

## Effect of Carbamazepine drug on formation of decidual tissue in femal of *Mus musculus*

### تأثير عقار الكاربامازيبين على تكوين النسيج الساقطي في أنثى الفئران البيضاء

شيماء مالك<sup>1</sup> أكرم يوسف ياسر<sup>2</sup> نهلة عبد الرضا البكري<sup>3</sup>

<sup>1</sup> قسم علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة <sup>2</sup> كلية طب الأسنان

جامعة كربلاء <sup>3</sup> كلية التربية ابن الهيثم جامعة بغداد

بحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

#### الخلاصة

يعد غرس الكيسة الاربمية واحدة من العمليات الحساسة في حياة الجنين النامي. لذا فإن هذه المرحلة الحرجة ممكن ان تكون تحت التهديد من العديد من العقاقير ذات التأثير الضار ومنها عقار الكاربامازيبين والذي تتناوله كثير من الامهات لعلاج حالات الصرع. لذلك تم عمل تلك الدراسة الحالية لمعرفة تأثير هذا العقار على عملية الغرس وخاصة في اليومين السابع والتاسع من الحمل. وقد استخدم في هذه التجربة 169 أنثى حامل من الفئران البيضاء وبمعدل اوزان 25 غم. قسمت الفئران الى مجموعتين مجموعة تحكم جرعت وعن طريق الفم بمحلول الملح الفسيولوجي واخرى مجموعة معاملة جرعت وعن طريق الفم بعقار الكاربامازيبين بتركيز 15 ملغم / كغم. تم عمل مقاطع نسجية من اجزاء ارحام الفئران الحاوية على الجنين بعد تثبيتها بمحلول بوبن وقطعت مقاطع البارافين بسماكة تتراوح ما بين (5-8) مايكرون ولونت المقاطع بملون الهيموتوكسلين والايوسين وبملون الكروم الثلاثي.

أظهرت نتائج البحث عدم وجود تأثير لعقار الكاربامازيبين على الغرس وتكوين النسيج الساقطي المصاحب لها. وكان ذلك بتطابق نتائج مجموعتي التحكم والمعاملة وكان ذلك جليا بغرس الكيسة الاربمية وتكوين النسيج الساقطي وبانتشار غزير للاوعية الدموية في مكان الغرس. دلت هذه النتائج على حصول النجاح في الحمل في المرحلة الاولى منه.

#### ABSTRACT

Implantation of blastocyst is considered as a sensitive process in the life of growing embryo. Thus this critical period could be under threat from the harmful effect of many drugs ,among them is the carbamazepine which is used by many women for a treatment of epilepsy .

The present experiment was designed to study the effect of this drug on the process of implantation ؛especially during the days 7 and 9 of pregnancy. For those purpose 169 pregnant albino mice, of 25 gm weight for each one, were used .The mice were divided into control group given orally normal saline, and treated group given orally carbamazepine with concentration of 15 mg\kg. Samples from pregnant uteri containing the embryos were used. They were first fixed in Boun's solution and 5-8 um paraffin sections were cut to be stained with H and E and one step trichrome stains.

The results from control group and treated group have demonstrated that there was no effect of the drug on the process of implantation and the formation of decidual tissue which accompanied the implantation. Both control group and treated groups were showing the same results.

In addition to that the blood vessels were well developed at the site of implantation. All these results were signs of success of early period of pregnancy.

#### المقدمة

تتميز فترة الحمل بأنها من الفترات الحرجة التي تتعرض فيها الأم الحامل إلى العديد من التأثيرات، واشد ما تكون عليه هذه التأثيرات هي في الفترة المسماة بالفترة الجنينية Embryonic period ، والتي تمتد في الإنسان من مرحلة البيضة المخصبة لغاية الأسبوع الثامن من الحمل. وخلال الفترة الجنينية تحدث عملية في غاية الاهمية الا وهي غرس الكيسة الاربمية . الغرس هو عملية تفاعل فسلجي بين الكيس الارومي Blastocyst وبطانة الرحم Endometrium وتشتمل على تغيرات في بطانة الرحم تختلف حسب نوع التسخيد Placentation. ويعقب ذلك انطار الكيسة الاربمية في داخل بطانة الرحم، وخلال الغرس تتحفز الخلايا السدوية لبطانة الرحم Endometrial Stromal Cells لتكوين النسيج الساقطي Decidual tissue . وتوصف التغيرات التي تحدث في السدى عند حدوث التفاعل الساقطي بأنها تغيرات تحت تأثيري هرمون البروجسترون اولا والاستروجين ثانيا (1).

