اثر رالوکسیفن و GnRH-a بر میزان VEGF در کشت سلول‌های میوم انسانی

طراوت فاخری[1]؛ کامران منصوری[2]؛ سحر رشیدی[1]*؛ منصور رضایی[3]؛ سارا دائی‌چین[1]؛ انیس‌الدوله نانکلی[1]

چکیده

زمینه: لیومیوم شایع‌ترین تومور خوش‌خیم دستگاه تناسلی و عامل خونریزی غیرطبیعی رحمی و علایم فشاری در لگن است. درمان‌های مرکب از آنالوگ آزادکننده هورمون گنادوتروپین (GnRH-a) و مهارکننده‌های انتخابی استروژن در کاهش حجم لیومیوم مؤثر است.

روش‌ها: دوازده نمونه میوم از زنان با سیکل قاعدگی منظم و در فاز فولیکولار که تحت عمل جراحی میومکتومی یا هیسترکتومی در بیمارستان امام رضا (ع) قرار گرفتند، به‌دست آمد. بیماران در شش سیکل آخر قاعدگی قبل از جراحی، درمان هورمونی دریافت نکرده بودند. اثر درمان با دوزهای مختلف رالوکسیفن (در پنج گروه به‌ترتیب با غلظت‌های 1، 2، 4، 6 و 8 میکروگرم در میلی‌لیتر) و GnRH-a (در پنج گروه به‌ترتیب با غلظت‌های 50، 100، 200، 300 و 400 میکروگرم در میلی‌لیتر) و درمان ترکیبی آن‌ها بر میزان فاکتور رشد عروقی آندوتلیال (VEGF) و مهار رشد سلولی بررسی شد.

یافته‌ها: در هر سه گروه درمان (گروه با غلظت‌های مختلف رالوکسیفن، گروه با غلظت‌های مختلف GnRH-a و گروه دریافت‌کننده هر دو داروی رالوکسیفن و GnRH-a)، میزان VEGF کاهش داشت. کاهش میزان VEGF در گروه درمان ترکیبی 79/17 درصد، در گروه رالوکسیفن 64/74 درصد و در گروه GnRH-a55/29 درصد بود (P<0/05). میزان ممانعت از رشد سلولی بین دو گروه به‌طور معنادار متفاوت بود. میزان ممانعت از رشد سلولی در گروه ترکیبی 70/77 درصد، در گروه رالوکسیفن 60/76 درصد و در گروه GnRH-a 15/83 درصد بود (P<0/05).

نتیجه‌گیری: درمان با رالوکسیفن و GnRH-a و ترکیب آن‌ها میزان VEGF را کاهش داده و از رشد سلولی میوم جلوگیری می‌کند.

کلیدواژه‌ها: لیومیوم، رالوکسیفن، GnRH-a، VEGF

«دریافت: 1392/7/13 پذیرش: 1392/12/20»

1. مرکز تحقیقات زایمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

2. مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3. مرکز تحقیقات توسعه اجتماعی و ارتقای سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

***عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، بیمارستان معتضدی، دفتر آموزش زنان، تلفن: 09183336063

Email: mrc.kums@yahoo.com

مقدمه

لیومیوم رحمی شایع‌ترین تومور خوش‌خیم دستگاه تناسلی و شایع‌ترین علت خونریزی غیرطبیعی رحمی و علایم فشاری در لگن است و در 25 درصد زنان درسنین باروری رخ می‌دهد (1).

