بررسی تاثیرات سیکلوسپورین A بر ساختار بافتی تخمدان موش صحرایی

مهدی مهدیزاده Ph.D.☆♦، جواد رئوف سرشوری M.Sc.☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه آناتومی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز علوم پایه، گروه آناتومی

چکیده

* **هدف:** بررسی اثر شکل جدید داروی سیکلوسپورین A (Neoral) بر ساختار بافتی تخمدان موش صحرایی

* **مواد و روشها:** طی این مطالعه ۴۵ سر موش صحرایی با سن متوسط ۳ ماهه انتخاب و به دو گروه آزمون و یک گروه شاهد تقسیم شدند. به گروههای آزمون به ترتیب به میزان ۲۰ mg/kg و ۵mg/kg دارو از طریق زیر جلدی به مدت ۱۴ روز تزریق شد و گروه شاهد آب مقطر دریافت کرد. از میزان نمونه‌های به دست آمده از تخمدان و حیوان مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و پس از مراحل آماده سازی با دو روش H&E و تری‌کروم ماسون رنگ‌آمیزی شدند.

* **یافته‌ها:** بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بافتی پس از ۱۴ روز تزریق و یک هفته پس از اتمام تزریق بیانگر تغییراتی شامل افزایش ضخامت تونیکا آلبوژینه، آترزی فولیکولی، تخریب سلولهای گرانولوزا و ریزش آنها به حفره فولیکولی، تخریب اووسیتها، وجود ماکروفاژها بین سلولهای گرانولوزا و داخل حفره فولیکولی، فیبروز تخمدان، افزایش ضخامت تک داخلی و خارجی و افزایش ضخامت دیواره عروق بود.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل با توجه به عملکرد دارو (ایجاد تغییر در محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد، مهار سیتوکینها و تاثیر مستقیم بر فیبروستها) احتمالاً از طریق القا یا تشدید فرآیند آپوپتوزیس، فیبروز و افزایش مقاومت عروقی بافت تخمدان ایجاد شده است. لذا پیشنهاد می‌شود احتیاط در مصرف سیکلوسپورین A در زنان جوان مورد توجه قرار گیرد.

گل واژگان: سیکلوسپورین A، ساختار بافتی، سیستم ایمنی، تخمدان

مقدمه

سیکلوسپورین A (Cyclosporine A) یکی از داروهای مهم سرکوب کننده سیستم ایمنی به شمار می‌آید. این دارو ابتدا در سال ۱۹۷۸ به صورت خوراکی تهیه شد و برای سرکوب سیستم ایمنی بیماران نیازمند پیوند کلیه و مغز استخوان به کار رفت (۱، ۲، ۳). علیرغم مشاهده عوارض جانبی، تاثیرات مطلوب این دارو سبب تهیه اشکال مختلف خوراکی و تزریقی آن شد و با ورود آن به بازارهای دارویی جهان علاوه بر بقای پیوند آلوگرافت (کلیه، قلب، کبد و...) در درمان پسوریازیس و برخی بیماریهای خود ایمنی نظیر سندرم نفروتیک و دیابت نوع ۱ به کار رفت (۴، ۵، ۶).

سیکلوسپورین A عملکردهای گوناگونی در بدن انسان دارد؛ از جمله با تاثیر اختصاصی که روی لنفوسیتهای نوع T دارد، سبب مهار پاسخ ایمنی با واسطه سلولی می‌شود. از آنجایی که این دارو ماده‌ای چربی دوست است، توزیع گسترده‌ای در سراسر بدن دارد و سبب عوارض جانبی در اعضای مختلف می‌شود (۴، ۵، ۶، ۷، ۸). مطالعات گوناگونی که برای بررسی تاثیر این دارو بر دستگاه تولید مثل انسان و پستاندارانی چون خرگوش و موش صحرایی صورت گرفته است که منجر به نتیجه گیریهای متناقضی نیز شده است. چنانچه برخی از مؤلفین معتقد بودند که این دارو اثر سمی بر گنادها ندارد و برخی بر تراتوژن بودن آن اشاره نموده‌اند. از جمله Handelsman و همکاران در سال ۱۹۸۴ عملکرد تخمدان را پس از پیوند کلیه در ۲۴ زن بررسی نمودند و با توجه به شاخصهای هورمونی و مشاهدات کلینیکی چنین نتیجه گرفتند که CSA اثر زیان آوری بر عملکرد تخمدان نداشته و می‌تواند تخمک گذاری طبیعی داشته باشند؛ اما Chalabi پس از تزریق دوز درمانی این دارو در خرگوش و بررسی مقاطع بافت تخمدان به این نتیجه رسید که این تغییرات که همراه با نکروز، فیبروز فولیکولی، افزایش ضخامت تک و هیپرپلازی سلولهای تک خارجی است، بر خلاف نظریه قبلی می‌تواند به ساختمان تخمدان آسیب رسانده و عملکرد آن را دچار اختلال نماید (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳).