ان اهمية النسيج الساقطي تأتي من دوره في تغذية الجنيني المراحل المبكرة من الحمل قبل تكوين المشيمة بسبب تراكم الكلايكوجين Glycogen في خلاياه (2,3) وكذلك له دور مهم في الحد من الانغراس الزائد للكيسة الاريمية في الرحم (4) ، ويلعب دورا في حماية الجنين من الجهاز المناعي للام (5)

تعد عملية الغرس من الاحداث المهمة في الحمل والخطوة الرئيسية التي تؤسس لتكوين المشيمة placenta ونجاح الحمل (6) وهذا يعنى انها حاسمة لمستقبل التكوين الجنيني (7). ان عملية الغرس في الفتران تحدث في اليوم الخامس والنصف من الحمل. ونظرا لحساسية موقف الحامل خلال فترة الغرس لذا كان من المفروض ان تتعد الحامل عن كل ما يسبب الضرر للجنين . وهذه المسببات اوجزاها علم الاجنة بما يسمى Teratogen وهي ذات انواع متعددة ومنها العقاقير التي تضطر الام الحامل الى تناولها ومن هذه العقاقير هو عقار الكاربامازيبين Carbamazepine (CBZ) الذي يعطى لعلاج الصرع Epilepsy يتداخل عقار الكاربامازيبين مع السيالات العصبية Nerve impulses في الدماغ و المسؤولة عن الصرع والالام ، وبما ان (CBZ) متعادل كيميائياً وهو ذائب في الدهون فهذا يمكنه من المرور بسهولة خلال حاجز دم الدماغ (blood – brain barrier) وبقيّة الاغشية في الجسم (8) .

اظهر عقار الـ ( CBZ ) خصائص مضادة للأختلاج في الجرذان والفئران مع الحث الكهربائي والكيميائي للصرع ، يظهر نشاطه من خلال تقليل الاستجابات المشبكية Synaptic responses المتعددة ، إذ يخفض بصورة كبيرة الالم المحث بواسطة تنبيه عصب تحت الحجاج Infraorbital nerve في الجرذان ، كما و يخفض الوسع المهادي Thalamic potential والبصلي bulbar والمنعكسات المشبكية ، ويؤثر هذا العقار (CBZ) على فولتية قنوات الصوديوم voltage – dependent sodium channel في الخلايا (9)

ويرتبط حوالي 75% من الكاربامازيبين مع بروتينات البلازما ، وان درجة ارتباطه بالبروتين تختلف قليلاً باختلاف الانواع ، وهو يتأيض في الكبد Liver بواسطة عملية الاكسدة Oxidation قبل ان يطرح في الادرار إذ إنّ الايض الرئيسي للعقار هو Carbamazepine – 10,11-epoxide ، وان حوالي 1% فقط من الجرعة المعطاة تطرح بشكل غير متأيض (10) . أشارت بعض الدراسات الى زيادة ايض عقار الكاربامازيبين خلال مدة الحمل ، إذ يعبر هذا العقار الى المشيمة ويصل الى الجنين خلال المدة الجنينية ويزول بسرعة بعد الولادة (11) . وضعت هذه الدراسة لمعرفة تأثير عقار الكاربامازيبين على غرس الكيسة الاريمية و تكوين النسيج الساقطي .