درمان دارویی (Down-Regulation) با آنالوگ‌های آزادکننده هورمون گنادوتروپین (GnRH-a= gonadotropin-releasing hormone agonist) **که باعث یائسگی به واسطه دارو می‌شود، حجم لیومیوم را تا حد 40 درصد کاهش می‌دهد (2). عقیده بر این است که استروژن و پروژسترون، تنظیم‌کننده‌های فیزیولوژیکی رشد لیومیوم‌ها هستند (3). فاکتورهای رشد زیادی همچون bFGF (**Basic Fibroblast Growth Factor**)، VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factory)،

M.M.P (matrix metalloproteinases) و PDGF (platelet-derived growth factor) در پاتوژنز لیومیوم‌ها دخالت دارند (4). مکانیسم GnRH-a در کاهش حجم لیومیوم می‌تواند وابسته به کاهش مستقیم یا غیرمستقیم فاکتورهای رشد و افزایش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و سرکوب رشد سلولی باشد (5). رالوکسیفن به گروه مهارکننده انتخابی استروژن (SERM= Selective estrogen receptor modulators) تعلق دارد که فعالیت اگونیست و آنتاگونیست در بافت‌های مختلف ارایه می‌دهد. این دارو اثرات ضداستروژنی در پستان و اثرات استروژنی در استخوان‌ها دارد. رالوکسیفن می‌تواند از رشد سلول‌های لیومیوم جلوگیری کند و به اندازه GnRH-a در کاهش حجم لیومیوم مؤثر است (6). در مطالعه Ohara N و همکاران تأثیر درمان با رالوکسیفن بر رشد لیومیوم قبل از یائسگی تأیید نشده ولی کاهش سایز لیومیوم در زنان بعد از یائسگی ثابت شده است (7). در مطالعه shimomura Y و همکاران نشان داده شده که هورمون‌های استروئیدی تنها تعدیل‌کننده رشد لیومیوم‌ها نیستند و فاکتورهای رشد زیادی در پاتوژنز لیومیوم‌ها دخالت دارند (8). براساس مطالعات Toth-Jakatics و Tonial,Hermon رشد تومورها به گسترش عروق خونی بستگی دارد و این مکانیسم به‌وسیله فاکتورهای آنژیوژنیک مختلفی خصوصاً فاکتور رشد عروقی VEGF کنترل می‌شود (9 و 10).

در مطالعات مختلف اثر درمان‌های GnRH-a و رالوکسیفن بر سایز لیومیوم و فاکتورهای رشد عروقی مورد بررسی قرار گرفته است که در بعضی از مطالعات تأثیر این درمان‌ها بر کاهش سایز لیومیوم اثبات شده و در مطالعات دیگر بدون تأثیر گزارش شده است.

با توجه به نقش درمان‌های دارویی کاهنده استروژن مثل GnRH-a و رالوکسیفن در کاهش سایز لیومیوم‌ها و تأثیر فاکتورهای رشد و رگ‌سازی در پاتوژنز این تومورها، در این مطالعه تأثیر این درمان‌های دارویی بر روی فاکتورهای رشد و رگ‌سازی مورد بررسی قرار گرفت و اثر رالوکسیفن و GnRH-a بر سلول‌های عضلانی میوم و ترشح VEGF در محیط کشت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

دوازده نمونه میوم رحمی از زنان سنین باروری 18-50 ساله با سیکل قاعدگی منظم که به‌دلیل لیومیوم در بیمارستان امام رضا کرمانشاه تحت عمل جراحی میومکتومی یا هیسترکتومی قرار گرفتند، به‌دست آمد. رضایت‌نامه آگاهانه قبل از جراحی و برداشتن نمونه میوم از بیماران گرفته شد. بیماران در سنین 30-48 سال با میانگین سنی 6/7±39/5 سال بودند و در شش سیکل آخر قاعدگی قبل از جراحی، هیچ‌گونه درمان هورمونی دریافت نکرده بودند. نمونه‌ها در فاز فولیکولار بر اساس LMP بیماران گرفته شد.

