

تأثيرات بعض العقاقير المنشطة للخصوبة على أنسجة وكيمياء حيوية مبايض الجرذان البيض

جنان حسيب عبد الفتاح منى حسين جاكير لقاء حسين الدليمي
قسم علوم الحياة كلية طب الموصل
كلية العلوم
جامعة الموصل جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2009 / 5 / 21 ؛ تاريخ القبول 2009 / 7 / 13)

الملخص

تضمنت الدراسة التغيرات النسجية في المبيض المتعدد الأكياس في الجرذان البيض البالغة المعرضة للإضاءة المستمرة بشدة 350 لوكس/م² لمدة 14 أسبوعاً، حيث ظهرت مجموعة من التراكيب الكيسية المختلفة الأحجام مع انعدام وجود الجسم الأصفر فضلاً عن احتقان الأوعية الدموية وازدياد خلوية المبيض. كما شملت الدراسة تأثير عقارين منشطين للخصوبة هما سترات الكلوميفين بجرعة 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى والميتفورمين بجرعة 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً كلاً لوحده أو دمجهما معاً ولفترات زمنية مختلفة 4 ، 8 ، 12 أسبوعاً. ولوحظ أن أكثر التغيرات النسجية عند دمج العقارين معاً في حين لم تلاحظ تغيرات نسجية مهمة عند المعاملة بعقار الميتفورمين لوحده، أما الكلوميفين لوحده فقد أدى إلى حدوث تغيرات نسجية ولكن بشدة متوسطة وأقل من دمج العقارين معاً. إن أهم هذه التغيرات تمثلت بالتليف ونكيس الجريبات المبيضية مع ازدياد خلوية قشرة ولب المبيض واحتقان الأوعية الدموية وزيادة تواجد الأجسام الصفر وهي في مراحل أوبيه مختلفة.

وشملت الدراسة تقدير تركيز المالوندايالديهيد والكلوتاثايون في نسج المبيض المتعدد الأكياس للجرذان البالغة المعرضة للإضاءة المستمرة إذ وجد أن هناك ارتفاعاً معنوياً في تركيز الأول مع انخفاض معنوي في تركيز الثاني. كما تمت دراسة تأثير العقارين كل لوحده، أو دمج الاثنان معاً في تقدير تركيز المالوندايالديهيد والكلوتاثايون في نسج المبيض ولوحظ ارتفاعاً معنوياً كبيراً في مستوى تركيز الأول مع انخفاض معنوي في مستوى تركيز الثاني عند دمج العقارين معاً. وكانت نفس النتيجة في جميع المعاملات بالعقاقير وازديادها بحسب الفترات الزمنية ما عدا المجاميع المعاملة بعقار الميتفورمين.

الكلمات الدالة: متلازمة المبيض المتعدد الأكياس، سترات الكلوميفين، ميتفورمين

Effects of some Fertility Activating Drugs on Histology and Biochemistry of Ovaries of White Rats

Janan H. Abdul-Fattah

Muna H. Jankeer

Likaa H. Al-Dulaimi

Department of Biology

College of Science

Mosul University

ABSTRACT

The present study included monitoring and diagnosis of tissue changes in polycystic ovary among white adult female rats, which were exposed to continuous light with an intensity of 350 lux/m² for 14 weeks. These changes were a number of identifying cystic structures of various sizes, the absence of corpus luteum, congestion of blood vessels and ovarian hyperplasia. The study also investigated the influence of two fertility-activating drugs, as clomiphene citrate 1.6 mg/ kg of body weight for one dose estrus stage, metformin 300 mg/ kg of body weight daily. Each of the drugs was used alone or together were given for different periods 4, 8, and 12 weeks. The highest histological change were found when using them together. While no significant tissue changes were observed when using metformine alone. But the treatment with clomiphene citrate alone resulted in medium tissue changes, and were less when combining the two drugs together. The most important changes are fibrosis ovarian follicle cysts, hyperplasia in the cortex and medulla as well as the congestion of blood vessels in addition to an increase in the number of corpora lutea when they are in different atretic stages.

The study also included the estimation of concentration of malondialdehyde and glutathione in the polycystic ovary tissue exposed to continuous light. It was found that there was a significant increase in the concentration of malondialdehyde and a significant decrease in the concentration of glutathione. In addition to that, the influence of clomiphene citrate and metformin drugs separately, or together, to estimate the concentrations of malondialdehyde and glutathion in adult female ovary tissues was also investigated. Malondialdehyde concentration was high, while glutathion concentration was low when combining the two drugs. The same results were obtained in all drug treatments and their increase over different periods of time, except for the groups, which were treated with metformin.