## المواد وطرائق العمل

### العقار المستخدم

استخدم في هذه الدراسة عقار Carbamazepine تم انتاجه في سويسرا من قبل شركة نوفارتس Novartis pharma AG, Basle, Switzer land والذي يستخدم كعلاج مضاد للصرع Antiepileptic والمادة الفعالة 5H-dibemzo [b,f] azepine-5- carboxamide (12) و كل قرص يحتوي 200 ملغم.

تضمنت التجربة استخدام 169 انثى فأر ابيض من الضرب Balb/c، اختيرت الفئران بعمر (2.5-3) شهر كان معدل اوزانها (25)غم، وكانت بحالة صحية جيدة، وضعت الحيوانات تحت ظروف مختبرية ملائمة من حيث درجة الحرارة والتهوية والاضاءة ، قسمت الفئران الى مجموعتين وكالاتي:

اولاً: مجموعة التحكم : شملت (65) انثى حامل جرعت المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal Saline (Nacl 0.9% . ثانياً : مجموعة المعاملة : شملت (104) انثى حامل جرعت عن طريق الفم عقار الكاربامازيبين carbamazepine بتركيز 15ملغم/كغم من وزن الجسم ابتداءً من اليوم الذي تظهر فيه السداة المهبلية Vaginal plug حيث اعتبر اليوم الذي لوحظ فيه السداة المهبلية هو اليوم صفر من الحمل واليوم الذي يليه هو اليوم الاول من الحمل (13,14) إذ جرعت مجموعة لمدة سبعة ايام واخرى لمدة تسعة ايام .

استخدمت مادة الكلوروفورم المخدرة لقتل الاناث الحوامل من مجموعة التحكم ومجموعة المعاملة في اليومين السابع و التاسع من الحمل . تم وضع قطع من الارحام الحاوية على الاجزاء التي حصل فيها الغرس في مثبت بويين المائي Aqueous Bouins و بقيت فيه لمدة (12-24) ساعة.

تم تحضير المقاطع النسجية بسماكة (5-8) مايكرون لونت بالمونيات الاتية:

1. الهيموتوكسلين والايوسين لتوضيح البنيان النسجي العام .