جداسازی و کشت سلول‌های عضلانی

12 نمونه میوم از بیماران کاندید عمل میومکتومی یا هیسترکتومی گرفته شد و در محلول HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) حاوی آنتی‌بیوتیک قرار داده شد و به آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی منتقل گردید. پس از شستشوی کامل با محلول HBSS بافت به قطعات کوچک 2 میلی‌متری تقسیم شد. سپس در ظرف کشت سلول حاوی محیط DMEM دارای ده درصد FCS، 10ng/ml EGF و هیدروکورتیزون به‌میزان 1μg/ml کشت داده شد. بعد از گذشت 4 روز محیط کشت تعویض گردید و اولین مرحله سلول‌های عضلانی مشتق شده از بافت به‌دست آمد. پس از تکثیر آن‌ها به‌منظور تأیید این سلول‌های عضلانی از رنگ‌آمیزی با منوکلونال آنتی‌بادی Smooth muscle α-actin antibody استفاده شد. سپس به‌منظور افزایش تعداد سلول‌ها آن‌را کشت داده و پاساژ داده و میزان بقا سلول‌ها توسط روش trypan blue exclusion اندازه‌گیری شد. پس از اطمینان از میزان زنده بودن سلول‌ها، سلول‌های جداشده هر کدام به‌طور جداگانه در دانسیته 10^4 در هر

چاهک پلیت **96** خانه‌ای قرار داده شد و سلول‌ها در محیط کشت کامل DMEM/F12 و FBS ده درصد کشت داده شدند. در نهایت وقتی سلول‌ها **70** درصد سطح پلیت را پوشاندند (confluence 70%) غلظت‌های مختلف داروی رالوکسیفن هیدروکلراید و GnRH-a اثر داده شدند و بعد از گذشت **72** ساعت میزان تکثیر سلول‌ها در مقابل کنترل توسط روش شمارش سلولی اندازه‌گیری شد و جهت بررسی میزان سمیت اثر دارو بر روی سلول‌ها در غلظت‌های مختلف دارو، از روش اندازه‌گیری LDH استفاده گردید (**11**).

دوز دارو

با توجه به بررسی‌های انجام‌شده بر روی میزان سمیت دارو بر روی سلول‌ها، غلظت‌هایی انتخاب گردید که در آن غلظت هیچ سمیتی برای سلول نداشته باشد. بنابراین داروی رالوکسیفن در پنج گروه به‌ترتیب با غلظت‌های **1**، **2**، **4**، **6** و **8** میکروگرم در میلی‌لیتر و GnRH-a در پنج گروه به‌ترتیب با غلظت‌های **50**، **100**، **200**، **300** و **400** میکروگرم در میلی لیتر و ترکیب دو دارو در هر پنج گروه غلظت بر سلول‌ها تأثیر داده شد. در گروه کنترل میزان VEGF تولید شده و درصد رشد سلولی بدون تأثیر دارو (غلظت صفر داروهای GnRH-a و رالوکسیفن در محیط کشت سلولی) اندازه‌گیری شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف GnRH-a و رالوکسیفن بر ترشح VEGF از سلول‌های عضلانی میوم

به‌منظور سنجش میزان VEGF در سوپ رویی سلول‌های تیمارشده، از روش الایزای ساندویچ استفاده شد. در این روش یک آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی برای VEGF روی میکروپلیت‌ها پوشش داده شد. استانداردها و نمونه‌ها به داخل چاهک‌ها وارد شد و VEGFهای موجود به این آنتی‌بادی‌ها متصل می‌گردید. پس از شستشوی ملکول‌های متصل‌نشده، آنتی‌بادی کونژوگه پلی‌کلونال ضد VEGF به چاهک‌ها اضافه شد. پس از شستشوی مجدد به‌منظور برداشتن آنتی‌بادی‌های کونژوگه متصل نشده، محلول سوبسترا به چاهک‌ها اضافه شد و رنگی متناسب با میزان VEGF باندشده در مرحله اول ایجاد گردید. ایجاد رنگ متوقف شده و شدت آن مورد سنجش قرار گرفت (تأثیر غلظت‌های مختلف بر سلول طبق تیتر Elisa اندازه‌گیری VEGF از شرکت R & D system, minnepolis, mn, USA).