Key words: Polycystic Ovary Syndrome, Clomiphene Citrate, Metformin

المقدمة

يعد المبيض غدة صماء ذات إفراز خارجي وداخلي، ويتكون نسيجه من منطقتين داخلية تدعى اللب وخارجية تدعى القشرة، التي تتكون من نسيج خلوي متماسك أكثر من اللب يحتوي على الجريبات المبيضية وهي الجريب الابتدائي المحاط بطبقة مفردة من الخلايا المسطحة الجريبية (Christian *et al.*, 2005). وعند استمراره بالنمو تظهر فصح صغيرة غير منتظمة ضمن الكتلة الجريبية وتكون مملوءة بالسائل الجريبي ويدعى الجريب في هذه المرحلة الجريب الثانوي، ثم تتحد هذه الفصح المملوءة بالسائل مع بعضها لتكون تجويف واحد يدعى الغار. إن خلية البيضة المحاطة بمجموعة من الخلايا الجريبية تزاغ إلى الجانب وتكون بشكل بروز واضح في الغار، وبذلك تتكون الجريبة الناضجة أو جريبة كراف، وبعد نضوجها تنفجر بعضها وتحرر البيضة، فينكمش جدار الجريب ويتحول إلى تركيب غدي مؤقت يدعى الجسم الأصفر ثم يتحلل ويضمحل بعد فترة وجيزة، وتستبدل خلاياه بنسيج رابط ويصبح بشكل ندبة بيضاء تدعى الجسم الأبيض (Epping *et al.*, 2002).

تعد متلازمة المبيض المتعدد الأكياس من الاضطرابات الشائعة في الغدد الصم ومن أهم أسباب عدم الإنجاب، إذ يتميز المبيض بتجمع أكياس صغيرة يتراوح عددها بين (6-10) أكياس أو أكثر، أما قطرها فيتراوح (4-7) ملم محاطة بطبقات القراب الداخلي المتضخمة للجريبات المتكيسة، وتكون مصحوبة باضطرابات الدورة الحيضية من انقطاع الطمث وعسرته، عدم التبويض المزمّن، مع ظهور حب الشباب وزيادة كثافة الشعر في مختلف مناطق الجسم، وسببه زيادة هرمون الذكورة الاندروجين المصحوبة بمقاومة الأنسولين وفرط الأنسولين (Charnvises *et al.*, 2005).

استخدمت عقاقير الخصوبة بشكل واسع منذ بداية الستينات، ومن أهمها عقار سترات الكلوميدين Clomiphene citrate أو الكلوميد والمستخدم بشكل كبير لحث تكوين البيض ونمو الجريبات ومضاعفة عددها وكذلك لمعالجة متلازمة المبيض المتعدد الأكياس (David *et al.*, 2001). كما يعد عقار الميتفورمين Metformin من العقاقير المستخدمة لحث عملية الاباضة وتكوين البيض (Fleming *et al.*, 2002)، إذ أظهرت الدراسات بان فعاليته تكون من خلال انخفاض تكوين الكلوكوز في الكبد مع انخفاض معدل امتصاص الكاربوهيدرات في الأمعاء، إذ انه يخفض من مستوى الكلوكوز في الدم وذلك بزيادة حساسية الأنسولين دون زيادة تركيز الأنسولين (Brown *et al.*, 2006)، إذ يقوم باسترجاع دورة الاباضة الطبيعية وتقليل فرط الاندروجين، ويقلل معدل الإجهاض العفوي ومن مخاطر الإصابة بداء السكر من النوع الثاني (Khattab *et al.*, 2006).

وفي الدراسة الحالية تم استخدام الإضاءة المستمرة للحصول على متلازمة المبيض المتعدد الأكياس في إناث الجرذان، وتعد الإضاءة مصدراً للإجهاد التأكسدي لان هناك نسقاً خاصاً في حساسية الدماغ للضوء، إذ يؤثر الإجهاد على بعض الفعاليات الأيضية في الدماغ مسبباً تحفيز منطقة تحت المهاد لإفراز كميات من

