ها، میانگین اندازه ضخامت کلی غشای پایه، ناحیه تیره، ناحیه روشن و نسبت این نواحی به ضخامت کل غشای پایه بررسی و محاسبه شد. میانگین اندازه‌ها در گروه‌های تجربی و شاهد با استفاده از آزمون آماری من ویتنی تجزیه و تحلیل شد. تفاوت‌های در سطح ۰/۰۵ و کمتر از آن معنی داری تلقی شدند.

* یافته‌ها :

در بررسی قسمت‌هایی از اپی‌تلیوم لومینال آندومتر گروه شاهد با درشت‌نمایی پایین، تعداد میتوکندری‌ها کم و به‌طور عمده کوچک بودند و هسته نسبتاً حاوی مناطق هتروکروماتینی بود که حاکی از فعالیت نسبی کم این سلول‌ها در گروه شاهد است. در حالی‌که در گروه تجربی هسته‌ها کاملاً یوکروماتین و حاوی میتوکندری‌های بزرگ و فراوان و RER گسترده بود (شکل‌های ۱ و ۲). اندازه کلی ضخامت غشای پایه و اندازه قسمت تیره و قسمت روشن غشای پایه در جدول شماره ۱ خلاصه شده‌اند. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود میزان ضخامت غشای پایه در گروه تجربی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/05$) که نشان‌دهنده فعالیت بیش‌تر این سلول‌ها نسبت به گروه شاهد است. اندازه ضخامت قسمت تیره که از لحاظ ویژگی‌های بافتی مطابق با رشته‌های کلاژن نوع IV است، افزایش معنی‌داری را در گروه تجربی نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < 0/05$). ناحیه روشن در گروه تجربی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول شماره ۱).



شکل ۲- فتومیکروگراف الکترونی از قسمت قاعده‌ای سلول‌های اپی‌تلیوم لومینال آندومتر در گروه تجربی



شکل ۱ - فتومیکروگراف الکترونی از قسمت قاعده‌ای سلول‌های اپی‌تلیوم لومینال آندومتر در گروه شاهد

جدول ۱ - میانگین اندازه ضخامت اجزای غشای پایه در گروه‌های شاهد و تجربی

متغیر / گروه‌ها	ضخامت کلی غشای پایه	ضخامت ناحیه تیره	ضخامت ناحیه روشن
شاهد	۰/۲۳۹±۰/۰۰۸۲	۰/۱۵۵±۰/۰۱۱۱۱	۰/۰۸۱۴۷±۰/۰۰۹۲۱۵
تجربی	۰/۲۸۳±۰/۰۷۷۷۶	۰/۱۵۸±۰/۰۰۸۲۷۰	۰/۱۲۰±۰/۰۰۵۴۲۰
سطح معنی داری	P<۰/۰۵	P<۰/۰۵	غیر معنی دار

* بحث و نتیجه‌گیری:

مطالعه و تحقیق در زمینه تغییرات بافت آندومتر به دنبال مصرف داروهای محرک تخمک‌گذاری کم و نادر بوده است. بعضی از محققین با به‌کارگیری روش‌های نوین نظیر مطالعه‌های مورفومتریک آندومتر و روز شمار دقیق (dating) آندومتر بر اساس افزایش ناگهانی LH (LH Surge)، گام‌های بلندی در زمینه تغییرات روز شمار آندومتر برداشته‌اند.^(۲۱) در مطالعه‌ای که سارانی و همکاران انجام داده‌اند، تغییرات فراساختمانی آندومتر زنان نابارور در مقایسه با زنان بارور در مرحله میانی لوتئال (LH⁺۶) یعنی زمانی که معروف به پنجره لانه‌گزینی (Implantation Window) است، پس از دریافت داروهای محرک تخمک‌گذاری (GnRH/HMG/HCG) مورد مطالعه قرار گرفته است. محققین فوق گزارش کردند که در سلول‌های اپی‌تلیال آندومتر در گروه تجربی علاوه بر یوکروماتین بودن هسته، ازدیاد اتصالات انسدادی، میتوکندری‌های بزرگ و

واکوئول‌های درشت و فراوان گلیکوژن دیده می‌شود.^(۲۲) در بررسی حاضر مشابه مطالعات قبلی، افزایش فعالیت ترش‌حی سلول‌ها، افزایش تعداد و اندازه میتوکندری‌ها و گسترش RER تحت تأثیر داروها دیده شدند که همگی نشان‌دهنده فعالیت بالای این سلول‌ها هستند. از جمله ویژگی‌های ریخت‌شناسی، وجود میتوکندری‌های بزرگ در سلول‌های لومینال گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد است که به نظر می‌رسد قبل از لانه‌گزینی جنین، انرژی مورد نیاز سلول‌ها توسط این نوع میتوکندری تأمین می‌شود. محققین معتقدند که این میتوکندری‌ها ممکن است از الحاق میتوکندری‌های کوچک پدید آمده باشند.^(۲۳) این میتوکندری‌ها دارای کریستال‌های داخلی به هم پیچیده هستند که نشان‌دهنده سنتز استروئیدهاست و معمولاً با شبکه آندوپلاسمیک نیمه خشن همراه است که این امر مربوط به سنتز گلیکوپروتئین‌های

منصوری به جهت همکاری در تهیه مقاطع و میکروگرافها و از خانم مشاطان به جهت ویرایش مقاله تقدیر و تشکر می‌شود.

