بررسی چگونگی تاثیر آگونیست هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH-a) به صورت غیرپالسی بر روی تخمدانها در موشهای نابالغ رت (Rat)

علیرضا قنادی M.Sc. ☆★$، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D.★*، زین‌الدین بهدادی‌پور Ph.D.* ★

☆ مرکز باروری و ناباروری شیراز، بخش IVF

★ دانشگاه آزاد اسلامی لارستان، گروه پزشکی

★ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

* مرکز باروری و ناباروری اصفهان

★ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

$آدرس مکاتبه: شیراز، صندوق پستی: ۹۴۵۱۴-۷۱۸۳۹، مرکز باروری و ناباروری شیراز

پست الکترونیک: Email:ghanadi_ar628@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۸/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۳/۶/۲۸

* **هدف:** بررسی چگونگی تأثیر اگونیست GnRH به صورت غیرپالسی بر روی تخمدان‌های رت (Rat) نابالغ.

* **مواد و روشها:** در این بررسی موشهای نابالغ را به گروههای ۷، ۱۷ و ۲۷ روزه تقسیم کرده و هر یک از گروهها را به چهار زیر گروه چهارتایی تقسیم و به ترتیب به هر زیر گروه میزان ۶۶۶۰ng/kg و ۶۶۶ng/kg و ۶۶/۶ng/kg و یا آب‌مقطر هر ۱۲ ساعت یک بار به مدت ۳ روز به صورت زیر جلدی (S.C) تزریق شد. از موشهای نابالغ نرمال نیز به عنوان گروه شاهد دوم استفاده شد. تخمدانها را پس از قطع نخاعی، خارج و بعد از تدارکات بافتی و رنگ‌آمیزی، مقاطع به صورت سریال ۵ میکرونی با فواصل ۱ به ۱۰ از ابتدا تا انتهای هر تخمدان مشاهده شد.

* **یافته ها:** در موشهای ۷ روزه تزریق دوز بالا باعث کاهش معنی‌داری در تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه نسبت به گروه شاهد شد ($P<0/05$) و در دوزهای دیگر در همین سن تغییرات چشم‌گیری مشاهده نشد. در گروه سنی ۲۷ روزه دوز بالا سبب تغییری در تعداد فولیکولهای اولیه و فولیکولهای وزیکولار اولیه نگردید لیکن باعث کاهش فولیکولهای وزیکولار ثانویه و گراف شد، اما تعداد جسم زرد به طور محسوسی افزایش یافته بود، در صورتی که در دوز متوسط برخلاف دوز بالا باعث افزایش تعداد فولیکولهای وزیکولار ثانویه و گراف گشته ولی تعداد جسم زرد مانند گروه فوق تا حدی افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). در مقایسه بین موشهای نابالغ ۲۷ روزه و بالغ ۶۰ روزه نشان می‌دهد که در بالغین تعداد فولیکولهای اولیه و وزیکولار اولیه نسبت به نابالغین کاهش محسوسی پیدا کرده ولی تعداد فولیکولهای وزیکولهای ثانویه و گراف و جسم زرد نسبت به نابالغین افزایش داشته است ($P< 0/05$)، در صورتی که در مقایسه دوز متوسط در همین سن تقریباً با گروه بالغین همگون بود.

* **نتیجه گیری:** در پایان می‌توان اظهار داشت که دوزهایی از اگونیست GnRH به صورت غیرپالسی در نابالغین، احتمالاً می‌تواند سبب رشد فولیکولها و همگون شدن آنها نسبت به بالغین شود. دوزهای بالا رشد اولیه فولیکولها را تحریک می‌کند ولی تکامل و رشد فولیکولهای رسیده را سرکوب می‌نماید و دوزهای پایین تأثیر چندانی در روند رشد فولیکولها نخواهد داشت.

کل واژگان: تخمدان، القاء تخمک‌گذاری، رت، GnRH

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۳۱-۱۲۴

مقدمه

ترشح گنادوتروپینهای هیپوفیز با ترشح پالسی هورمون آزادکننده گنادوتروپین GnRH[1] از هیپوتالاموس، با باز شدن کانالهای کلسیمی آغاز و باعث به وجود آمدن سیکلهای طبیعی جنسی در زنان می‌شود (۱). ترشح پالسی GnRH در کل سیکل یکسان نیست به طوری که در اوایل سیکل تخمدانی ترشح پالسی GnRH باعث رهایی بیشتر FSH[2] و میزان کمتری LH[3] از هیپوفیزی می‌شود که این امر تحریک رشد فولیکولها را به دنبال خواهد داشت. در اواسط سیکل با افزایش فرکانس پالسهای GnRH ترشح LH نسبت به FSH بیشتر شده و به صورت‌موجی ظاهر می‌گردد که مقدمه‌ای برای تخمک‌گذاری است (۲). اما بعد از تخمک‌گذاری و در طی فازلوتئال پالس‌های GnRH به تدریج کاهش یافته و منجر به کاهش آزادسازی LH و FSH در اواخر سیکل می‌گردد. بنابراین این روند به هماهنگی هورمونهای هیپوتالاموس - هیپوفیز - گنادی وابسته است (۳) و در صورت ایجاد اختلال در هر یک از قسمتهای فوق‌الذکر می‌تواند به عنوان یکی از علتهای ناباروری مطرح گردد. در این راستا و برای رفع مشکل ناباروری روشهای متفاوتی در دنیا رایج شده است. به طوری که تحقیقاتی در