در سالهای اخیر فرمول جدیدی از این دارو با نام تجاری Neoral به بازار دارویی عرضه شده است که کم‌کم جایگزین داروی قبلی که بیشتر مطالعات روی آن صورت گرفته بود، شده است. این دارو جذب بیشتر و سریعتری نسبت به فرمول استاندارد قبلی دارد. در فرمول جدید حلالهای چربی دوست (Lipophilic) و آب دوست (Hydrophilic) همراه با یک سورفاکتانت (Surfactant) به سیکلوسپورین اضافه شده است (۱۴). لذا از آنجایی که بسیاری از بیماران تحت درمان پیوند اعضا، جوان و در سنین باروری هستند ممکن است این دارو عملکرد تولید مثلی آنها را دچار اختلال کند. پژوهش حاضر به منظور تعیین آثار نسل جدید این دارو (Neoral) بر ساختار بافتی تخمدان موش صحرایی انجام شده است.

مواد و روشها

در این بررسی، ۴۵ سر موش ماده بالغ از نژاد Sprague-Dawley به عنوان مدل بیولوژیکی با وزن متوسط ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم و سن متوسط ۳ ماهه و به طور تصادفی انتخاب شدند. محل نگهداری حیوانات به طور مطلوب در نظر گرفته شده و درجه حرارت ۲۰° تا ۲۵° سانتیگراد، رطوبت نسبی ۴۵ تا ۵۵ درصد و دوره تاریکی و روشنایی متناوب ۱۲ ساعته بود.

پس از چند روز که موشها با محیط و شرایط محل نگهداری جدید تطابق پیدا کردند، به سه گروه (هر گروه شامل ۱۵ سر) تقسیم شدند. گروههای A و B به عنوان آزمون و گروه C به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. موشهای صحرایی هر گروه در دسته‌های سه تایی در پنج قفس قرار داده شدند و موشهای هر گروه نشانه گذاری شدند.

نوع تزریقی داروی سیکلوسپورین A (Neoral, CSA LTD-Basel-Switzerland) انتخاب و چون تزریق زیر جلدی نسبت به روشهای دیگر سطح سرمی ثابت‌تری ایجاد می‌کند، این روش تزریق در نظر گرفته شد. به گروههای آزمون A و B به ترتیب به میزان mg/kg ۲۰ و mg/kg ۵۰ دارو به مدت ۱۴ روز تزریق شد و موشهای گروه (C) در همان مدت، آب مقطر با تزریق زیر جلدی (تقریباً ۱۰ واحد) دریافت کردند. تزریق به وسیله سرنگهای انسولین جداگانه شماره ۲۵ (برای سهولت تزریق محلول روغنی CSA) و در زمان مشخصی از روز (ساعت ۱۰ صبح تا ۱۳:۳۰ بعد از ظهر) در پشت حیوان (مطمئن‌ترین ناحیه برای تزریق زیر جلدی) انجام شد.

به فاصله هر سه روز وزن موشها اندازه‌گیری و در صورت مشاهده تغییر وزن، در دوز دارو تغییر مناسب بر حسب وزن جدید ایجاد شد. پس از اتمام دوره تزریق در روز ۱۵، هفت سر از موشهای هر گروه توسط استنشاق اتر کشته و تشریح شدند. نمونه‌های به دست آمده از تخمدان حیوان به مدت ۲۴ ساعت درون محلول فرمالین ۱۰درصد تثبیت و بعد از پاساژ بافتی با کمک میکروتوم (Leitz) مقاطعی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. نمونه‌ها به دو طریق معمولی (H&E) و اختصاصی (تری کروم ماسون (Trichrom, Masson)) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند و از تغییرات بافتی مشاهده شده عکس و اسلاید تهیه شد. باقیمانده موشهای صحرایی هر گروه پس از گذشت یک هفته از پایان دوره تزریق در روز ۲۲ به همان روش کشته شده و نمونه‌های بافتی مشابه گروه قبل تهیه شد. نمونه‌های گروههای A و B (در هر دو مقطع زمانی) با گروه C مقایسه و نمونه‌های گروههای A و B نیز در دو مقطع زمانی با یکدیگر قیاس و نتایج ثبت شد.