2. Gomoris one step trichrome ملون الكروم الثلاثي ذو الخطوة الواحدة لاستظهار الالياف الغراوية.

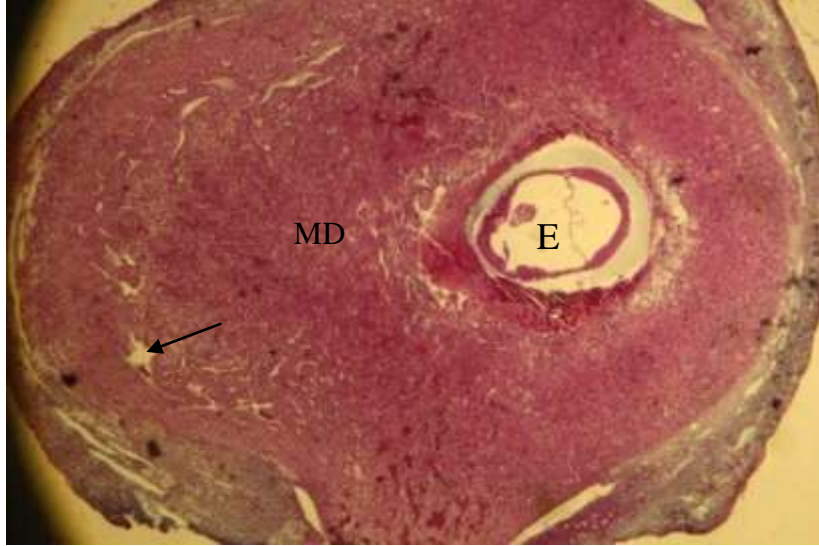
## النتائج

### اليوم السابع من الحمل:

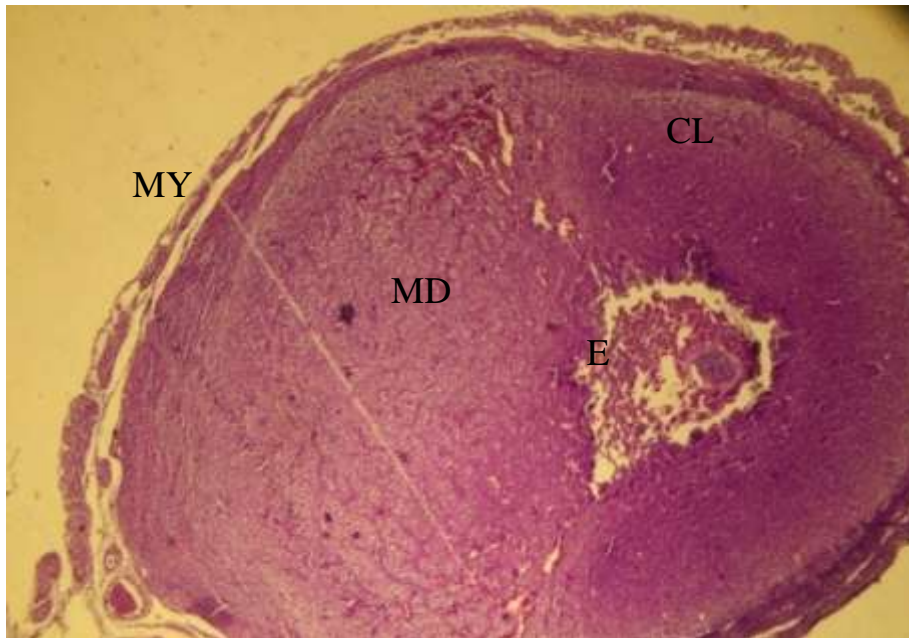
تم تحديد مكان الغرس للكيسة الاريمية في بطانة الرحم والتي تمثل البدايات الاولى للجنين في فئران مجموعة التحكم لليوم السابع بوجود انتفاخات عقدية تشبه خرز المسبحة Beaded appearance على طول قرني الرحم .

### النتائج النسجية

أظهرت المقاطع النسجية لمكان الغرس في اليوم السابع من الحمل في كلتا مجموعتي التحكم والمعاملة نتائج متشابهة من حيث تكوين النسيج الساقطي في الحمل الطبيعي (شكل 1، 2) وكان ذلك متمثلاً بتحول خلايا السدى لبطانة الرحم، والتي معظمها خلايا مولدة للاليف fibroblasts، وتمايزها إلى خلايا النسيج الساقطي وكان هذا التغيير واضحاً خلال هذا اليوم في المنطقة المساريقية لبطانة الرحم. لقد ظهر النسيج الساقطي في هذه المنطقة على شكل خلايا كبيرة كثيرة العدد مكتنزة ومتراصة ونتيجة لذلك فقد انعدم وجود الفسح ما بين الخلايا وانتشر وجود الجيوب الدموية على المنطقة القريبة من الكيسة الأريمية المغرسة وبين المقطع النسجي لهذا اليوم كذلك امتداد الجيوب الدموية إلى المثلث المساريقي الرحمي (شكل 1).