الهرمون المحرر لمحفزات المناسل GnRH والتي تحفز إفراز كل من الهرمون المحفز للجريبات FSH والهرمون المحفز للجسم الأصفر LH إذ لاحظ Salvett وجماعته (2003) زيادة في مستوى كل منها عند التعرض للإضاءة لفترات طويلة، وان الجذور الحرة للأحماض الدهنية غير المشبعة المتولدة عن إفراز كميات كبيرة من الهرمونات التناسلية المسببة لأكسدة الشحوم الثنائية والتي تعمل على تحويل في تركيب البروتينات والدهون والكاربوهيدرات وقواعد الحامض النووي منقوص الأوكسجين في الخلية، كما تسبب أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة بوساطة جذر الهيدروكسيل OH والبيروكسيل RO (Valko et al., 2005). إذ يعد المالوندايالديهيد كدليل وناتج ثانوي لبيروكسدة الدهون بعد تعرض الأنسجة لأصناف الأوكسجين الفعالة والجذور الحرة ويستخدم كمؤشر لحصول أذى في أغشية الخلايا، وتظهر تفاعلات سلاسل الجذور لبيروكسدة الدهون بشكل عمليات فسلجية مستمرة غير مسيطر عليها يمكن أن تغير وتعيق في وظائف الخلايا الرئيسية، و يساهم استخدام مضادات الأكسدة والفيتامينات في تقليل أو إزالة هذه التأثيرات مؤدياً إلى استعادة الخلايا ووظائفها الطبيعية (Jacob and Burri, 1996).

ونظراً لعدم وجود دراسات نسجية وكيموحيوية للمبايض العقيمة في قطرنا وسوء استخدام العقاقير المنشطة للخصوبة، لذا تهدف الدراسة الحالية إلى دراسة التغيرات النسجية المرافقة لمتلازمة المبيض المتعدد الأكياس في إناث الجرذان البيض البالغة المعرضة للإضاءة المستمرة، وكذلك المتسببة عن دمج سترات الكلوميفين والميتفورمين معاً، وكلاً لوحده وبفترات زمنية مختلفة. وكذلك تقدير تركيز المالوندايالديهيد و الكلوتاتايون في كل من نسج المبيض أنفة الذكر.

المواد و طرائق العمل

الحيوانات المستخدمة في الدراسة: استخدمت 350 أنثى جرد ابيض سويسرية بالغة *Rattus rattus norvegicus* بأعمار (2.5-3) أشهر وأوزان (220-250) غم، تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري/جامعة الموصل، وتمت تربيتها في بيت الحيوانات، واتبعت الظروف المثلى كالحرارة والضوء والنظافة والطعام والماء المستمر لمدة أسبوعين قبل البدء بالتجربة لتحديد انتظام الدورة الشبقية بوساطة اخذ المسحات المهبلية يوميا، قسمت إلى مجاميع (25 أنثى/مجموعة).

العقاقير المستخدمة: عقار سترات الكلوميفين فرنسي الصنع، يحتوي كل قرص على (50) ملغم من المادة الفعالة. الميتفورمين إيطالي الصنع، يحتوي كل قرص على (500) ملغم من المادة الفعالة. تم تجريع إناث الجرذان البالغة لهذه العقاقير بعد إذابتها في الماء المقطر عن طريق الفم باستخدام المحقنة الفموية Gavege needle.

تصميم التجارب:

المحور الأول: دراسة التغيرات النسجية والكيموحيوية لنسيج المبيض المتعدد الأكياس. قسمت الحيوانات إلى مجموعتين ووضعت في أقفاص منفصلة كآلاتي:

المجموعة 1: تضم 25 أنثى، عرضت للإضاءة المستمرة لمدة 14 أسبوع، باستخدام شمعات الفلوريسنت بشدة 350 لوكس/م²، لغرض الحصول على مبايض متعددة الأكياس (Salvett et al., 2003).

المجموعة 2 (السيطرة): تضم 25 أنثى عرضت للإضاءة الطبيعية 14 ساعة ضوء و 10 ساعات ظلام.

المحور الثاني: دراسة التغيرات النسجية والكيموحيوية المتسببة عن تأثير عقار سترات الكلوميدين والميتفورمين بفترات زمنية مختلفة.

استخدم عقار سترات الكلوميدين بجرعة 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى، أي تم التجريع في أول يوم من الدورة الشبقية والتي تستمر خمسة أيام، ثم الانتظار خمسة أيام أخرى، ثم البدء بالتجريع ثانيةً (Ozdemir et al., 2005)، واستخدم عقار الميتفورمين بجرعة 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يوميا (Katakam et al., 2000)، ثم تركت كل مجموعة لمدة شهرين بعد الانتهاء من التجريع، وقتلت في نهاية اليوم الثاني من دورة الشبق، وأزيلت المبايض وصورت ثم ثبتت في محلول الفورمالين المنظم بتركيز 10%.