1. Gonadotropin Releasing Hormone
2. Follicle Stimulating Hormone
3. Loteinzing Hormone

زمینهٔ استفاده از گنادوتروپینهای هیپوفیزی انجام گرفته که منجر به درمان موفقیت‌آمیز ناباروری گردیده است. بدین صورت که به کمک گنادوتروپینها می‌توان رشد چند فولیکول را برای باروری در خارج رحم تحریک کرده (IVF)[1] و سپس جنینها را به داخل رحم انتقال داد (ET)[2]. اما در کاربرد این روشهای جهت القاء تخمک‌گذاری متخصصین با مشکلاتی چون تحریک بیش از حد و یا افزایش (Surge) نابجای LH و در نتیجه توسعه فولیکولهای آترتیک مواجه بودند، و اما بعدها به این نتیجه رسیدند که اگر در معالجه ناباروری علاوه برگنادوتروپینها از آگونیست GnRH جهت کنترل عمل هیپوفیز استفاده شود درمان مؤثرتر خواهد بود. لذا از آگونیست GnRH برای کاهش تنظیم هیپوفیزی (down-Regulation) در جلوگیری از منحل‌شدن برنامه درمانی در IVF استفاده شد (۴). در این روش مکانیسم عمل GnRH-a بدین صورت است که با تجویز دوز بالای آگونیست GnRH به صورت غیرپالسی ترشح گنادوتروپینها را مهار می‌کند که این اثر مهاری به دنبال تنظیم منفی رسپتورهای GnRH گنادوتروپهای هیپوفیزی است که به ترشح GnRH اصلی مقاوم می‌شوند (۵). یعنی دوز بالای GnRH باعث می‌شود سلولهای گنادوتروپ هیپوفیزی حساسیت خود را به GnRH از دست داده و متعاقب آن ترشح GnRH کم شده و حالت هیپوگنادوتروپینی ایجاد می‌گردد. البته قبل از مهار ترشح گنادوتروپینها یک اثر تحریکی روی هیپوفیز داشته و باعث افزایش در سطح LH و FSH اندروژن می‌شود، اما چند روز بعد از شروع تزریق GnRH-a سطح LH و FSH کاهش یافته به طوری که این کاهش نیز در سطح LH به مراتب نمایان‌تر است (۶). بدین ترتیب با این روش سیکل طبیعی تخمدان از کنترل هیپوتالاموس هیپوفیز خارج و تحت کنترل دارو در می‌آید و به دنبال این کار پزشک با دادن مقدار کافی گنادوتروپین HMG[4] HCG[3] تخمدانها را تحریک و باعث تخمک‌گذاری می‌شوند.

در مقایسه‌ای که بین HMG و HMG به همراه استفاده از آگونیست GnRH که از روز ۲۱ سیکل داده شده، مشاهده گردید که در بیمارانی که HMG/GnRH a- را دریافت داشتند میزان منحل‌شدن دوره درمانی‌شان از ۳۵/۵ به ۱۳/۲درصد کاهش یافته بود (۷). در کلینیک همچنین، از اثر کاهش تنظیم هیپوفیزی (down Regulation) توسط آگونیست GnRH در درمان بیماران مبتلا به پلی کلیستیک تخمدانی (PCO)[5] که توأم با عدم تخمک‌گذاری هستند به همراه HMG استفاده می‌شود به طوری که BUCKLER و همکاران نشان دادند که افزایش تیپیک و نامناسب LH سرم در بیماران مبتلا به PCO منجر به عدم تخمک‌گذاری در این افراد می‌شود. از طرفی سندرم تحریک بیش از حد OHSS[6] در اکثر بیمارانی که تحت درمان با گنادوتروپینهای اگزوژن قرار می‌گیرند دیده می‌شود اما در بیماران PCO بیشتر است. لذا پیشنهاد شده است که از GnRH-a جهت مهار سریع LH زودرس و جلوگیری از تحریک بیش از حد تخمدان در این گونه افراد می‌توان استفاده کرد و سپس با دادن HMG رشد فولیکولها را تحریک نمود (۸). به تازگی مصرف دوزهای اندک آگونیست GnRH، را به همراه دوز بالای گنادوتروپینها بدون کاربرد هورمون رشد (GH) سبب بالا رفتن میزان جایگزینی و حاملگی در بیماران شده است به خصوص در زنانی که سن بالا داشته و نیاز به مصرف بالای گنادوتروپینها دارند (۹). از طرفی در مقایسه‌ای که بین آنالوگهای GnRH با آنتاگونیستهای GnRH، جهت Down Regulation انجام گرفت، نشان داد که میزان جایگزینی درگروهی که آنتاگونیستهای GnRH را دریافت داشته‌اند کمتر بوده که این امر می‌تواند احتمالاً مربوط به کاهش بیوستنز فاکتورهای رشد باشد که توسط آنتاگونیستهای GnRH ایجاد شده است (۱۰). همچنین استفاده از GnRH-a در درمان بلوغ زودرس مرکزی پیشنهاداتی شده است(۱۱). بنابراین اثر سودمندی مهار گنادوتروپینها در طی برنامه‌های ART جلوگیری از اثرات مضر گنادوتروپین‌های اندروژن در دستیابی به فولیکول بیشتر و کیفیت بهتر اووسیت و در نتیجه افزایش شانس حاملگی است (۱۲).

البته از کاربرد GnRH-a به جای HCG در یک سری از گزارشات آمده است به طوری که در یک بررسی مقایسه‌ای که بین GnRH-a و HCG در دستیابی به اووسیت در بیماران PCO انجام گرفت دریافتند که چون این بیماران بیشتر در معرض تحریک بیش از حد تخمدان هستند تزریق GnRH در جلوگیری از این سندرم مؤثرتر خواهد بود (۱۳) چرا که کاربرد GnRH به جای HCG ابتدا سبب موج LH-FSH اندروژن می‌گردد که این امر در بلوغ نهایی اووسیت لازم و ضروری است (۱۴). این مطالعات توسط Imoedemhe و همکاران در کاربرد GnRH-a به جای HCG تأیید کرده‌اند (۱۵) در تحقیق دیگر نیز آمده است که استفاده از altra low dose آگونیست GnRH به جای HCG جهت بلوغ فولیکولی در بیمارانی که دچار سندرم تحریک بیش از حد OHSS هستند، مؤثر بوده و حاملگی و جایگزینی را افزایش داده و حتی سبب surge کمی FSH که یک عامل فیزیولوژیک در روند بلوغ فولیکولی است خواهد شد (۱۶). از طرفی القاء بلوغ فولیکولهایی Pre ovulatory توسط GnRH-a در محیط *in vitro*، نشان داده است که سلولهای گرانولوزا فرآیند استروئیدوژنز بهتری داشته و سبب surge هورمونهای FSH و LH جهت بلوغ فولیکولی نسبت به کاربرد HCG داشته است (۱۷). همچنین از تأثیرات مستقیم آگونیست GnRH جهت القاء تخمک‌گذاری بر روی موش نیز تحقیقاتی انجام داده‌اند و دریافتند که تزریق ۱μg از آگونیست GnRH به صورت زیر جلدی بر روی موشهای نابالغ ۲۳ روزه که هیپوفیزاکتومی شده بودند سبب القاء تخمک‌گذاری می‌شود که این اثر از طریق اثر مستقیم بر روی تخمدان با افزایش TPA یا فعال کننده پلاسمینوژن بافت تخمدان است (۱۸). در تحقیق دیگر از تأثیرات آگونیست GnRH بر روی تخمدانهای موش بالغ در محیط *In vitro* گزارش دادند و دریافتند که تجویز ۰/۱ μg از آگونیست GnRH