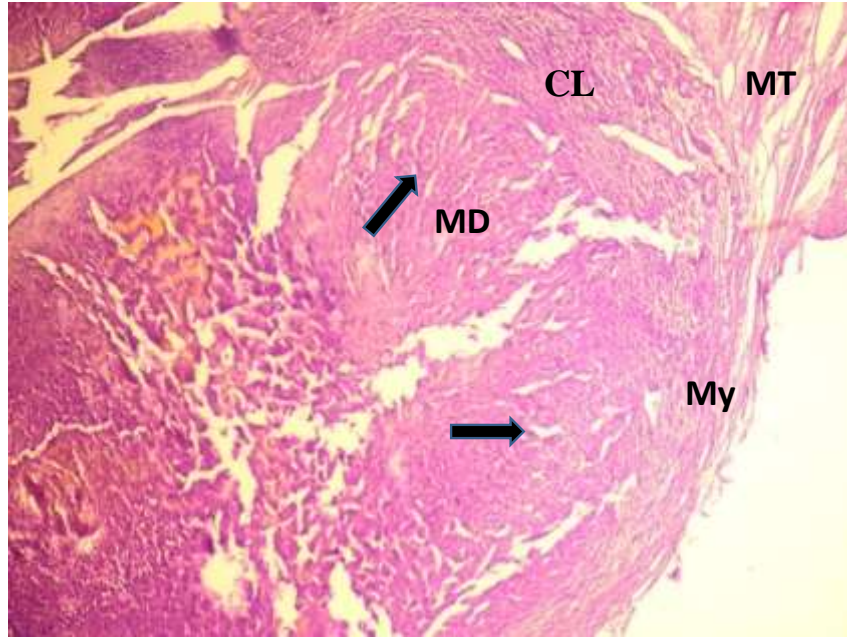
شكل رقم 1: مقطع مستعرض من جنين فأر عمر 7 يوم من الحمل في مجموعة التحكم ، لاحظ الجنين ( E ) ، وهو محاط بالنسيج الساقطي (MD) ، السهم ← يشير إلى الجيوب الدموية في النسيج الساقطي المساريقي ملون الكوموري الثلاثي الالوان ، 4X .



شكل رقم 2 : مقطع مستعرض من رحم فأرة حامل يبين فيه الجنين بعمر 7 يوم من الحمل. مجموعة المعاملة بعقار الكاربامازيبين تركيز 15mg/kg ، لاحظ وجود طبقة خلوية رقيقة (CL) ما بين الطبقة العضلية للرحم (MY) والنسيج الساقطي (MD) . ملون الهيموتوكسلين و الايوسين (H& E) ، 4X .

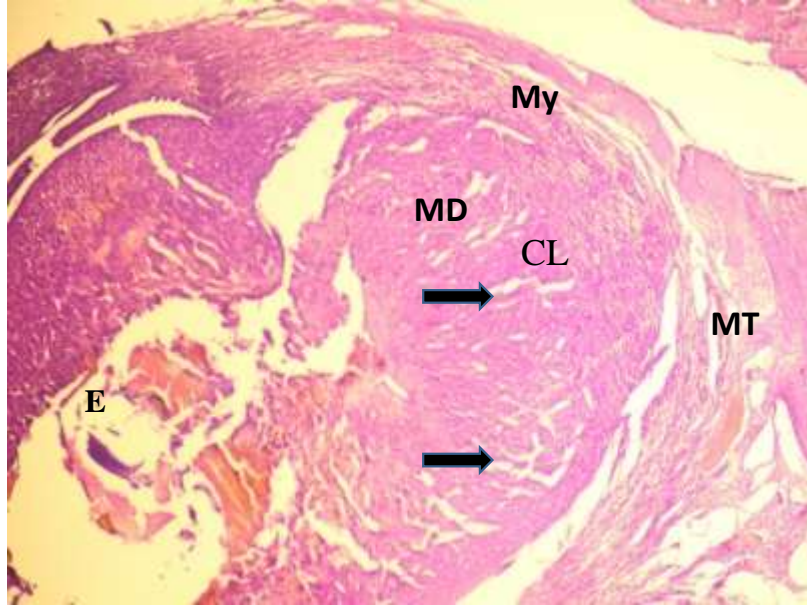
### اليوم التاسع من الحمل:

كان النمو واضحا في النسيج الساقطي وخاصة في المنطقة المساريقية من بطانة الرحم في مجاميع السيطرة والمعالجة. ظهر النسيج الساقطي المساريقي في المنطقة المحصورة ما بين الطبقة العضلية للرحم من جهة والجنين من جهة أخرى وكان المثلث المساريقي الرحمي واضحا في هذا اليوم من الحمل. مثل هذا المثلث الطريق الذي تسلكه الأوعية الدموية المغذية للرحم. شوهد كذلك وفرة في الأوعية الدموية في هذه المنطقة والتي كانت تأخذ مسارا متعرجا ومتوازية مع بعضها البعض ( شكل 3 و 4). لقد لوحظ أن مسار هذه الأوعية الدموية هو باتجاه مستمر مع الأوعية الدموية الكبيرة القادمة من المثلث المساريقي الرحم. لقد مثلت الأوعية الدموية للمثلث المساريقي الرحمي المصدر الأساس للجهاز للدم للرحم ككل. أما الجنين فقد كانت الزيادة في نموه واضحة عن اليوم السابع ( شكل 3 و 4).