آنالیز آماری

در سه گروه مستقل مقدار Mean±**2**SD (CI 95%) بیان شد. آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه میانگین‌ها در سه گروه به‌کار رفت. آزمون Paired t-Test برای مقایسه قبل و بعد در هر گروه انجام شد. از رسم نمودار خطا که فاصله اطمینان را برای متغیر کمی در سه گروه نشان می‌داد، استفاده شد. در کلیه موارد P<**0/05** به‌عنوان سطح تفاوت معنادار بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر غلظت‌های مختلف درمان‌های دارویی بر میزان VEGF تولید شده

دوزهای مختلف رالوکسیفن، میزان VEGF تولیدشده را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند و با افزایش دوز، میزان VEGF تولید شده، کاهش بیشتری داشت و تفاوت بین گروه‌ها معنادار بود (P<**0/05**) (جدول **1**).

دوزهای مختلف GnRH-a: تفاوت میزان VEGF تولیدشده بین گروه کنترل و گروه درمان GnRH-a با غلظت **50**µg، از لحاظ آماری معنادار نبود (P>**0/05**). اما میزان VEGF تولیدشده از دوز **100**µg GnRH-a (گروه دو) به بالا در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت و با افزایش دوز، میزان کاهش VEGF تولید شده بیشتر می‌شد و از لحاظ آماری معنادار بود (P<**0/05**) (جدول **1**).

دوزهای مختلف درمان ترکیبی، میزان VEGF تولیدشده را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند و با افزایش دوز دو دارو، میزان VEGF تولیدشده کاهش

بیشتری نسبت به کنترل داشت و تفاوت بین گروه‌ها معنادار بود (P<0/05) (جدول 1).

تأثیر غلظت‌های مختلف درمان‌های دارویی بر ممانعت از رشد سلولی لیومیوم

با افزایش دوز رالوکسیفن، میزان ممانعت از رشد سلول‌های لیومیوم نسبت به گروه کنترل افزایش داشت و تفاوت بین گروه‌ها معنادار بود (P<0/05) (جدول 2).

در گروه درمان GnRH-a میزان ممانعت از رشد سلولی میوم بین گروه کنترل و دوزهای 300µg و 400µg تفاوت معنادار داشت و باعث ممانعت از رشد سلولی شد (P<0/05) ولی میزان ممانعت از رشد سلولی میوم بین گروه کنترل و دوزهای 50µg، 100µg و 200µg تفاوت معنادار نداشت (P>0/05) (جدول 2).

در گروه درمان ترکیبی با افزایش دوز، میزان ممانعت از رشد سلول‌های میوم افزایش داشت و این تفاوت بین گروه‌ها معنادار بود (P<0/05) (جدول 2).

بین هر سه گروه درمانی تفاوت گروه آخر نسبت به اول در میزان VEGF تولید شده بر حسب گروه اول معنادار بود. کاهش میزان VEGF تولیدشده در گروه درمان ترکیبی 79/17 درصد، در گروه درمان رالوکسیفن 64/74 درصد و در گروه درمان GnRH-a 55/29 درصد بود (P<0/05) (نمودار 1).

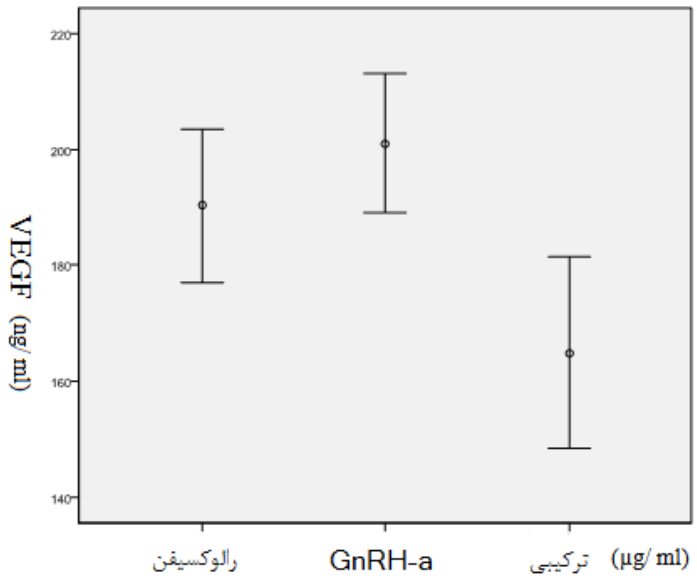
جدول1- تأثیر غلظت‌های مختلف رالوکسیفن و GnRH-a به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر میزان VEGF تولیدشده