یافته‌ها

موشهای مورد آزمون پس از دوره‌های ۱۴ و ۲۱ روزه از زمان شروع تزریق CSA مطابق جدول ۱ تشریح شدند. در این میان یک سر موش صحرایی از گروه آزمون A در روز سیزدهم دچار تورم شکم و کاهش وزن شدید شد و چون توانایی ادامه مراحل آزمون را نداشت توسط استنشاق اتر کشته و تشریح شد. پس از باز کردن جدار شکم اتساع شدید معده و روده مشاهده شد که از آمار کسر گردید. در گروه آزمون B نیز یک سر موش صحرایی روز چهاردهم تلف شد که این مورد نیز از آمار کسر شد. در گروه شاهد C هیچ موردی از بیماری خاص، مرگ

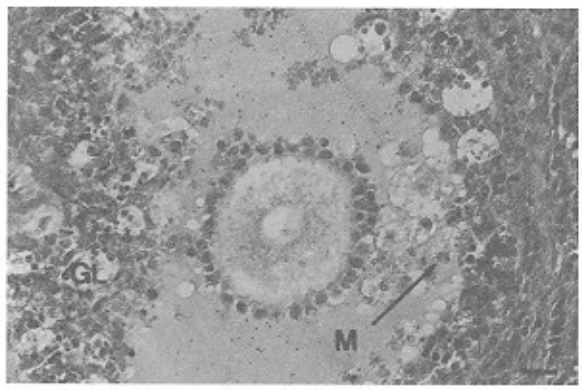
یا اختلالی مشاهده نشد. در بررسی و مشاهدات میکروسکوپی اکثر یافته‌ها در هر دو تخمدان حیوان و نیز در مقایسه با موشهای دیگر موجود در آن گروه تقریباً مشابه بودند.

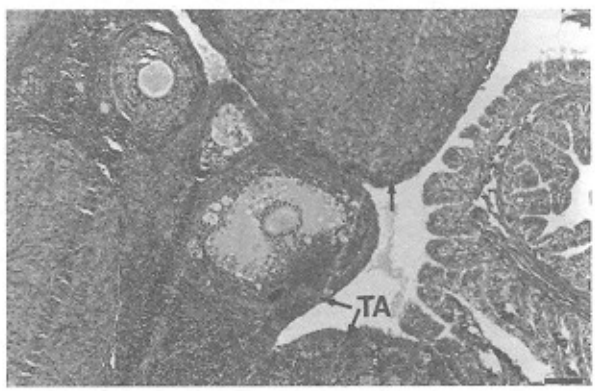
جدول ۱: تقسیم بندی رتهای باقیمانده گروههای مورد مطالعه پس از پایان دوره تزریق CSA

گروه	آمار کسر شده	تشریح شده روز بیست و دوم	تشریح شده روز پانزدهم	تعداد
آزمون A (20mg/kg)	۱	۷	۷	۱۵
آزمون B (50mg/kg)	۱	۷	۷	۱۵
شاهد C	-	۸	۷	۱۵

به طور کلی از مطالعات بافتی نتایج زیر حاصل شد:

۱) مقایسه نمونه‌های تخمدان در گروه آزمون A و شاهد C پس از پایان دوره تزریقی (روز پانزدهم) تغییرات زیر را در تخمدان موشهای گروه A نشان داد:





شکل ۱: نمای تخمدان در گروه A. در مقطع A به ضخامت عروق و الیاف کلاژن ادوانتیس و در مقطع B به ضخامت تونیکا آلبوژینه و فیبروز تخمدان توجه نمایید.