شكل رقم 3: مقطع مستعرض من رحم فأرة بعمر 9 يوم من الحمل من مجموعة المعاملة بعقار الكارباماز بين تركيز 15 mg/kg، لاحظ النمو الواضح للنسيج الساقطي المساريقي الرحمي ( MD ) ووفرة الأوعية الدموية فيه واتجاهها الى المثلث المساريقي الرحمي ( MT ) وكذلك طبقة خلوية رقيقة (CL) ما بين الطبقة العضلية للرحم ( MY ) والنسيج الساقطي، السهم يشير الى الأوعية الدموية. ملون الهيموتوكسلين و الايوسين ( H & E ) ، 40X .





شكل رقم 4: مقطع مستعرض من رحم فأرة حامل في تسعة من الحمل يبين فيه الجنين (E) من مجموعة المعاملة بعقار الكاربامازيبين تركيز 15 mg/kg وكذلك النسيج الساقطي (MD) الذي يتجه بمعظمه نحو المثلث المساريقي الرحمي (MT)، لاحظ وجود طبقة خلوية رقيقة (CL) ما بين الطبقة العضلية للرحم (MY) والنسيج الساقطي، السهم يشير الى الاوعية الدموية، ملون الهيموتوكسليين و الايوسين (H & E)، 40X.

#### المناقشة

بينت نتائج الدراسة الحالية جملة من الملاحظات حول عملية الغرس وما صاحبها من تكوين للنسيج الساقطي وهل كان هنالك اى تأثير لعقار الكاربامازيبين في منع حدوث تكون النسيج الساقطي.

كان من الواضح ومن خلال نتائج البحث الحالي عدم تعارض العقار المستخدم مع عملية الغرس و يعتبر هذا النجاح من العمليات المهمة في الانتقال بالحمل من مرحلة الى اخرى وتعنى بذلك الانتقال بالحمل من المرحلة الجنينية الى مرحلة لاحقة. لقد كان واضحا من نتائج البحث الحالي ان الخطوات الطبيعية لمرحلة الحمل خلال فترة الغرس قد اخذت مسارها الطبيعي. فقد تم الغرس للكيسة الاريمية وتكون الجنين وصاحب ذلك تكوين النسيج الساقطي وهذا يعنى اشارة مهمة الى نجاح الحمل على الاقل فى هذه الفترة. وهذا يتوافق مع ما توصل اليه عدد من الباحثين خلال تتبعهم لتعريف الحمل الناجح فى الحالة الطبيعية وخلال مراحلها المختلفة ومنها نجاح مرحلة الغرس وما يعقبها من تكوين للنسيج الساقطي<sup>(16,15)</sup>. وحيث أن عملية الغرس فى الفئران كانت قد بدأت خلال اليوم الخامس من الحمل<sup>(17)</sup> وقد اعقب اتصال الكيسة الاريمية بعملية الغرس واحدة من العمليات المهمة لانجاح الحمل الا وهى عملية تكوين النسيج الساقطي<sup>(17,18)</sup> والتي تميزت كما ذكر الباحثون الاخرون بزيادة عدد خلايا السدى الرحمي واكتنازها وتمايز الساييتوبلازم الخاص بها واعقب ذلك تراس هذه الخلايا. وهذا التسلسل فى خطوات تكوين النسيج هو بالضبط ما حصل فى مجاميع التحكم والمعاملة للبحث الحالي. ان زيادة اعداد الخلايا هو نتيجة التأثيرات الهورمونية التي اثرت على الخلايا الاصلية وهى الخلايا المولدة للالياف الموجودة فى بطانة الرحم واعقب ذلك تمايز الساييتوبلازم الخاص بها، وفى النهاية تتراس هذه الخلايا مع بعضها البعض<sup>(19)</sup>. ان تمايز هذه الخلايا هو نتيجة اكتساب الساييتوبلازم لعضيات ساييتوبلازمية منتجة للبروتين مثل الشبكة الاندوبلازمية المحببة وجهاز كولجى والمائتوكونديريا حيث ان الخلايا الساقطية تكون وخلال الحمل مسؤولة عن انتاج كثير من المواد مثل الدهون Lipids و الكلايوجين<sup>(20,21)</sup> Glycogen والتي تعتبر مهمة فى ديمومة واستمرار الحمل<sup>(22)</sup>.