گروه درمان	کنترل	گروه 1 (µg/ml)	گروه 2 (µg/ml)	گروه 3 (µg/ml)	گروه 4 (µg/ml)	گروه 5 (µg/ml)
تعداد نمونه‌ها	12	12	12	12	12	12
میزانVEGF تولید شده در GnRH-a (ng/ml)	255/50	255/08	224/42	189/58	167/67	114/17
Pvalue		1		0	0	0
میزانVEGF تولید شده در رالوکسیفن(ng/ml)	252	240	211/83	197/75	152/08	88/83
Pvalue		0	0	0	0	0
میزانVEGF تولید شده در ترکیب دو دارو(ng/ml)	243/69	229/18	208/83	150/17	105	51
Pvalue		0	0	0	0	0

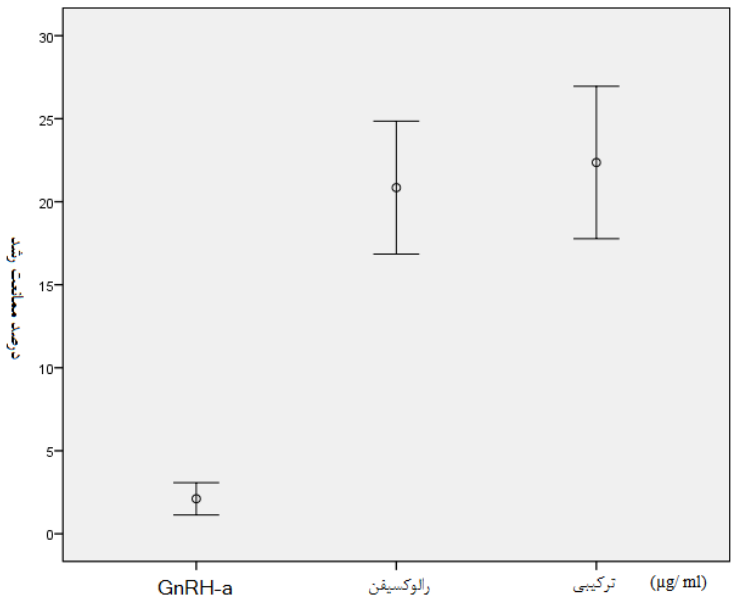
جدول2- تأثیر غلظت‌های مختلف رالوکسیفن و GnRH-a به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر ممانعت از رشد سلولی میوم

گروه درمان	کنترل	گروه 1 (µg/ ml)	گروه 2 (µg/ ml)	گروه 3 (µg/ ml)	گروه 4 (µg/ ml)	گروه 5 (µg/ ml)
تعداد نمونه‌ها	12	12	12	12	12	12
ممانعت در GnRH-a	0	0	0	0	1/92	10/75
Pvalue		1	1	1	0/005	0
ممانعت در رالوکسیفن	0	7/58	11/83	21/33	34/92	49/42
Pvalue		0	0	0	0	0
ممانعت در ترکیب	0	7	12/42	22/67	34/67	57/33
Pvalue		0	0	0	0	0

بین سه گروه درمانی میزان ممانعت از رشد سلولی گروه آخر نسبت به اول بر حسب گروه ماقبل آخر معنادار بود. میزان ممانعت از رشد سلولی در گروه درمان ترکیبی **70/77** درصد، در گروه درمان رالوکسیفن **60/76** درصد و در گروه GnRH-a **15/83** درصد بود **(P<0/05)** (نمودار **2**). این ارقام در گروه GnRH-a در سه گروه اول دوزهای دارویی صفر درصد بود و لذا تفاوتی نداشتند.