1. In Vitro Fertilization
2. Embryo Transfer
3. Human Chorionic Gonadotrophin
4. Human Menoposal Gonadotrophin
5. Polycstric Ovarian Syndrome
6. Ovarian Hyper Stimulation Syndrom

سبب تخمک‌گذاری می‌شود و پیشنهاد کردند که GnRH به طور مستقیم روی تخمدانها اثر کرده و سنتز پروستاگلاندینها را در تخمدانها تحریک و باعث تخمک‌گذاری می‌شود (۱۹). از کاربردهای دیگر آگونیستهای GnRH تحریک تخمک‌گذاری در زنان نازا است. به طوری که کاربرد آنها تعداد و کیفیت فولیکولها را افزایش داده و میزان لوتئینزاسیون زودرس را کاهش و از منحل شدن سیکل درمانی جلوگیری می‌کند و در افزایش حاملگی مؤثر بوده است.

Navot و همکاران نشان دادند که تزریق دوز پایین آگونیست GnRH-a (تقریباً ۱ به ۱۵ دوز نرمال) در اوایل فاز فولیکولار به جای HMG و مترودین قادر است به طور معنی‌داری رهایی گنادوتروپینهای اندوروژن را القاء نماید و سبب آزادسازی مناسب گنادوتروپینهای اندروژن در ابتدای فاز فولیکولارگردد (۲۰) و در تحقیق دیگر آمده است که تزریق یک درصد دوز نرمال GnRH به صورت زیر جلدی از روز دوم سیکل بدون کاربرد گنادوتروپینهای دیگر باعث تحریک تخمدان و افزایش معنی‌دار استروژن می‌گردد (۲۱). همچنین از اثر آگونیست GnRH به صورت پالسی در القاء تخمک‌گذاری استفاده می‌گردد. به طوری که مقادیری از این هورمون را از طریق یک پمپ قابل تنظیم پورتابل (زیگوت) به طور ثابت و به صورت پالسی وارد بدن می‌کنند در این روش احتمال تحریک بیش از حد تخمدان و حاملگی چند قلویی بسیار اندک گزارش شده است و در بیماران مبتلا به آمنورهٔ هیپوتالامیکی بیشترین تأثیر را دارد (۲۲، ۲۳). البته از این متد درمانی در القاء بلوغ و اسپرماتوژنز در مردانی که دچار هیپوگنادوتروپیک و هیپوگنادیسم می‌باشند نیز استفاده می‌گردد (۴).

بنابراین با نگاهی بر سیر مطالعات انجام گرفته در کاربرد آگونیستهای GnRH نشان می‌دهد که از اگونیستهای GnRH در ۱۵ سال اخیر بیشتر در مهار محور هیپوتالاموسی ـ هیپوفیزی و ایجاد down–regulation استفاده شده و یا در جهت القاء تخمک‌گذاری از GnRH به صورت پالسی با استفاده از پمپهای قابل تنظیم به کار رفته است. البته تحقیقاتی نیز در زمینه کاربرد دوزهای پایین اگونیست GnRH به صورت غیر پالسی جهت القاء تخمک‌گذاری با بررسی تغییرات سطح FSH و LH و استروژن سرم در یک سری از افراد نابارور انجام شده اما تحقیقاتی جامع در زمینه بررسی تغییرات بافت شناسی تخمدان به دنبال تزریق غیر پالسی آگونیست GnRH انجام نگرفته است. لذا ما بر آن شدیم که چگونگی تأثیر یک نوع آگونیست GnRH که بازرلین استات (Superfact, Hoechst, Germany) نام دارد را به صورت غیر پالسی بر روی تخمدانها در موشهای نابالغ Rat مورد بررسی قرار دهیم.

البته علت انتخاب موش نابالغ به دلیل ترشح بسیار کم هورمون GnRH در اثر حساسیت بالای هیپوتالاموس به هورمونهای جنسی است (۲۴) که در نتیجه با تزریق آگونیست GnRH در نابالغین هر گونه اتفاقی که درتخمدان رخ دهد را می‌توان ناشی از این تجویز دانست.