* مراجع :

1. Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol* 2004 Jan; 103(1): 51-6
2. Palmer JA, Lau TM, Hickey M, Simbah M, Rogers PA. Immunohistochemical study of endometrial microvascular basement membrane components in women using Norplant. *Hum Reprod* 1996 Oct; 11(10): 2142-50
3. Wang J, Armant D R. Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation. *Cell Tissue Res* 2002; 172(3): 190-201
4. Gartner J, Lesile H. *Text Book of histology*. 2 nd ed. Philadelphia: W.B. Sanders Co; 2001. 461-86
5. Chiquet-Ehrismann R. Tenascin and other adhesion-modulating proteins in cancer. *Semin Cancer Biol* 1993 Oct; 4(5): 301-10
6. Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Reprod* 1996 Feb; 2(2): 77-92
7. Aplin J D. *Molecular and Cellular Aspects of Peri-implantation Processes*, Boston, Massachusetts. *Placenta* 1995 Jan; 16(1): 109-11
8. Miller JF, Williamson E, Glue J, Gordon YB, Grudzinskas JG, Sykes A. Fetal loss after implantation, A prospective study. *Lancet* 1980 Sep 13; 2(8194): 554-6
9. Cross J C, Werb Z, Fisher S J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science* 1994 Dec 2; 266 (5190): 1508-18
10. Enders A C, Schlafke S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat.* 1969 May; 125(1): 1-29

استروئیدی است.^(۲۴) بررسی حاضر نشان داد که ترشحات گلیکوژنی سلول‌های غده‌ای آندومتر در سلول‌های اپی‌تلیالی در گروه شاهد در اثنای لانه‌گزینی کاهش یافته است تا جنین بتواند با آندومتر مواجه شود. زیرا اگر ترشحات در این دوره زیاد باشد، مانع از قرارگیری صحیح جنین و اتصال آن به آندومتر می‌شود. در مطالعه حاضر میزان ضخامت کل غشای پایه و ضخامت قسمت تیره که از لحاظ ویژگی‌های بافتی با رشته‌های کلاژن نوع IV مطابقت دارد، تفاوت معنی‌داری را در گروه تجربی نسبت به گروه شاهد نشان داد، درحالی‌که ناحیه روشن در گروه تجربی نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. از آنجا که غشای پایه با تماس بین سلول‌های اپی‌تلیال و مزانشیم زیرین آندومتر باعث بیان ملکول‌های اتصالی (اینترگین‌ها) می‌شود، هر گونه تغییر در آن منجر به تغییر ملکول‌های اتصالی می‌شود که می‌تواند مانع از اتصال جنین به آندومتر شود. همچنین افزایش ضخامت غشای پایه، مانع از نفوذ بلاستوسیست می‌شود که باید توسط سلول‌های تروفوبلاست در اثنای لانه‌گزینی پاره شود.^(۱۶) بدین ترتیب افزایش ضخامت کل غشای پایه، می‌تواند منجر به اختلال در پذیرفتن و نفوذ بلاستوسیست شود.

نتایج این بررسی نشان داد که داروهای محرک تخمک‌گذاری، فعالیت ترشحات سلول‌های اپی‌تلیال از جمله تولید و ترشح اجزای غشای پایه نظیر ماکروملکول‌ها و رشته‌های کلاژن را در اثنای لانه‌گزینی افزایش می‌دهد که ممکن است به اختلال در پذیرفتن و نفوذ بلاستوسیست به علت ضخیم شدن غشای پایه منجر شود.

* سپاسگزاری :

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر در تأمین هزینه این طرح تحقیقاتی و از آقای دکتر

18. Smitz J, Devroey P, Camus M, Dechacht, Staessen C, et al. The luteal phase and early pregnancy after combined GnRH-agonist/HMG treatment for superovulation in IVF or GIFT. *Hum Reprod* 1988 Jul; 3(5): 585-90
19. Macrow P J, Li T C, Seif M W, Buckley C H, Elstein M. Endometrial structure after superovulation: a prospective controlled study. *Fertil Steril* 1994 Apr; 61(4): 696-9
20. Nikolettos N, Asimakopoulos B, Vakalopoulos I, Simopoulou M. Endometrial fluid accumulation during controlled ovarian stimulation for ICSI treatment. A report of three cases. *Obstet Gynecol* 2002; 29(4): 290-2
21. Bloom W, Fawcett D W. *A Textbook of histology*. 12th ed. New york: chapmann & hall; 1994. 818-45
22. Sarani S A, Ghaffari-Novin M, Warren M A, Dockery P, Cooke I D. Morphological evidence for the implantation window' in human luminal endometrium. *Hum Reprod* 1999 Dec; 14(12):3101-6
23. Dockery P, Rogers A. The effect of steroid on the fine structure of endometrium. *Bailliere Clini Obstet Gynecol*. 1989; (2): 227-47
24. Png F Y, Morphy C. The plasma membrane transformation does not last: microvilli return to priod of uterine receptivity. *Eur J Morphol* 1997; (35): 19- 24
11. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing f implantation. *Fertil Steril* 1992 Sep; 58(3): 537-42
12. Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Jun; 80(6): 1908-15
13. Ziegler D. Hormonal control of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1995 Jan; 10(1): 4-7
14. de Ziegler D, Bergeron C, Cornel C, Medalie DA, Massai MR, Milgrom E, et al. Effects of luteal estradiol on the secretory transformation of human endometrium and plasma gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 Feb; 74(2): 322-31
15. Tavaniotou A, Smitz J, Bourgain C, Devroey P. Ovulation induction disrupts luteal phase function. *Ann Acad Sci Fenn[A]* 2001 Sep 943: 55-63
16. Dockery P, Khalid J, Sarani S A, Bulut H E, Warren M A, Li T C, Cooke I D. Changes in basement membrane thickness in the human endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod Update* 1998 Sep Oct; 4(5): 486-95
17. Sharkey A M, Smith S K. The endometrium as a cause of implantation failure. *Obstet Gynaecol* 2003 Apr; 17(2): 289-307