BV: Blood Vessel, TA: Tonica Albugina

Scale. Bar A=50 μm- Massons' Trichrom 25

Scale. Bar B=100 μm- Massons' Trichrom 60

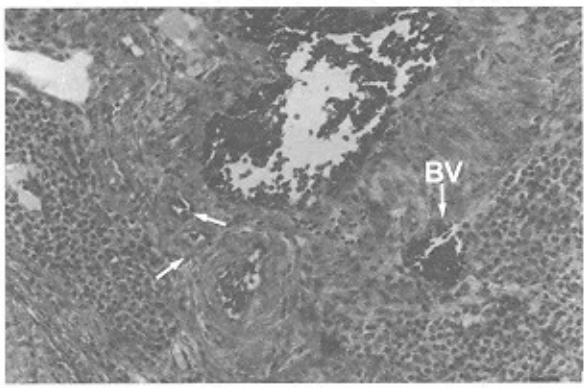
الف) افزایش ضخامت تونیکا آلبوژینه در نمای قشر تخمدان (شکل ۱).

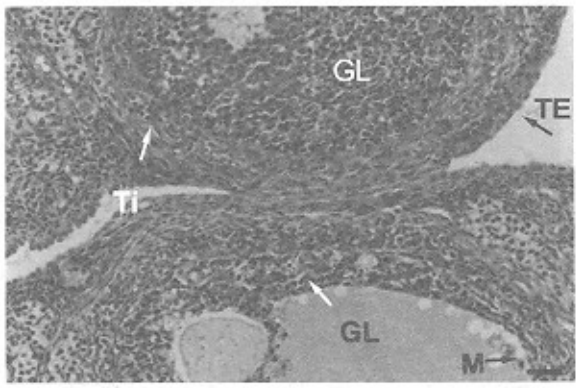
ب) آترزی فولیکولی به صورت کاهش تقسیم میتوز در سلولهای لایه گرانولوزا و تکا، تخریب سلولهای گرانولوزا به شکل کاهش حجم و چروکیدگی سلول[1]، تراکم کروماتین در هسته[2] و قطعه قطعه شدن هسته[3].

ج) جدا شدگی سلولهای گرانولوزا تخریب شده از غشای پایه و ریزش آنها به داخل حفره فولیکولی، تخریب اووسیتها و وجود ماکروفاژ در بین سلولهای لایه گرانولوزا و در داخل حفره فولیکولی تخمدان (شکلهای ۱ و ۲).

د) افزایش ضخامت تکای داخلی و خارجی و نیز افزایش ضخامت دیواره عروق (شریانها و وریدها) خصوصاً در لایه مدیا و ادوانتیس.

ه) افزایش رشته‌های کلاژن در تخمدان (فیبروز) خصوصاً در تونیکا آلبوژینه اطراف فولیکولها، در تکای خارجی، اطراف جسم زرد و لایه ادوانتیس عروق خونی (شکل ۲).





شکل ۲: نمای تخمدان در گروه A. در مقطع D و C به سلولهای گرانولوزی تخریب شده و وجود ماکروفاژ در بین سلولهای این سلولها و داخل حفره فولیکولی توجه نمایید.