مواد و روشها

تعدادی موش Rat حامله و چهار موش بالغ از نژاد Albinon –Mari از لانه حیوانات دانشکده علوم پزشکی اصفهان تهیه نموده و سپس آنها را در قفسهای پلاستیکی مجزا تحت شرایط استاندارد (از نظر نور و دما) یکسان نگهداری نمودیم از تعداد کل نوزادان متولد شده جمعاً ۴۸ موش ماده نابالغ را جدا نموده و آنها را به سه گروه ۷ و ۱۷ و ۲۷ روزه از زمان تولد دسته‌بندی کردیم به طوری که هر گروه شامل ۱۶ موش باشد سپس هر یک از گروه نابالغین را به یک گروه آزمونی ۱۲تایی و یک گروه شاهد ۴ تایی تقسیم و ۴ موش بالغ نرمال را به عنوان گروه شاهد دیگری برگزیدیم. بدین صورت جمعاً ۵۲ موش ماده را مورد بررسی قرار دادیم گروه آزمون را به ۳ دسته ۴ تایی تقسیم کرده و به دسته اول دوزبالا و دسته دوم دوز متوسط و دسته سوم دوز پایین آگونیست GnRH و به دسته چهارم آب مقطر تزریق نمودیم، با توجه به این که مقدار دوز تزریقی برای یک فرد بالغ ۷۵ کیلوگرمی روزانه یک میلی‌گرمی (۱۰۰۰ میکروگرم) استفاده می شود (۲۵). لذا ما این دوز را بر اساس وزن موشها به عنوان دوز بالا برگزیدیم و دوزهای متوسط و پایین هر کدام ده و صد برابر رقیق کردیم (وزن متوسط موشهای ۷، ۱۷ و ۲۷ روزه به ترتیب ۱۵gr، ۲۵gr و ۷۵gr بود). بنابراین مقدار دوزهای تزریقی در هر بار تزریق ۶۶۶۰ng/kg به عنوان دوز بالا و ۶۶۶ ng/kg به عنوان دوز متوسط ۶۶/۶ ng/kg به عنوان دوز پایین تعیین گردید. تزریقات به صورت زیر جلدی با فواصل ۱۲ ساعته برای گروههای آزمون و شاهد انجام شد. از آنجایی که نابالغین سیکل جنسی ندارند؛ لذا طول درمان را به طور انتخابی سه روز برگزیدیم سپس ۱۲ساعت بعد از آخرین تزریق، موشها را قطع نخاعی کرده تخمدانهای راست آنها را خارج نمودیم پس از تدارک بافتی مقاطع را با ضخامتهای ۵ میکرونی از ابتدا تا انتهای تخمدان تهیه نموده و بعد از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین ـ آئوزین (H&E) برشها را با فواصل یک به ده روی لام گذاشته و با میکروسکوپ نوری (Zeiss) مشاهده کردیم در این بررسی ملاک ما شمارش و به دست‌آوردن میانگین تعداد فولیکولهای اولیه و وزیکولار اولیه و ثانویه وگراف و همچنین جسم زرد بود. همچنین در این بررسی فراوانی فولیکولها (نسبت میانگین هر یک از فولیکولها در یک تخمدان به کل میانگین فولیکولهای همان تخمدان بر حسب درصد) مقایسه گردید. نحوهٔ شمارش فولیکولها بدین صورت بود که ما فقط فولیکولهایی را مورد شمارش قرار دادیم که در هر مقطع اووسیت آنها کاملاً نمایان بود و از شمارش فولیکولهایی که اووسیت آنها مشخص نبود خودداری کردیم سپس نتایج حاصل را با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری T. Test مورد تجزیه تحلیل قرار داده و P< ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار تلقی شد. در این پژوهش به دلیل ضرورت انجام کار عملی که مربوط به شمارش فولیکولهای تخمدان است تقسیم‌بندی به شرح ذیل صورت گرفت:

۱ـ فولیکول اولیه: به فولیکولی اطلاق می‌شود که چند لایه سلول گرانولوزا (بیش از دو لایه) در اطراف تخمک قرار گرفته و هیچ گونه فضایی در بین سلولها وجود نداشته باشد.

۲ـ فولیکول وزیکولار اولیه: به فولیکولی اطلاق می‌شود که یک سری فضاهای پر از مایع بین سلولهای گرانولوزا پدیدار گشته ولی این فضاها از یکدیگر مجزا بوده و حجم کمی را اشغال کرده‌اند.

۳ـ فولیکول وزیکولار ثانویه: به فولیکولی اطلاق می‌شود که دارای یک فضای واحد بین سلولهای گرانولوزا است و اندازه فولیکول در مقایسه با فولیکول وزیکولار اولیه کمی بزرگتر است.

* هر سه فولیکول فوق با بزرگنمایی ۴۰ عدسی شیئی میکروسکوپ نوری قابل دید و شمارش هستند.

۴ـ فولیکول گراف (رسیده) به فولیکولی اطلاق می گردد که علاوه بر بزرگی فضای آنتروم آن با بزرگنمایی ۴۰ عدسی شیئی میکروسکوپ نوری به طور کامل قابل رؤیت نبوده و جهت شمارش چنین فولیکولهایی از بزرگنمایی ۱۰ عدسی شیئی میکروسکوپ نوری استفاده گردیده است.

یافته‌ها

نتایج حاصل از مقایسه میانگین تعداد فولیکولها و جسم زرد بین دو گروه آزمون و شاهد در دوزهای مختلف درهر یک از گروههای سنی ۷-۱۷-۲۷ روزه بعد از سه روز تزریق به طور جداگانه عبارتند از:

۱- در گروه موشهای ۱۰ روزه تزریق بالای آگونیست GnRH تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای اولیه نسبت به گروه شاهد نداشت اما باعث کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه نسبت به گروه شاهد شده بود درتزریق دوز متوسط و پایین تغییر چشمگیری بین دو گروه آزمون و شاهد مشاهده نگردید (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین تعداد فولیکولهای اولیه و وزیکولار اولیه در موشهای ۱۰ روزه

دوز دارو	دوز پایین	دوز متوسط	دوز بالا	گروه شاهد
فولیکولهای اولیه	۱۱/۵۷۵±۰/۶۵	۱۲/۰۷۵±۱/۵۴۶	۱۳/۳۵±۲/۰۵۵	۱۲/۳۲۵±۱/۲۰۹
فولیکولهای وزیکولار اولیه	۱/۲±۰/۲۱۶	۱/۷۲۵±۰/۲۲۲	*۰/۶۷۵±۰/۱۲۶	۱/۳۷۵±۰/۲۷۷

* اختلاف معنی‌دار این گروه با گروه شاهد می‌باشد P<۰/۰۵
میانگین±انحراف معیار

۲- در گروه موشهای ۲۰ روزه تزریق دوز بالا سبب افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای اولیه نسبت به گروه شاهد گردید. ولی سبب کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه نسبت به گروه شاهد شد، تزریق دوز متوسط دراین رده سنی تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای اولیه نسبت به گروه شاهد نشان نداد اما در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه و وزیکولار ثانویه افزایش معنی‌داری مشاهده شد و تزریق دوز پایین دراین سن هیچ تفاوتی با گروه شاهد نداشت (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین تعداد فولیکولهای اولیه و فولیکولهای وزیکولار ثانویه در موشهای ۲۰ روزه

دوز دارو	دوز پایین	دوز متوسط	دوز بالا	گروه شاهد
فولیکولهای اولیه	۵۲±۱/۶۷۷	۱۶/۷۲۵±۲/۱۷۸	*۲۱/۶۷۵±۲/۵۲۲	۱۶/۰۷۵±۲/۸۹۸
فولیکولهای وزیکولار اولیه	۴/۰۷۵±۰/۷۱۸	*۵/۴۵±۰/۹۴۷	*۱/۶۴۵±۰/۶۷۵	۳/۷±۱/۱۵۸
فولیکولهای وزیکولار ثانویه	۰/۵۲۵±۰/۰۹۶	*۰/۸±۰/۲۱۶	*.	۰/۳۹۵±۰/۱۸۶