التجربة الأولى: المجموعة الأولى: عوملت بعقار سترات الكلوميدين بجرعة 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم 3 جرعات بمعدل جرعة واحدة لكل دورة شبقية وأخرى لمدة 4 أسابيع.

المجموعة الثانية: عوملت بعقار الميتفورمين بجرعة 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يوميا لمدة 4 أسابيع.

المجموعة الثالثة: عوملت بالعقارين معاً، سترات الكلوميدين بجرعة 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم 3 جرعات بمعدل جرعة واحدة لكل دورة شبقية وأخرى، وعقار الميتفورمين بجرعة 300 ملغم /كغم من وزن الجسم يوميا - لمدة 4 أسابيع.

المجموعة الرابعة (السيطرة): عوملت بالماء المقطر فقط عن طريق الفم يوميا لمدة 4 أسابيع.

التجربة الثانية: تمت معاملة الجرذان بنفس المعاملات السابقة و لمدة 8 أسابيع.

التجربة الثالثة: تمت معاملة الجرذان بنفس المعاملات السابقة و لمدة 12 أسبوع.

تحضير المقاطع النسجية: غسلت العينات المحفوظة بالماء الجاري لإزالة المثبت. وتمت عملية الإنكاز بسلسلة متصاعدة من تراكيز الكحول الأثيلي وروقت بالزايلين ثم شربت و طمرت بشمع البارافين، و قطعت بسمك (4-5) مايكروميتر، وصبغت المقاطع بصبغة هيماتوكسولين هارس والايوسين (Luna, 1968) و فحصت وصورت بالمجهر من نوع Olympus مزود بألة تصوير رقمية -Digital Camera Sony DSC W30.

تقدير مستوى بيروكسدة الدهن في نسيج المبيض: قدر مستوى بيروكسدة الدهن (المالوندايالديهيد) MDA باستخدام طريقة (Gilbert *et al.*, 1984) حيث يمثل MDA احد نواتج عملية بيروكسدة الدهن في الأنسجة المختلفة، ويعتمد هذا على التفاعل بين بيروكسيدات الدهن بشكل رئيس المالوندايالديهيد وبين حامض ثايوبارباتيورك كما يعتمد هذا التفاعل على الدالة الحامضية pH.

تقدير مستوى الكلوتاتايون في نسيج المبيض: قدر مستوى الكلوتاتايون باستخدام طريقة إلمان (Ellman *et al.*, 1959).