TI: Techa Interna, TE: Techa Externa, GL: Geranulosa-Laset, M: Macrophage

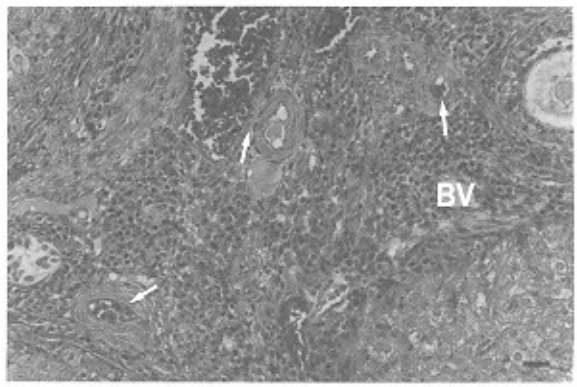
Scale Bar A 50 μm- Massons' Trichrom 40

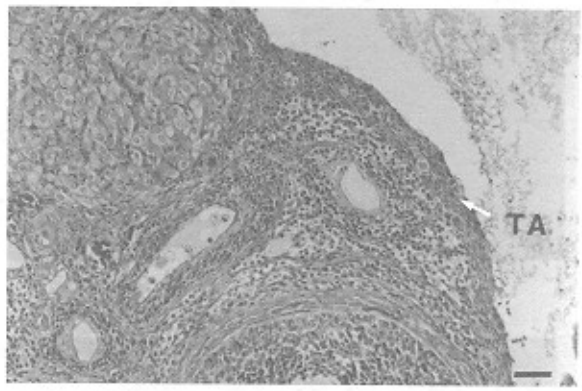
Scale Bar B 50 μm-H&E 25

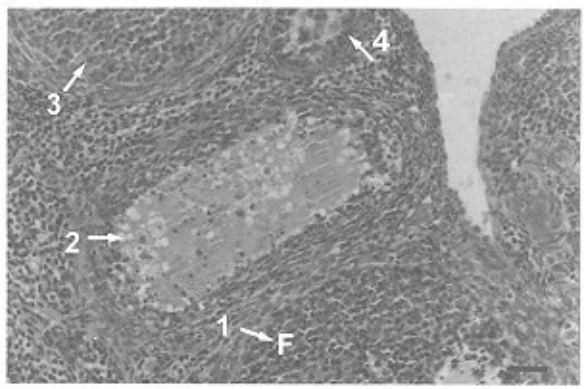
1. Shrinkage
2. Pyknosis
3. Karyorrhexis

۲) مقایسه نمونه‌های تخمدان در گروه آزمون B و شاهد C در همان زمان (روز پانزدهم) تغییراتی مشابه گروه آزمون A را در موشهای گروه آزمون B نشان می‌داد با این تفاوت که این تغییرات در مقایسه با گروه A شدیدتر و شامل موارد زیر بود:

الف) افزایش ضخامت تونیکا آلبوژیت به دنبال افزایش رشته‌های کلاژن (شکل ۳ مقطع B).







شکل ۳: نمای تخمدان در گروه B. در مقطع A بیکانها به افزایش ضخامت عروق خونی اشاره دارند. در مقطع B به افزایش ضخامت تونیکا آلبوژینه توجه نمایید. در مقطع C بیکانها به تخریب سلولهای گرانولوزا در فولیکول اشاره می‌نماید.

P: Follicle

Scale Bar A 50 µm- Massons' Trichrom 25

Scale Bar B 50 µm- Massons' Trichrom 20, Scale Bar C 50 µm-H&E 25

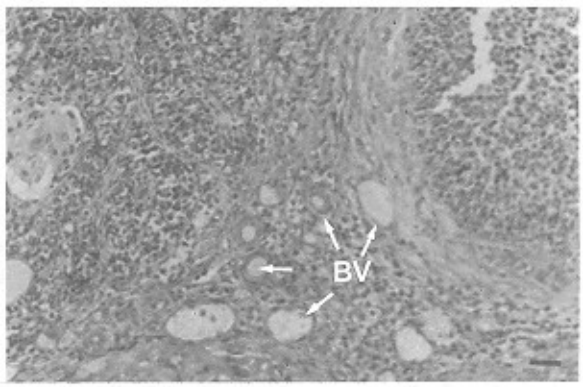
ب) تخریب، Shrinkage و Pyknosis و karyorrhexis در سلولهای گرانولوز و آترزی فولیکولی (شکل ۳ مقطع C).

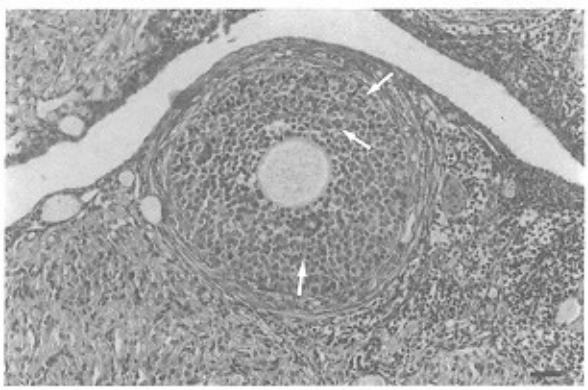
ج) افزایش ضخامت تکای خارجی و داخلی و افزایش ضخامت جدار عروق (شکل ۳ مقطع A).

د) افزایش ضخامت جداره عروق، فیبروز تخمدان و وجود مواد هیالینی درون برخی از فولیکولها در رنگ‌آمیزی اختصاصی تری‌کروماسون (شکل ۳).