* اختلاف معنی‌دار این گروه با گروه شاهد می‌باشد P<۰/۰۵
میانگین±انحراف معیار

۳- در گروه موشهای ۳۰ روزه تزریق دوز بالا سبب کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار ثانویه و گراف و افزایش معنی‌داری در میانگین جسم زرد نسبت به گروه شاهد نشان داد. اما تزریق دوز متوسط سبب افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار ثانویه و گراف گردید همچنین در همین دوز میانگین تعداد جسم زرد افزایش معنی‌داری داشته اما درمقایسه با تزریق دوز بالای آگونیست GnRH کمتر بوده است تزریق دوز پائین در همین رده سنی افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای گراف نشان داد اما در مقایسه با دوز متوسط چندان محسوس نبود (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین تعداد فولیکولهای اولیه و فولیکولهای وزیکولار ثانویه فولیکولهای گراف و جسم زرد در موشهای ۳۰ روزه

دوز دارو	دوز پایین	دوز متوسط	دوز بالا	گروه شاهد
فولیکولهای اولیه	۱۳/۹۵±۳/۶۹۲	۱۲/۱±۲/۵۳۷	۱۵/۶۷۵±۳/۲۴۹	۱۶/۵±۴/۲۲۲
فولیکولهای وزیکولار اولیه	۵/۱۵±۱/۹۳۶	۴/۶±۲/۵۵۷	۳/۵۷۵±۱/۵۸۲	۴/۳۲۵±۰/۷۴۱
فولیکولهای وزیکولار ثانویه	۰/۸۲۵±۰/۳۳	*۱/۸±۰/۶۴۸	*۰/۲۷۵±۰/۱۷۱	۰/۵۷۵±۰/۱۲۶
فولیکولهای گراف	*۰/۲۳۷±۰/۰۷۵	*۰/۸۵±۰/۲۶۵	*.	۰/۱۴۷۵±۰/۰۳۶
جسم زرد	۰	*۰/۱۷۲۵±۰/۰۴۶	*۰/۳۵±۰/۱۲۹	۰

* اختلاف معنی‌دار این گروه با گروه شاهد می‌باشد P<۰/۰۵
میانگین±انحراف معیار

۴- درمقایسه‌ای که بین موشهای نابالغ نرمال ۳۰ روزه و بالغ نرمال ۶۰ روزه انجام گرفت، نشان داد که در بالغین تعداد فولیکولهای اولیه و وزیکولار اولیه نسبت به گروه نابالغین

کاهش محسوسی پیدا کرد، ولی تعداد فولیکولهای وزیکولار ثانویه و گراف و جسم زرد نسبت به نابالغین افزایش معنی‌داری داشته است (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه میانگین تعداد فولیکولهای اولیه، وزیکولار اولیه و ثانویه، گراف و جسم زرد در موشهای نابالغ نرمال ۳۰ روزه با موشهای بالغ نرمال ۶۰ روزه

فولیکولها	موشهای نابالغ ۳۰ روزه	موشهای نابالغ نرمال ۶۰ روزه
فولیکولهای اولیه	*۱۶/۵±۴/۲۲	۵/۲۵±۰/۸۶۶
فولیکولهای وزیکولار اولیه	*۳/۲۲۵±۰/۷۴۱	۳/۰۵±۰/۶۷۶
فولیکولهای وزیکولار ثانویه	*۰/۵۷۵±۰/۱۲۶	۱/۴۷۵±۰/۵۷۴
فولیکولهای گراف	*۰/۱۴۷۵±۰/۰۴۶	۴/۱۲۵±۱/۴۲۵
جسم زرد	*۰	۰/۹۲۵±۰/۱۲۶

* اختلاف معنی‌دار این گروه با گروه بالغ می‌باشد P<۰/۰۵
میانگین±انحراف معیار

۵- در مقایسه‌ای که بین موشهای بالغ و موشهای ۳۰ روزه که دوز متوسط دارو را دریافت داشته‌اند، نشان داد که میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار ثانویه دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشته است (جدول ۵).

همچنین در این تحقیق، فراوانی (Index) فولیکولها نیز محاسبه گردید و روند آنها را با افزایش سن بین گروههای آزمون و شاهد مقایسه شد که این نتایج بدست آمد:

۱- میانگین تعداد فولیکولهای اولیه با افزایش سن کاهش نشان می‌دهد که در گروه نرمال از ۸۹/۴۲ درصد در موشهای ۱۰ روزه به ۳۵/۴۴ درصد در موشهای ۶۰ روزه سیر نزولی داشته است. این روند نیز در مورد کلیه موشهایی که دوز دارو را دریافت داشته اند دیده می‌شود که تقریباً همگون با گروه نرمال است اما در موشهایی که دوز بالای اگونیست GnRH را دریافت کرده‌اند این سیر را کندتر نشان می‌دهد.

۲- میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه در تمام گروهها سیر صعودی داشته که این سیر بین روزهای ۱۰ تا ۲۰ روزه در موشهایی که دوز متوسط و پایین دارو را دریافت داشتند تقریباً همسان با گروه نرمال افزایش داشته و آنهایی که دوز بالای‌آگونیست‌را دریافت داشته‌اند روند افزایش در همین زمان چندان چشمگیر نبوده است ولی بین روزهای ۲۰ تا ۳۰ کمی افزایش نشان داده است.

۳- میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار ثانویه در گروه نرمال و موشهایی که دوز پایین را دریافت داشته اند تقریباً همسان افزایش داشته، اما درگروه موشهایی که دوز متوسط دارو را دریافت داشته‌اند این افزایش بیشتر نشان می‌دهد ولی در گروه موشهایی که دوز بالای دارو را دریافت کرده‌اند، فقط بین روزهای ۲۰ تا ۳۰ کمی افزایش داشته که کمتر از حد نرمال بوده است.