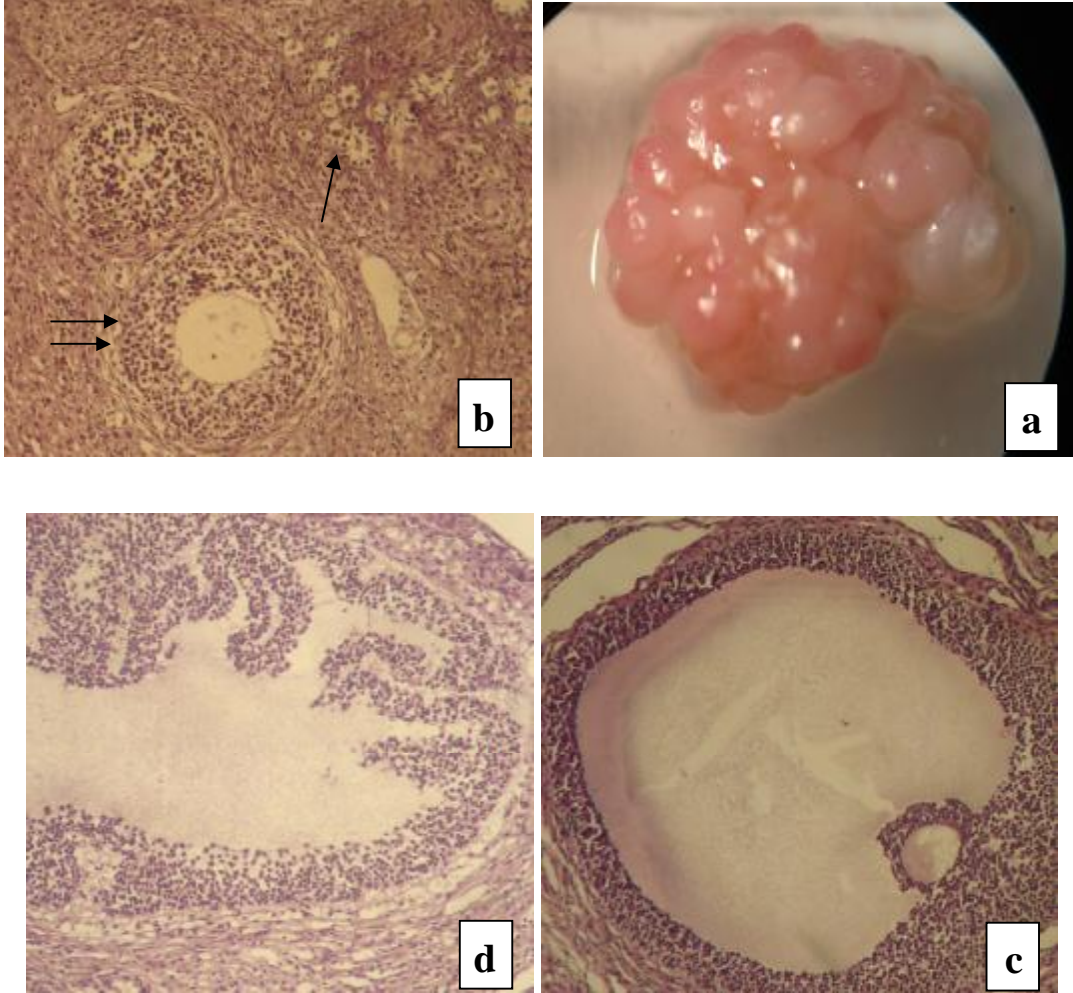
التحليل الإحصائي: حلت النتائج إحصائيا مقارنة بين مجموعة السيطرة وكل من مجاميع الدراسة باستخدام اختبار دنكن وعدت النتائج معنوية عند مستوى $p \leq 0.05$ (Agresti and Franklin, 2007).

النتائج و المناقشة

1 - الدراسة المظهرية والنسجية لمجاميع السيطرة (صورة 1): المظهر الخارجي للمبيض يحتوي على فصوص كروية الشكل وردية اللون وذات أحجام مختلفة (صورة 1-a). أما مقاطع المبيض فتحتوي جريبات بيضية في مراحل مختلفة من التطور: أولية و ثانوية (صورة 1-b) وناضجة (صورة 1-c) ومقاطع في الجسم الأصفر (صورة 1-d).

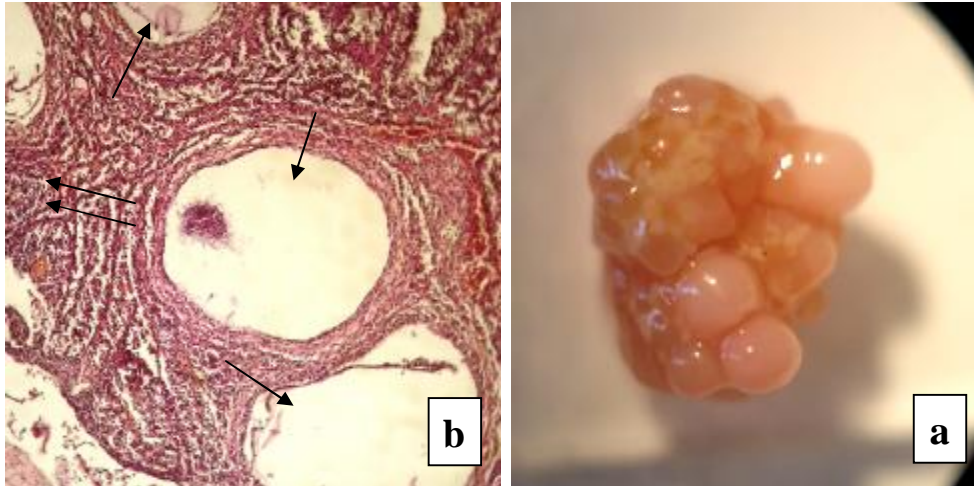
2 - الدراسة المظهرية والنسجية في المبيض المتعدد الأكياس لإناث الجرذان البالغة المعرضة للإضاءة المستمرة لمدة 14 أسبوعا، (صورة 2): المبيض من المظهر الخارجي يتكون من تراكيب كيسية متعددة شاحبة اللون (صورة 2-a). وأظهر الفحص النسجي وجود جريبات عديدة منكبسة دائرية الشكل ذات أحجام مختلفة محاطة بخلايا حبيبية متضخمة وعدم وجود الجسم الأصفر، فضلا عن فرط تنسج واضح بازدياد خلوية المبيض و احتقان الأوعية الدموية في متن المبيض (صورة 2-b).