۳) مقایسه نمونه‌های تخمدان موشهای گروه آزمون A، B و گروه شاهد C در روز بیست و دوم و مقایسه نمونه‌های تخمدانهای گروه B و A در روز پانزدهم با روز بیست و دوم تغییرات زیر را نشان می‌داد:

الف) در تخمدان گروه A، یک هفته پس از پایان دوره تزریق CSA (روز بیست و دوم) تغییرات بافتی مشاهده شده در این گروه مشابه روز پانزدهم بود با این تفاوت که از شدت کمتری برخوردار بود. به طوری که ضخامت تونیکا آلبوژینه و دیواره عروق هر چند نسبت به گروه شاهد بیشتر بود ولی در مقایسه با روز پانزدهم همان گروه از ضخامت کمتری برخوردار و حتی دربرخی نمونه‌ها طبیعی بود. آترزی فولیکولی کمتر از قبل و سلولها شروع به تقسیم میتوز کرده بودند که نشان دهنده قدرت تخریبی دارو بر سلولهای گرانولوز و تکا است (شکل ۴).

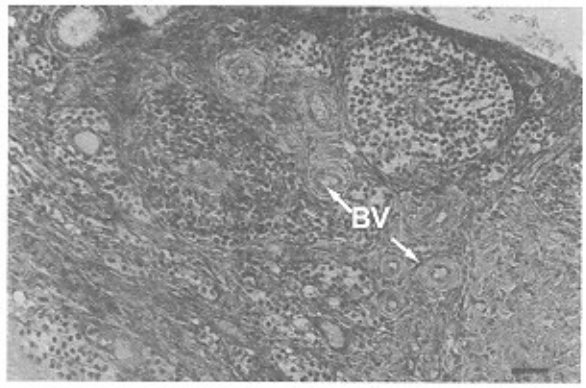


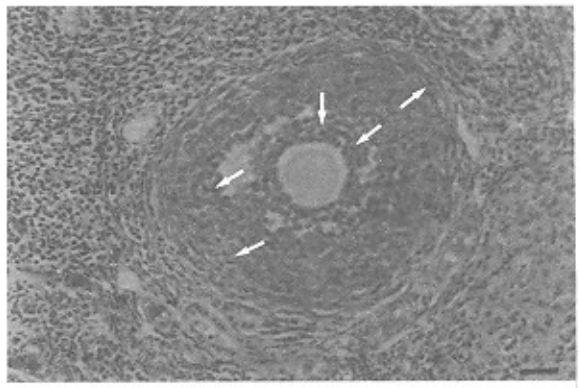


شکل ۴: نمای تخمدان در گروه A در روز بیست و دوم. در مقطع A به عروق خونی و رشته‌ای کلاژن توجه شود. در مقطع B بیکانها تقسیم میوز سلولهای گرانولوزا را نشان می‌دهد

Scale Bar A 50 µm- Massons' trichrom 25, Scale Bar B 50 µm-H&E 25

ب) تخمدان گروه B در روز بیست و دوم با افزایش ضخامت تونیکا آلبوژینه، فیبروز و افزایش ضخامت جداره عروق همراه بود ولی این تغییرات نسبت به نمونه‌های روز ۱۵ گروه B کاسته شده ولی به حد طبیعی نرسیده بود. در فولیکولها آترزی نسبت به روز پانزدهم کمتر بود و در سلولهای گرانولوزا تقسیم میتوز مشاهده شد. به نظر می‌رسد میزان تقسیم در این گروه نسبت به نمونه‌های گروه A بیشتر باشد؛ به طوری که در هر مقطع ۳ تا ۵ تقسیم میتوز در فولیکول دیده شد (شکل ۵).





شکل ۵: نمای تخمدان در گروه B در روز بیست و دوم. در مقطع A به عروق خونی و رشته‌های کلاژن توجه نمایید. در مقطع B بیکانها تقسیم میوز سلولهای گرانولوزا را نشان می‌دهند.

Scale Bar A 50 µm- Massons' Trichrom 25

Scale Bar B 50 µm-H&E 25

بحث

در این بررسی تغییرات کیفی ساختار بافتی تخمدان موش صحرایی را به دنبال تزریق CSA با دوزهای مختلف مطالعه شد.