۴- میانگین تعداد فولیکولهای گراف بین روزهای ۲۰ تا ۳۰ در گروه موشهایی که دوز متوسط دارو را دریافت داشته‌اند نسبت به گروه نرمال افزایش نشان می‌دهد (۴/۳۵ درصد نسبت به ۰/۷ درصد در گروه نرمال) اما در گروه موشهایی که دوز پایین را دریافت داشته‌اند کمتر افزایش داشت (۱/۱ درصدنسبت به ۰/۷ درصد در گروه کنترل) در گروه موشهایی که دوز بالای اگونیست را دریافت داشته‌اند هیچ فولیکول گراف قابل گزارش نبود.

۵- کورپوس لوتئوم یاجسم زرد در دو گروه نابالغ نرمال و موشهایی که دوز پایین را دریافت داشتند، مشاهده نشد ولی در مورد موشهایی که دوز متوسط دارو رادریافت داشتند بین روزهای ۲۰ تا ۳۰ زندگی ۰/۸۷ درصد قابل گزارش است که این مقدار در مورد موشهایی که دوز بالای آگونیست GnRH را دریافت کرده‌اند بیشتر و درصدی برابر ۱/۷۶ درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۵: مقایسه میانگین تعداد فولیکولهای اولیه، وزیکولار اولیه، فولیکولهای وزیکولار ثانویه، گراف و جسم زرد در موشهای نابالغ نرمال ۳۰ روزه که دوز متوسط دارو را دریافت کرده‌اند با موشهای بالغ نرمال ۶۰ روزه

فولیکولها	موشهای نابالغ ۳۰ روزه که دوز متوسط دارو را دریافت کرده‌اند	موشهای بالغ نرمال ۶۰ روزه
فولیکولهای اولیه	*۱۲/۱±۲/۵۴۷	۵/۲۵±۰/۸۶۶
فولیکولهای وزیکولار اولیه	*۶/۶±۲/۵۵۷	۳/۰۵۰±۰/۶۷۶
فولیکولهای وزیکولار ثانویه	۱/۸±۰/۶۴۸	۱/۴۷۵±۰/۵۷۴
فولیکولهای گراف	*۰/۸۵±۰/۲۶۵	۴/۱۲۵±۱/۴۲۵
جسم زرد	*۰/۱۷۲۵±۰/۰۴۶	۰/۹۲۵±۰/۱۲۶

* اختلاف معنی‌دار این گروه با گروه بالغ می‌باشد P<۰/۰۵
میانگین±انحراف معیار

بحث

با بررسی نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان اظهار داشت که دوزهای بالای‌آگونیست GnRH رشد اولیه فولیکولها را تحریک و رشد فولیکولهای رسیده را مهار می‌کند. این مسئله می‌تواند مربوط به اثر تحریکی این دوز روی هیپوفیز درآزاد سازی تمامی ذخایر FSH و LH در ابتدای تزریق و نیز مهار ترشح گنادوتروپینها با تنظیم منفی رسپتورهای گنادوتروپ با ادامه تزریق باشد. به طوری که در گروه موشهای ۱۰ روزه تزریق این دوز سبب کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه شده است. این مسئله نشان می‌دهد که در این زمان فولیکولها در حال رشد بوده و تزریق دوز بالای‌آگونیست GnRH سبب مهار این رشد شده است. همین حالت نیز در مورد موشهای ۲۰ روزه اتفاق افتاده است. یعنی با تزریق دوز بالای آگونیست GnRH ابتدا رشد فولیکولهای اولیه را تحریک می‌کند ولی از ادامه رشد آنها و تبدیل به فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه جلوگیری می‌کند در نتیجه باعث افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای اولیه و کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه شده است.

درگروه موشهای ۳۰ روزه تزریق دوز بالای اگونیست GnRH سبب مهار رشد فولیکولهای اولیه و وزیکولار به سمت فولیکولهای

وزیکولار ثانویه و گراف شده است. به طوری که نتایج کاهش معنی‌داری را در میانگین تعداد فولیکولهای وزیکولار ثانویه و گراف نشان می دهد. در توجیه این امر می‌توان به این مسئله اشاره کرد که با افزایش سن ترشح پالسی GnRH نیز افزایش می‌یابد لذا تزریق دوز بالای آگونیست GnRH می‌تواند اثرات مهاری بیشتری را نسبت به سنهای قبل در مهار رشد فولیکولها داشته باشد، احتمالاً اگر این دوز را به موشهای بالغ دهیم به علت وجود ترشح پالسی GnRH در زمان بلوغ ترشح گنادوتروپینها کاملاً مهار می‌شود.

تزریق دوز متوسط و پایین دارو در گروه موشهای ۱۰ روزه تأثیر چندانی در تحریک رشد فولیکولها نسبت به گروه شاهد نداشته که این امر می‌تواند مربوط به محدودیت سنتز کافی استروژن توسط سلولهای گرانولوزا علی‌رغم افزایش گنادوتروپینها باشد (۱۴، ۲۶).

تزریق دوز متوسط آگونیست GnRH در گروه موشهای ۲۰ و ۳۰ روزه سبب افزایش ترشح گنادوتروپینها بدون اثرات مهاری از هیپوفیز شده که متعاقب آن تولید استروژن افزایش یافته و رشد فولیکولها تحریک می‌گردد. به طوری که در گروه موشهای ۲۰ روزه باعث افزایش معنی داری در فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه و در گروه موشهای ۳۰ روزه سبب افزایش معنی‌داری در فولیکولهای وزیکولار ثانویه و گراف نسبت به گروه شاهد شده است. این افزایش در فولیکولهای گراف حدود ۶ برابر نسبت به موشهای هم سن خود در گروه شاهد بوده لیکن هنوز این تعداد به اندازه فولیکولهای گراف در موشهای بالغ نرسیده است که این دو مسئله را بیان می‌کند:

۱- GnRH باعث تحریک و افزایش رشد فولیکولها گشته ولی هنوز این افزایش به علت محدودیتهایی که در عدم بلوغ وجود دارد به حد تعداد گراف نرمال نرسیده است.

۲- احتمالاً این مسئله می‌تواند مربوط به محدودیت در سنتز FSH و LH در سلولهای گنادوتروپ هیپوفیزی باشد.