نمودار 1 - تأثیر غلظت‌های مختلف رالوکسیفن و GnRH-a به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر میزان VEGF تولیدشده



نمودار 2 - تأثیر غلظت‌های مختلف رالوکسیفن و GnRH-a به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر ممانعت از رشد سلولی میوم

بحث

در مطالعات محدودی که بر روی رشد لیومیوم انجام شده پیشنهاد شده که آنژیوژنز می‌تواند نقش اساسی را در تنظیم رشد میوم ایفا کند. GENTRY و همکارانش نشان دادند که میزان بیشتر VEGF در لیومیوم نسبت به بافت میومتر مجاور، دلالت بر نقش VEGFدر پاتولوژی لیومیوم دارد. در این مطالعه با مصرف GnRH-a بیان VEGF در لیومیوم متوقف نشد و پژوهشگران نتوانستند وابستگی بین سرکوب استروژن با GnRH-a و بیان VEGF را در لیومیوم و میوم مجاور نشان دهند (**12**). بنابراین به‌نظر می‌رسد که یک مسیر متفاوت (غیروابسته به استروژن) در تحریک رشد لیومیوم وجود دارد. این یافته می‌تواند با استفاده از آنتی‌بادی علیه VEGF و دستکاری گیرنده VEGF جهت کنترل رشد لیومیوم کاربرد بالینی داشته باشد (**13**).

در مطالعه Harrison-wodrych و همکاران که پروتئین VEGF و mRNA را در سلول‌های میومتر و لیومیوم انسانی بعد از درمان دارویی رالوکسیفن و GnRH-a بر بیماران آزمایش کردند، تفاوتی در میزان پروتئین VEGF-A و mRNA در میومتر و لیومیوم 29 زن دیده نشد (**14**).

بر خلاف آن در مطالعه Di-lieto و همکاران، تأثیر تجویز GnRH-a به بیماران، در کاهش حجم رحم و لیومیوم و کاهش آشکار در تعداد عروق خونی در میوم‌های درمان‌شده نشان داده شد و بیان ایمیونوهیستوکمیکال VEGF، bfgf، pdgf و رگ‌سازی در بیماران درمان‌شده در مقایسه با درمان‌نشده کاهش داشت (**15**).

در مطالعه دیگری Di lieto-polio و همکارانش پاسخ کلینیکی کوچک شدن رحم بعد از درمان با GnRH-a را نشان دادند و نقش پاتولوژیک bFGF، VEGF و pDGF در رشد میوم و واسکولاریزاسیون پیشنهاد شد (**16**).

در مطالعه Khaleqre Newaz Khan و همکارانش نیز اثر GnRH-a بر نمونه‌های بیوپسی میومتر و آندومتر زنان با آندومتریوم تخمدانی و آدنومیوز و میوم رحمی، در کاهش واکنش‌های التهابی و آنژیوژنز اثبات شد (**17**).

در مطالعه حاضر نیز تأثیر GnRH-a در دوزهای مختلف در کاهش میزان VEGF به‌عنوان فاکتوری از آنژیوژنز عروق و مؤثر بر رشد لیومیوم اثبات شد. همچنین ممانعت از رشد سلولی میوم در غلظت‌های بالای GnRH-a دیده شد.

در مطالعه Baytor و همکارانش مشخص شد که رالوکسیفن به اندازه GnRH-a در کاهش حجم لیومیوم مؤثر است و حجم لیومیوم با مصرف رالوکسیفن کاهش می‌یابد (**6**).

در مطالعه Jan Liu برای اولین‌بار اثر رالوکسیفن در کاهش رشد و تکثیر سلول‌های میوم کشت داده شده گزارش شد (**18**).