اهتمت الدراسة الحالية بمتابعة وتشخيص التغيرات النسجية في المبيض المتعدد الأكياس إذ أن حدوثه موضوع بالغ الأهمية وتشارك فيه آليات معقدة (Eliting *et al.*, 2000). وان التغيرات النسجية الحاصلة في المبيض هي تشخيص واضح ومهم لحالة الجريبات وذلك لوجود اختلافات في الخصائص الشكلية والوظيفية المتمثلة في متلازمة المبيض المتعدد الأكياس وهذا ما أكدته الدراسة الحالية في تشخيص التغيرات النسجية للمبيض المتعدد الأكياس لإناث الجرذان البالغة المعرضة للإضاءة المستمرة (لمدة 14 أسبوعا)، وشخصت بوجود جريبات مبيضية منكبسة مع غياب الجسم الأصفر وفرط تنسج المبيض والتي يعزى السبب فيها إلى تغيرات هيكلية ووظيفية تحدث خلال تكوين الأكياس (Futterweit, 1998).



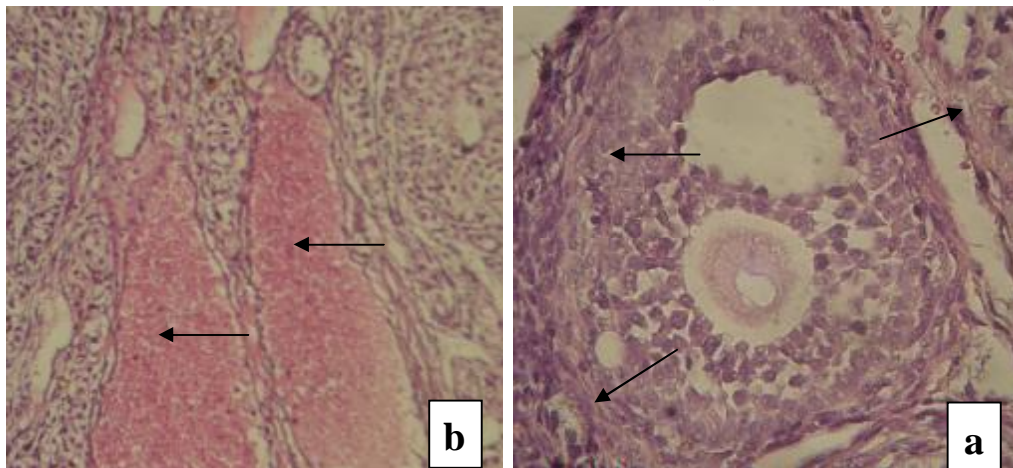
صورة 1: مبيض سيطرة لأنثى جرد بالغة غير مصبوغ. a- مظهر خارجي للمبيض لونه وردي و يحوي تراكيب جريبية مختلفة الأحجام X15. b- مقطع في جريب أولي (سهم) و جريب ثانوي (سهمين) X240. c- مقطع في جريب كراف الناضج X850. d- مقطع في الجسم الأصفر X850 - صبغة H&E

وأشار Francis و جماعته (2004) إلى أن الوظائف الخلوية المرتبطة بالنمو والانقسام الخلوي تستجيب إلى هرمونات متخصصة لنمو الأنسجة والتي تعد من العناصر المسؤولة عن تحديد شكل الخلايا. كما أن للجريبات المنكيسة دورا مهما في إطالة فترة عدم الإباضة من دون تكوين الجسم الأصفر (Goldziener and Green, 1993). إن التشكل النسيجي للأكياس الجريبية كان عرضة إلى فرضيات عدة ولا زالت عوامل تشكل الأكياس غامضة وارتباطها بعوامل متعددة أخرى لذا تعد متلازمة المبيض المتعدد الأكياس حالة مرضية في الغدد الصماء إذ يحدث فيها اضطراب في توازن المحور المبيضي الكظري النخامي تحت المهادي مما ينتج عنه فشل في آلية التكاثر الدوري (Conn et al., 2000).