همان گونه که مشاهده شد، نتایج این بررسی نشان می‌دهد که مصرف CSA سبب ایجاد تغییراتی در ساختار بافتی تخمدان موش صحرایی از جمله فیبروز، افزایش ضخامت دیواره عروق، تخریب سلولهای گرانولوزا و تشدید آترزی فولیکولی می‌شود. پیش از این Chalabi در سال ۱۹۸۴ اثر CSA را بر ساختار و عملکرد تخمدان خرگوش مورد بررسی قرار داده بود (۹). تزریق دوز درمانی CSA در این مورد نیز سبب هیپرپلازی سلولهای تکای خارجی فولیکولهای ثانویه، نواحی نکروز فیبروز فولیکولی (افزایش ضخامت تکا در بیشتر مقاطع و تغییرات تخریبی در اووسیت فولیکولهای اولیه و ثانویه) و افزایش ضخامت دیواره عروق شده بود و به علاوه کاهش سطح پروژسترون پلاسما نیز قابل مشاهده بود. در سال ۱۹۸۸ نیز Gore و همکارانش اثر CSA را بر عملکرد آندوکرین تخمدان موش صحرایی به صورت *in vitro* بررسی کردند و دریافتند فعالیت آنزیم آروماتاز سلولهای گرانولوزای تحریک شده توسط FSH افزایش می‌یابد و غلظتهای خونی بالاتر از سطح درمانی CSA (بیش از میکروگرم در میلی لیتر خون) سبب مهار ترشح پروژستین می‌شود (۱۱). مطالعات Ramirez و همکارانش و مطالعات Esquifi و همکارانش نیز بیانگر تغییرات الگوی ترشح پرولاکتین و LH به دنبال مصرف CSA بود که تاثیر دارو بر محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد را مطرح می‌کند (۱۲، ۱۳).

در بررسی حاضر نیز تزریق دو دوز مختلف CSA، در هر گروه آزمون تخریب سلولهای گرانولوزا و تشدید آترزی فولیکولی مشاهده شد. فرآیند آپوپتوزیس (مرگ برنامه ریزی شده سلولها) طی آترزی فولیکولی در تخمدان حیواناتی مانند موش صحرایی، خوکچه هندی، خرگوش و بابون نشان داد شده است (۸). با توجه به این مطالعه مصرف CSA سبب تحریک سلولهای گرانولوزا و تشدید آترزی فولیکولی می‌شود، بنابراین ممکن است CSA فرآیند آپوپتوزیس را در سلولهای گرانولوزا القا یا تشدید نماید. از آنجایی که عوامل متعددی چون هورمونها (FSH و LH استروژن و آندروژنها)، عوامل رشد و گیرنده‌های آنها (FGF, TGF, EGF) و سیتوکینها (TNF,IL-1) بر آپوپتوزیس سلولهای گرانولوزا موثرند (۱۵). لذا می‌توان مشاهدات بافتی مذکور را با توجه به عملکرد CSA (ایجاد تغییر در محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد و مهار سیتوکینها) توجیه کرد. همچنین باید توجه کرد که سلولهای گرانولوزا قادر به تولید و ترشح سیتوکینها و فاکتور رشد هستند که خود مانع بروز آترزی فولیکولی می‌شود و طی رشد فولیکول به رشد سلولهای گرانولوزا کمک می‌کند (۱۶) که تخریب این سلولها مانند چرخه‌ای معیوب عمل خواهد کرد.

به علاوه تأثیر CSA بر دیواره عروق در این مطالعه مشاهده شد که با گزارش Koewn و همکارانش مطابقت دارد. در این گزارش نیز افزایش ضخامت جدار عروق در بیوپسی کلیه بیماران پیوند شده‌ای که CSA دریافت می‌کردند مشاهده شد. افزایش ضخامت دیواره عروق سبب افزایش مقاومت عروق می‌شود که با میزان جریان خون بافت نسبت عکس دارد. با توجه به اینکه میزان جریان خون هر بافت براساس نیازهایش کنترل می‌شود، این تغییر می‌تواند سبب اختلال خون رسانی تخمدان شود.

فیبروز تخمدانی مشاهده شده نیز با برخی عوارض دیگر CSA نظیر افزایش رشد لثه‌ها (Gingival overgrowth) مطابقت دارد. هر چند در گذشته علت عارضه اخیر رشد را هیپرپلازی لثه می‌دانستند (۱۷). مطالعات جدیدتر افزایش رشته‌های کلاژن و پروتئینهای غیر کلاژنی را در بافت لثه نشان دادند که حاکی از تأثیر مستقیم CSA بر فیبروبلاست است (۱۸). فیبروز تخمدانی نیز ممکن است به علت

مشابهی ایجاد شود.