تزریق دوز پایین آگونیست GnRH تأثیر چندانی در تحریک رشد فولیکولها در گروه موشهای ۲۰ روزه نداشته است که شاید مربوط به عدم تحریک کافی رسپتورهای گنادوتروپ هیپوفیزی در ترشح LH و FSH باشد اما در گروه موشهای ۳۰ روزه تزریق این دوز سبب افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد فولیکولهای گراف شده است که در توجیه آن می‌توان به افزایش تعداد رسپتورهای GnRH روی سلولهای گنادوتروپ در این زمان و در نتیجه افزایش حساسیت هیپوفیز حتی به دوزهای پایین اگونیست GnRH ربط داد، که این امر سبب ترشح مقدار بیشتر گنادوتروپینها نسبت به گروه نرمال در این گروه شده است. از طرفی فولیکولهایی به ترشح کم گنادوتروپین واکنش نشان داده‌اند که دارای تعداد رسپتورهای FSH و LH بیشتری هستند. بنابراین فولیکولهای وزیکولار ثانویه که دارای رسپتور LH و FSH بیشتری نسبت به فولیکولهای اولیه و وزیکولار اولیه هستند واکنش نشان داده و رشد کرده و به فولیکول گراف تبدیل گشته‌اند. افزایش معنی‌دار جسم زرد در گروه موشهای ۳۰ روزه که دوز بالا و متوسط آگونیست GnRH را دریافت داشته‌اند مربوط به افزایش سریع در ترشح LH و FSH به دنبال تزریق دارو و در نتیجه سبب رشد و آزاد شدن فولیکولهای گراف که از قبل وجود داشته اند (مانند گروه شاهد) است. البته در گروه موشهایی که دوز متوسط دارو را دریافت داشتند کمتر از گروه دیگر بوده و فقط یک سری از فولیکولهای گراف آزاد گشته ولی در گروهی که دوز بالای اگونیست را دریافت داشته اند تمام فولیکولهای گراف آزاد گشته و تبدیل به جسم زرد شده‌اند به طوری که هیچ فولیکول گرافی در این سن (۳۰ روزه) مشاهده نشد. از این رو می‌توان از دوزهای بالای اگونیست GnRHدر دست‌یابی به فولیکول به جای HCG استفاده کرده که قبلاً نیز در انسان گزارش شده است (۱۳).

با نتایج به دست آمده از فراوانی تعداد فولیکولها می‌توان چنین توجیه کرد که اگر ما تعداد فولیکولهای اولیه را ثابت در نظر بگیریم در گروه شاهد (نرمال) با افزایش سن تعداد فولیکولهای اولیه به تدریج کاهش و تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه و گراف افزایش می‌یابد این امر نیز در تمام گروههایی که دوزی ازآگونیستGnRH را دریافت داشته‌اند با اندکی تغییر قابل مشاهده و گزارش است. برای مثال در دوز متوسط دارو فراوانی تعداد فولیکولهای اولیه (۳۰ روزه) به حداقل رسیده (۶۰درصد از کل فولیکولها) در صورتی که تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه و گراف افزایش یافته که جمعاً حدود ۴۰ درصد می‌شود که اگر همین فراوانی را در گروه نرمال در نظر بگیریم تعداد فولیکولهای اولیه ۸۰ درصد از کل فولیکولها بوده و تعداد فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه و گراف کلاً ۲۰ درصد می‌شود. این خود بیانگر این است که GnRH در دوز متوسط نسبت به گروه شاهد حدود ۲۰ درصد روند فولیکوژنز را افزایش داده است. در نتیجه می‌توان روند تأثیر دارو را در هر یک از گروههای تزریقی و در گروه شاهد دنبال کرد. در بررسی میانگین فولیکولها نسبت به سن مؤکد تحقیقات قبلی و فوق‌الذکر است. به طوری که ابتدا میانگین فولیکولهای اولیه در روز دهم کمتر از روز بیستم زندگی است که این امر مربوط به وجود محدودیت رشدی است (از جمله عدم محدودیت اندروژن سازی جهت تولید استروژن) سپس با افزایش سن میانگین تعداد فولیکولهای اولیه به تدریج کاهش می‌یابد که این مسئله به علت افزایش توانایی آنها جهت تبدیل به فولیکولهای وزیکولار اولیه و ثانویه و گراف و جسم زرد می‌باشد و فولیکولهای فوق‌الذکر بر خلاف روند فولیکولهای اولیه افزایش می‌یابند که این افزایش در بعضی از دوزها به خصوص دوز متوسط آگونیست GnRH نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده است. برای مثال در گروه موشهای ۳۰ روزه فولیکولهای وزیکولار ثانویه حدود ۴ برابر نسبت به گروه شاهد افزایش نشان می‌دهد که این خود بیانگر قدرت تحریک GnRH در دوزهای پایین جهت رشد فولیکولها می‌باشد. بنابراین در این تحقیق با دسته‌بندی فولیکولها و بررسی میانگین فراوانی و روند رشد آنها چنین می‌توان استنباط نمود که دوزهای پایین GnRH قادر به تحریک رشد فولیکولها می‌باشند و همان طور که دیگران در بررسی سرولوژی

گزارش داده‌اند، دوزهای پایین باعث افزایش سطح استروژن نسبت به گروه شاهد می‌گردد (۲۰، ۲۱) و احتمالاً این تغییرات اکثراً به علت تحریک GnRH می‌باشد چرا که در موشهای نابالغ میزان ترشح GnRH محدود است.

نتایج کلی که از بحث بدست می آید به تفکیک عبارتند از:

۱- زمان واکنش به آگونیست GnRH نسبت به سن متفاوت است.

۲- واکنشها و رشد فولیکولی بعد از زمان خاصی از تولد قابل مشاهده است.

۳- با دادن دوز مناسب آگونیست GnRH می‌توان تخمدانها را تحریک و میانگین تعداد فولیکولهای بالغ را افزایش داد.

۴- از دوز بالای آگونیست GnRH می‌توان به جای HCG در دستیابی به فولیکول و تخمک‌گذاری استفاده کرد.