ان تراس خلايا النسيج الساقطي هو لاكتساب الغشاء الخلوى لخلاياه لانواع من الترابط الخلوى مثل الترابط المصمت Tight junction<sup>(3,23)</sup> والذي يساعد كما ذكر الباحثون الاخرون على عدم نفاذية النسيج الساقطي وهذا سوف يمنع اية مواد ضارة قادمة من الام من الوصول الى الجنين<sup>(24)</sup> اضافة الى تموضع النسيج الساقطي كسد بوجه الاندفاع الزائد للجنين وخلاياه الغذائية Trophoblasts والتي عادة ما تهجر من الجنين الى نسيج الام ولكن ضمن نظام وعدد محسوب<sup>(25,26)</sup>.

كما لوحظ تميز النسيج الساقطي المساريقي الرحمي، كما بينت نتائج البحث الحالي، بكثرة الاوعية والجيوب الدموية وامتدادها مع الأوعية الدموية الأكبر في المثلث المساريقي الرحمي وهذا يتوافق مع ما ذكره الباحثون<sup>(4,27,28)</sup> فى توصيفهم للتسلسل الطبيعي لخطوات الحمل الطبيعي ومدى حاجة الجنين النامي للامداد الدموي لأجل النمو والانتقال بالحمل من مرحلة إلى أخرى.