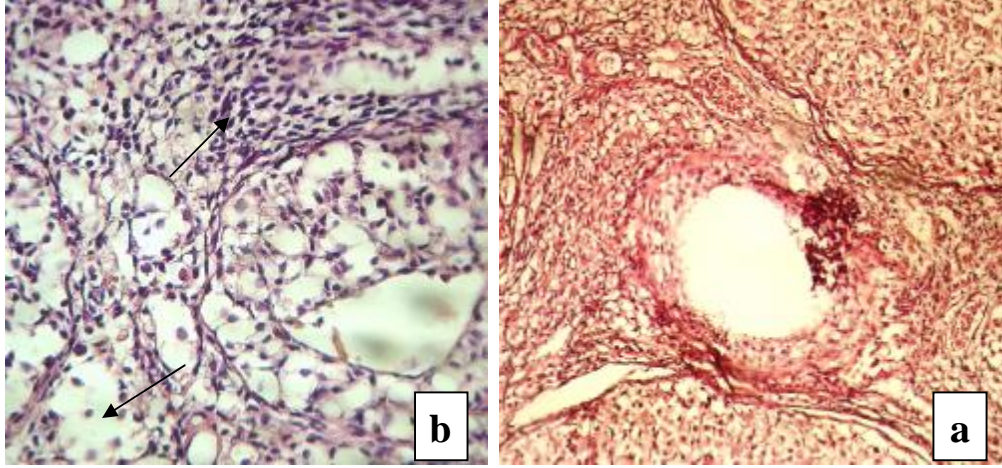
صورة 2: مبيض متعدد الأكياس لأنثى جرد بالغة من المجموعة المعرضة للإضاءة المستمرة لمدة 14 أسبوعاً. a - المبيض من المظهر الخارجي يتكون من تراكيب كيسية متعددة شاحبة اللون X10. وباقي الصور توضح مقاطع في المبيض. b - مقطع في المبيض يوضح الجريبات المتكيسة (سهم) وعدم وجود الجسم الأصفر و فرط تنسج ليفي (سهمين) في متن المبيض و احتقان الأوعية الدموية في سدى المبيض X 68 - صبغة H&E

3- مجموعة سترات الكلوميفين 3 جرعات مقدار الجرعة 1.6 ملغم/كلغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى، لمدة 4 أسابيع: أظهر الفحص النسيجي (صورة 3) وجود جريبات بيض أكثر نضجا من السيطرة، ووجود الجسم الأصفر وتكاثر النسيج المكون لسدى المبيض بدرجة أكثر من السيطرة مع بقاء الجسم الأصفر الذي كان أكثر خلوية من الوضعية السوية (صورة 3-a). كما لوحظت جريبات بيضية ناضجة وتليف شديد وازدياد خلوية المبيض و احتقانات في قشرة ولب المبيض (صورة 3-b).



صورة 3: مقاطع نسيجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بسترادات الكلوميفين 3 جرعات مقدار الجرعة 1.6 ملغم/كلغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى، لمدة 4 أسابيع: a - فرط تنسج ليفي شديد وازدياد خلوية و تنسج المبيض (سهم) X750، b - احتقان الأوعية الدموية في قشرة و لب المبيض (سهم) X 240 - صبغة H&E

4- مجموعة الميتفورمين 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يوميا لمدة أربعة أسابيع: أوضح الفحص النسيجي للمبيض (صورة 4) وجود جريبات ابتدائية وثانوية في سدى المبيض مع وجود الجسم الأصفر في طبقة القشرة و فرط تنسج الخلايا المبيضية و أجزاء من الجسم الأصفر (صورة 4-a). وامتاز المبيض بخلاياه الفاتحة المتفجبة و فرط تنسج خلايا النسيج الخلالي (صورة 4-b).