۵- آگونیستهای GnRH می‌توانند ما را در دستیابی به روش مناسب و ارزانتر در القاء تخمک‌گذاری بدون کاربرد گنادوتروپینها و یا استفاده کمتر از آنها یاری کنند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تقدیر خود را از آقایان دکتر احمدی، مرکز باروری و ناباروری اصفهان و دکتر صدرخانلو از مرکز باروری و ناباروری ارومیه و دکتر حمید بهرامیان از گروه علوم تشریح اصفهان ابراز می دارند.

References

1. Leslie JD: "Text of Endocrinology" Third edition, From W. B saunders company, 1995; 1(252-254), 218-229, 151-159

2. Danied R, Mishell JR, Val D, Rogerio A: "Infertility contraception and Reproductive Endocrinology" third edition, from black well scientific publication, 1991; 3- 32 , 807-823 , 104-124

3. Lenon S, Robert HG, Nathan GK: "Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility" fifth Edition, From Williams Wilkins Co, 1994; 2, 5, 6

4. Gordon BC, Andrew R, Haffman S, Swerd O, Richard J, Snten D, Meldrum R, Florence C: "Theraputic applications of luteinizing- hormone - Releasing hormone and its Analogs" Annals of Internal medicine 1, 1985; 102(5): 643-657

5. Clayton Rn, Catt Kj: "Gonadotropin- releasing-hormone receptors: Characterization, physiological regulation and relationship to reproductive function". Endocrinology reviewe, 1981; 2: 186-203

6. Lanzone. A, Fulghesu. AM, Spina MA, Apa R, Menini E, Caruso A, Mancuso S: "successful Induction of ovulation and conception with combined gonadotropin-releasing hormone agonist plushighly purilied follicle-stimulating hormona in patient with polycystic ovarian disease". The J clinEndocrinology metab 1987; 65: 1253

7. Loutradis A, Kallianidis K, Kosiskos S, Bletsa R, Creatsas G, Michalas S, Ararantions D: "Combined Gn RH agonist and HMG therapy in patient with stimulation failure" Int j gyencol obestet, 1991; 36: 317-321

8. Buckler H, Phillips FE, Kovacs GT, Burger GH, Healy OL: "GnRH Agonist administration in polycystic ovary syndrome" The J. clinical endocrinology, 1989; 31: 151-165

9. Fady IS, Howard DM: "A Modified Microdose GnRHa/ gonado tropin protocol for ovarian stimulation in IVF " Experience in 102 cycles" Middle East Fertility society journal, 2000; 5(3): 204-209

10. Blumen feld Z: "Gonadotropin- Releasing hormone antagonists instead of agonists: a change for the better"? Fertility sterility, 2001; 76(3): 443-445

11. Donald Son MDC, Stanhop R: Leets "Gonadotropin responses to GnRH in precocious puberty treated with GnRH analogues" The J clin Endocrinology, 1984; 21: 499-503

12. Phillip EP, Debbie E, Kenneth AB, Oon PW: "The use of gonadotropin- releasing hormone agonist to regulate oocyte retrieval time" The J Fertility sterility, 1990; 54(4): 652-655

13. Lanzone A, Goido M, Fulghesu AM, Nicoletti MC, Caruso A, Guida C, Mancuso S: "Gonadotropine-releasing hormone agonist versus human choronic gonadotropin as a tigger of Ovulation in polycystic ovarian disease gonadotropin hyper stimulated cycles" The J. Fertility and sterility, 1994; 62: 35-41

14. Carson R, Smith J: "Development and steroidogenic activity of preantral follicles in the neonatal Rat ovary" the J Endocrinol, 1986; 110: 87-92

15. Imoedemhe D, Sigue A, Pacpaco E, Olazo A: "Stimulation of endogenous surge of Luteinizing hormone with gonadotrophin-releasing hormone analogue after ovarian stimulation for in vitro fertilization" Fertility and sterility, 1991; 55: 328-332

16. Dan AG: Imoedemhe, Artoro Olazo, Edgardo Pacpaco, Roger C.W. Chan" The use of ultra-low dose of gonadotropin releasing hormon agonist for induction of midcyle endogenous surge of LH for follicular

maturation in patients at high risk of OHSS" Middle East fertility society journal, 2000; 5(3): 213-219
17. Imoedemhe Dag and Pacpaco ELA "In vitro evidence of better steriodogenesis by granulosa cells from pre-ovulatory follicles matured by GnRH-analogue induced LH surge"Middle East fertillity society journal 1998; 3: 42-55
18. Hsch A, Cajander S, Dahl K, Kristensen P, Tar NY: "Gonadotropin-releasing hormone induces ovulation in hyphphesectomized Rats: Studies on ovarian tissue-type plasminogen activator activity messenger Ribonucleic Acid Content, and cellular localization. The J Endocrinol, 1988; 122: 1486-1495
19. Robert D, Koos and William J: "The effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on ovulation and seriodogenesis during perfusion of Rabbit and Rat ovaries in vitro "The J Endocvinology, 1985; 116: 628-632
20. Scott RT, Navot D: "Enhancment of ovarian responsivencess with micro doses of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovulation for in vitro Fertilization" The J of Fertility and sterility, 1994; 61(5): 880-885
21. Navot D, Rosenwoks Z, Anderson F, Hodgen GD: "Gonadotropin - Releasing agonist - Induced ovarian hyper stimulation: low dose side effects in woman and monkeys" The J Of Fertility and sterility, 1991; 55(6): 1069-1075
22. David SM, Rober RR, Nancy S, Robert WR, Samuel SC: "Pulsatile administration of low-dose gonadotropin releasing hormone ovulation and pregnancy in women with hypothalamic amenorrhea" The J of JAMA, 1983: 250(21): 2937-2941
23. Santoro N, Wlerman ME, Filicori M, Waldstrelder I, Crowley WF: "Inter venous adminstration of pulsatile gonadotropin releasing hormone in hypothalamic amenorrhea effect of dosage" The J of clinical Endocrinology metab, 1986; 62(1): 109-115
24. Scott FG: "Text of developmental biology" From W. B. Sunders co, Third Edition, 1991; 713-715
25.Jacobson A, Galen D, Milani H, Weckstein L, Jacobson J: "A novel super ovulation regiment: Three day gonadotropin-releasing hormone agonist with overlapping gonadotropins. The J Fertility and sterility 1991; 56(6): 1169-1172
26. Marthin J, Barry E: "Essential Reproduction" second edition, From black well scientific publications, 1984, 75-104