در مطالعه Ohara اثر درمان رالوکسیفن بر کاهش سایز لیومیوم در زنان بعد از یائسگی ثابت شد و تأثیر آن در قبل از یائسگی ثابت نشد (**7**).

با این وجود نتایج متاآنالیز Chen و همکارانش، تأثیر مهارکننده‌های انتخابی استروژن بر کاهش سایز لیومیوم را ثابت نکرد (**19**).

مطابق این نظریه در مطالعه S.Palomba و همکاران درمان با رالوکسیفن در زنان قبل از سنین یائسگی کاهشی در سایز لیومیوم ایجاد نکرد (**20**).

طبق مطالعه Stefan J irecek و همکاران درمان با رالوکسیفن با دوز 180 میلی‌گرم در روز به‌مدت 3 ماه، از رشد لیومیوم در زنان سنین قبل از یائسگی جلوگیری کرد و سایز لیومیوم را کاهش داد (**21**).

در هیچ‌کدام از این مطالعات تأثیر رالوکسیفن بر فاکتورهای رشد عروقی سنجیده نشده بود و تأثیر رالوکسیفن در زنان سنین باروری متناقض بود. ولی در مطالعه حاضر اثر دوزهای مختلف رالوکسیفن بر کاهش میزان VEGF به‌عنوان فاکتور رشد عروقی که بیانگر رشد میوم است اثبات گردید.

در این مطالعه رالوکسیفن برنمونه‌های میوم زنان سنین باروری تأثیر داشته و میزان VEGF را کاهش داد. در مطالعه اخیر رالوکسیفن بر رشد سلول‌های میوم تأثیر داشته و مانع از رشد سلول‌های میوم در محیط کشت شد.

در مطالعه S.Palomba و همکاران، درمان با رالوکسیفن با دوز 60 میلی‌گرم در روز، در ترکیب با GnRH-a در مقابل درمان GnRH-a به‌تنهایی، در زنان قبل از سنین یائسگی کاهش بیشتری در سایز لیومیوم ایجاد کرد (22).

در مطالعه حاضر ممانعت از رشد سلول‌های میوم نیز در گروه درمان ترکیبی رالوکسیفن با GnRH-a نسبت به گروه GnRH-a به‌تنهایی بیشتر بود. نکته جالب در این مطالعه تأثیر بیشتر رالوکسیفن در کاهش میزان VEGF نسبت به GnRH-a بود که تفاوت معناداری در کل نمونه‌های مورد بررسی وجود داشت. این یافته شاید به‌دلیل زمان تأثیر دارو بر سلول‌های میوم و غلظت دارو و تعداد سلول‌های میوم مورد مطالعه و درصد خلوص دارو باشد که نیازمند انجام مطالعات بیشتر است.

نتیجه‌گیری

درمان با رالوکسیفن و GnRH-a میزان VEGF و رشد سلول‌های میوم را کاهش می‌دهد.