## المصادر References

1. Sposito , D.R. and Santos , A.R.Jr. (2011) . Histochemical study of early embryo implantation in rats . Int. J. Morphol. 29 (1) : 187- 192.
2. Cross, J.C. and Mickelson, L. (2006). Nutritional influences on implantation and placental development. Nut. Rev. 64: 72–91.
3. Jones, C.J.P.; Carter, A.M.; Aplin, J.D. and Enders, A.C. (2007). Glycosylation at the fetomaternal interface in hemomonochorial placentae from five widely separated species of mammal: is there evidence for convergent evolution? Cells, Tiss. org. 185:269-84.
4. Wooding, P. and Burton, G. (2008). Comparative placentation . Structures, functions and evolution. Berlin, Springer-Verlag, pp. 320-365 .
5. Scott, M.A.; Liu, I.K.; Overstreet, J.W. and Enders, A.C. (2000). The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the uterotubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy. J. Rep. Fer. Suppl. :415-21.
6. Deb , K. ; Reese , J. and Paria , B. C. (2006) . Methodologies to study Implantation in mice . Methods in MolecularMedicine . 121 : 9-34 .
7. Bai , Z. K. ; Tian , C. ; Cao , Y. K. and Luo , J. L. (2013) .Histochemical study of early Embryo Implantation in mice . Advanced Materials Research . 641-642 : 769-772.
8. Afshar , M. ; Moallem , S. A.; Baharara , J.; Takjo , T. and Golalipour , M.J. (2011) . Effect of vitamine B6 on the Developmental Toxicity of Carbamazepine in Mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences . 14 (2) : 99-106 .
9. Costa , L.G.;Aschner, M.; Vitalone, A.;Syversen , T. and Soldin ,O. P. ( 2013). Developmental Neuropathy of Environmental Agents. Annu Rev pharmacolToxicol . 44: 87-110.
10. Ambrosio , A. F. ; Soares\_Da\_ Silva , P. ; Carvalho , C. M. and Carvalho, A. P. (2002) Mechanisms of Action of Carbamazepine and its Derivatives , Oxcarbazepine , BIA 2-093 , and BIA 2-624 . Neurochemicals Research , 27 (1-2):121-130 .
11. Bertilsson , L. and Tomson , T . (1986) . Clinical pharmacokinetics and pharmacolgia effect of Carbamazepine - 10 , 11 epoxide . An update . Clinical Pharamcokinetics . 11 (3) : 177 - 98 .
12. Kalant , H. ; Grant , D.M. and Mitchell , J. ( 2007) . Principles of Medical Pharmacology . Seventh edition . Elsevier Canada . Pp.228 – 231 .
13. Waterman, R.E. (1976) . Topographical changes along the neural fold associated with neurulation in the hamster and mouse .Am. J.Anat. 146 : 151- 172 .
14. Biernacki, B.; Wfodarczyk , B. and Minta , M. ( 2000) . Effect of sodium valproat on rat embryo development in vitro . Bull. Vet. Ints. Pulaway . 44 :201 – 205 .
15. Jones, C.J.; Enders A. C. and Fazleabas, A.T. (2001). Early implantation events in the baboon (*Papioanubis*) with special reference to the establishment of anchoring villi.. Placenta. 22: 440- 56 .
16. Herington , J.F. ; Underwood , T. ; McConaha, M. and Bany , B. M. (2009) . Paracrine Signals from the Mouse Conceptus Are Not Required for the Normal Progression of Decidualization . Endocrinology . 150 (9) : 4404- 4413 .
17. Abrahamsohn, P.A. and Zorn , T.M. (1993). Implantation and decidualization in rodents. J. Exp. Zool. 266:603–628.
18. Wang, X.; Matsumoto, H.; Zhao, X.; Sanjoy, K.D. and Paria, B.C. (2004). Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation. J. Cell Sci. 117:53-62.
19. Kleinfeld , R.G.;Morrow ,H.A. and Defeo, V.J. (1976) . Intercellular Junctions between decidual cells in the growing deciduoma of the pseudopregnant rat uterus . Biology of reproduction . 15: 593- 603.
20. Enders, A.C. and Schlafke, S. (1967). A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. Am. J. Anat. 120: 185-226.

21. Schoenwolf , G.C. (2009) . Larsen's Human Embryology . fourth edition . Philadelphia , P.A. : Churchill Livingstone . P.P.53.
22. Sara, S.M; Pauline, Yi. and Laura, T.G. (2012). “Endometrial Stem Cells and Reproduction,” J. Obs. Gyn. Inter., V. pp.5.
23. Parr, M.B. and Parr, E.L. (1986). Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: studies using fluorescent-labeled proteins and dextrans. Biol. Rep. 34:393–403.
24. Singh, H. and Aplin, J.D. (2009). Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. J. Anat. 215: 3- 13.
25. Osol,G. and Mandala, M. (2009). Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy . Physiol. (Bethesda) 24: 58–71.
26. Pijnenborg, R. and Vercruysse, L. (2010). Animal models of deep trophoblast invasion. In: Placental bed disorders, 1<sup>st</sup> ed. R Pijnenborg, I Brosens, and R. Romero (eds.). Cambridge Uni. Press, Cambridge.pp: 127-140.
27. Carter, A.M. ; Enders, A.C.; Jones, C.J.P.; Mess , A. ; Pfarrer, C.; Pijnenborg, R. and Soma, H.(2006). Comparative placentation and animal models: patterns of trophoblast invasion - A workshop report. Trophoblast research Placenta. Suppl 1, 27:30-33.
28. Enders, A.C.; Blankenship, T.N.; Fazleabas, A.T. and Jones, C.J. (2001).Structure of anchoring villi and the trophoblastic shell in the human, baboon and macaque placenta. Placenta. 22: 284-303 .