در مجموع با توجه به مشاهدات توصیف شده که نشان می‌دهد فرمول جدید این دارو نیز خالی از اثرهای جانبی نبوده و منجر به ایجاد تغییرات وسیعی در ساختار بافتی تخمدان می‌شود؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در خانمهایی که در سنین باروری قرار دارند حتی‌الامکان از مصرف CSA پرهیز شود یا چنانچه مجبور به استفاده از دارو هستند احتیاط لازم را به عمل آورند. علاوه بر این برای اظهار نظر قطعی‌تر، بررسی اثر رژیم درمانی CSA، پردنیزولون، آزاتیوپرین (AZT: Azathioprine) بر بافت تخمدان، تاثیر CSA بر سلولهای گرانولوزا توسط میکروسکوپ الکترونی و مطالعه تغییرات هورمونی به خصوص میزان پروژسترون، استرادیول و میزان FSH، LH توصیه می‌شود.

References

1. Hernadez-Boludea JC, Marin P, Carreras E, Aguilar JL, Granena A, Rozman C, Montserrat E: Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: the Barcelona Hospital clinic experience, Haematologica 1999; 84(1): 26-31
2. Clane RY, Thiru S, McMaster P, Craddok GN, White DJ, Evans DJ, Dunn DC, Pentlow BD, Rolles K: Cyclosporine A in patient receiving renal allografts from cadaver donor, J AM Soc Nephrol 1998; 9(9): 1751-1756
3. Rynasiewiecz JJ, Suterland DE, Ferguson RM, Squifflet JP, Marrow CE, Goetz FC, Najarian JS, Cyclosporine A for immunosuppression: observations in rat heart, and islet allograft models and in human renal and pancreas transplantation, Diabetes 1982; 4: 92-108
4. Betram G, Katzung: Basic and Clinical Pharmacology, Vol 2, immunopharmacology chapter 2 1996, Churchill Livingstone
5. Martindale: The Complete drug reference, 32 ed, Pharmace Utical Press, 1999, pp 519-523
6. Chernow B: The pharmacologic approach to the critically ill patient, Prentice Hall International Inc, 6ed, Biol Reprot 1994; 1059-1061
7. Goodman A, Gillman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 1997, pp 1267-1271
8. Nobel s, Markam A: Cyclosporine A: a review of The pharmacokinetic properties clinical and tolerability of a microemulsion based- formulation (Neoral), Drugs 1995; 50 (5) 924-941
9. Chalabi H: Effects of cyclosporine A on the morphology and function of the ovary and fertility in the rabbit. Int J Fertil 1984; 29 (4): 218-223
10. Handelsman DJ, Mcdowell I, F Caterson ID, Tiller DJ, Hall BM, Turtle JMR: Ovarian function after renal transplantation: combination of cyclosporine A with azathioprine and prednisone combination, Brit J Obstet Gynecol 1984; 91: 802-807
11. Gore langton RE: Cyclosporine diffentiely affects estrogen and progestron synthesis by rat granulosa cell in vitro. Mol Cell Endocrinol 1988; 54(3): 187-193
12. Ramirez G, Narvarte J, Bittle PA, Ayers chastain C, Dean SE: Cyclosporine-indused alteration in hypothalamic hypophyseal gonadal axis in transplant patient. Nephron 1991; 58 (1): 27-32
13. Esquitino AL, Moreno MI, Agrasal C, Villanua MA: Effects of Cyclosporine A on ovarian in sham operated and pituitary grafted young female rats, Proc Soc Exp Biol Med 1995; 208(4): 397-403
14. Nobel S, Markam A: Cyclosporine, a review of the pharmokinetic properties, clinical and tolerability of a micruemolsion - based formulation (Neoral). Drugs 1997; 50(5) 924-941
15. Goungeon A: Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis, Endocrine Rev 1996; 17: 121-155
16. Makhopadhyay AK, Brunswig spickeneier B: Follicular Maturation and atresia - possible role intraovarian regulatory factor, J Reprod Fertill 1996; 50: 105-112
17. Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H: Patogenesis of drug induced gingival overgrodental. Drug 1996; 67: 463-471
18. Garzino demo P, Carbone M, Carrozzo M, Broccoletti R, Gandolfo S: An increase in gingival volume induce by drugs phenytoin, Cyclosporine and calcium antagonists, 1998; 47 (9): 387-398