References

1. Islam MS, Protic O, Giannubilo SR, Toti P, Tranquilli AL, Petraglia F, et al. Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Mar;98(3):921-34.
2. De Leo V, Morgante G. Uterine fibromas and the hormonal pattern: the therapeutic considerations. Minerva Ginecol. 1996;48(12):533-8.
3. Vollenhoven BJ, Herington AC, Healy DL. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in uterine fibroids and myometrium. Gynecol Obstet Invest. 1995;40(2):120-4.
4. Van der Ven LT, Roholl PJ, Gloudemans T, Van Buul-Offers SC, Welters MJ, Bladergroen BA, et al. Expression of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and IGF binding protein-3 in normal, benign and malignant smooth muscle tissues. Br J Cancer. 1997;75(11):1631-40.
5. Vu K, Greenspan DL, Wu TC, Zacur HA, Kurman RJ. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. Hum Pathol. 1998;29(4):359-63.
6. Baytur YB, Ozbilgin K, Cilaker S, Lacin S, Kurtul O, Oruc S, et al. A comparative study of the effect of raloxifene and gosereline on uterine leiomyoma volume changes and estrogen receptor, progesterone receptor, bcl-2 and p53 expression immunohistochemically in premenopausal women. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2007;135(1):94-103.
7. Ohara N. Selective estrogen receptor modulator and selective progesterone receptor modulator: therapeutic efficacy in the treatment of uterine leiomyoma. Clin Exp Obstet Gynecol. 2005;32(1):9-11.
8. Shimomura Y, Matsuo H, Samoto T, Maruo T. Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(6):2192-8.
9. Toth-Jakatics R, Jimi S, Takebayashi S, Kawamoto N. Cutaneous malignant melanoma: correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor. Hum Pathol. 2000;31(8):955-60.
10. Hermon TL, Moore AB, Yu L, Kissling GE, Castora FJ, Dixon D. Estrogen receptor alpha (ERalpha) phospho-serine-118 is highly expressed in human uterine leiomyomas compared to matched myometrium. Virchows Arch. 2008;453(6):557-69.
11. Bartlett SR, Sawdy R, Mann GE. Induction of cyclooxygenase-2 expression in human myometrial smooth muscle cells by interleukin-1beta: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. J Physiol. 1999;520 Pt 2:399-406.
12. Gentry CC, Okolo SO, Fong LF, Crow JC, Maclean AB, Perrett CW. Quantification of vascular endothelial growth factor-A in leiomyomas and adjacent myometrium. Clin Sci (Lond). 2001;101(6):691-5.
13. Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. J Cell Biol. 1995;129(4):895-8.
14. Harrison-Woolrych ML, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Smith SK. Localization and quantification of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid in human myometrium and leiomyomata. J Clin Endocrinol Metab. 1995;80(6):1853-8.

15. Di Lieto A, De Falco M, Mansueto G, De Rosa G, Pollio F, Staibano S. Preoperative administration of GnRH-aplus tibolone to premenopausal women with uterine fibroids: evaluation of the clinical response , the Immunohistochemical expression of PDGf , bfGf and VEGf and the vascular pattern. steroids. 2005; 70 (2): 94-102.
16. Di Lieto A, De Falco M, Pollio F, Mansueto G, Salvatore G, Somma P, et al. Clinical response, vascular change, and angiogenesis in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated women with uterine myomas. J Soc Gynecol Investig. 2005;12(2):123-8.
17. Khan KN, Kitajima M, Hiraki K, Fujishita A, Sekine I, Ishimaru T, et al. Changes in tissue inflammation, angiogenesis and apoptosis in endometriosis, adenomyosis and uterine myoma after GnRH agonist therapy. Hum Reprod. 2010;25(3):642-53.
18. Liu J, Matsuo H, Xu Q, Chen W, Wang J, Maruo T. Concentration-dependent effects of a selective estrogen receptor modulator raloxifene on proliferation and apoptosis in human uterine leiomyoma cells cultured in vitro. Hum Reprod. 2007;22(5):1253-9.
19. Wu T, Chen X , Xie L. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) for uterine leiomyomas. copyright. Cochrane Database Syst Rev. 2007;(4):CD005287.
20. Palomba S, Sammartino A, Di Carlo C, Affinito P, Zullo F, Nappi C. Effects of raloxifene treatment on uterine leiomyomas in postmenopausal women. Fertil Steril. 2001;76(1):38-43.
21. Jirecek S, Lee A, Pavo I, Crans G, Eppel W, Wenzl R. Raloxifene prevents the growth of uterine leiomyomas in premenopausal women. Fertil Steril. 2004;81(1):132-6.
22. Palomba S, Russo T, Orio FJr, Tauchmanova L, Zupi E, Panici PL, et al. Effectiveness of combined GnRH analogue plus raloxifene administration in the treatment of uterine leiomyomas: a prospective, randomized, single-blind, placebo-controlled clinical trial. Hum Reprod. 2002;17(12):3213-9.