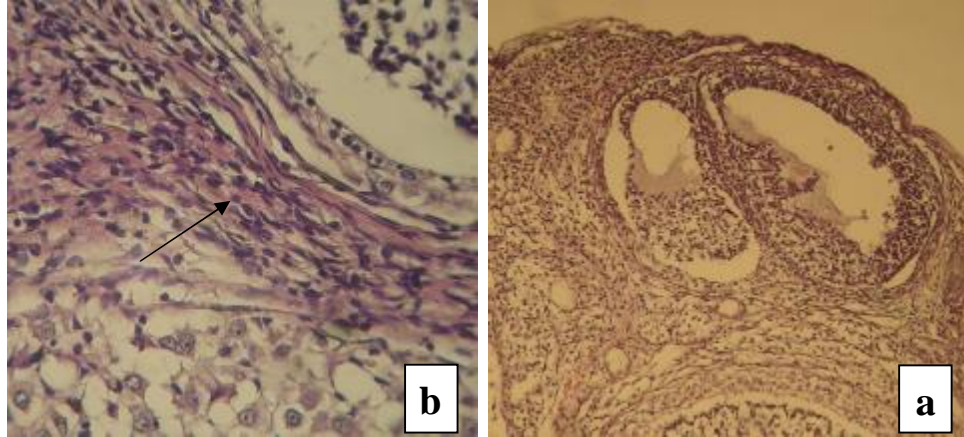


صورة 4: مقاطع نسيجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بالميتفورمين 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يوميا لمدة 4 أسابيع. a - فرط تنسج الخلايا المبيضية و أجزاء من الجسم الأصفر X165، b - تفجج الخلايا

المبيضية و فرط تنسج في خلايا النسيج الخلالي (سهم) X 370 - صبغة H&E

5- مجموعة العقارين معاً لمدة 4 أسابيع: أظهر الفحص النسيجي وجود جريبات بيض مختلفة مراحل النضج في الطبقة القشرية والبعض منها كان في المرحلة الأوبية. كما لوحظ ازدياد خلوية المبيض (صورة 5-a) و كذلك تليف المبيض (صورة 5-b).

أظهرت نتائج الدراسة أن إعطاء ثلاثة جرعات من عقار سترات الكلوميدين لوحده بمقدار جرعة واحدة لكل دورة شبقية وأخرى، لفترة 4 أسابيع أدى إلى ظهور درجة متوسطة من فرط التنسج وتليف المبيض، أما إعطائه بنفس الجرعة مع الميتفورمين يومياً لفترة 4 أسابيع فقد زاد من درجة التليف الذي لوحظ عند إعطاء سترات الكلوميدين لوحده. في حين عند إعطاء الميتفورمين لوحده يومياً لفترة 4 أسابيع لم تلحظ شدة فرط التنسج ولم تحصل أية حالة تليف أو تكيس. وهذه النتيجة تتفق مع الدراسات السابقة إذ أشار Moll و جماعته (2006) إلى أن استعمال سترات الكلوميدين لفترات طويلة يسبب اضطرابات في طور الصفري ضمن الدورة المبيضية مما يؤدي إلى حدوث تغيرات نسيجية وتكيس المبيض، وفي الدراسة الحالية تبين انه من الممكن أن تبدأ هذه التغيرات منذ الفترات الأولى من استخدام عقار سترات الكلوميدين، إن آلية عمل سترات الكلوميدين تكمن في كونه يتنافس مع الاستروجين على مواقع الارتباط

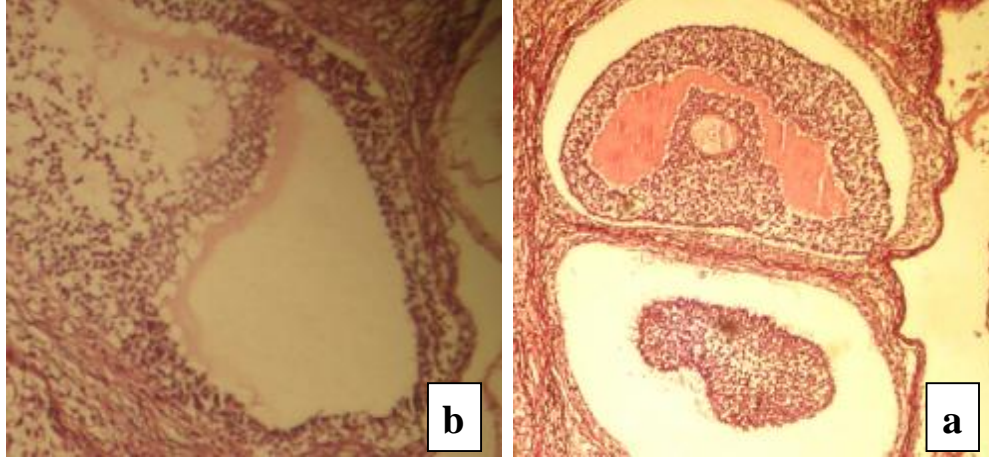


صورة 5: مقاطع نسيجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بالعقارين معاً لمدة 4 أسابيع. a - جريبات في مراحل نضج مختلفة، وجود الجسم الأصفر، وفرط تنسج في المبيض X115، b- فرط تنسج ليفي (سهم) في متن المبيض X 370 - صبغة H&E

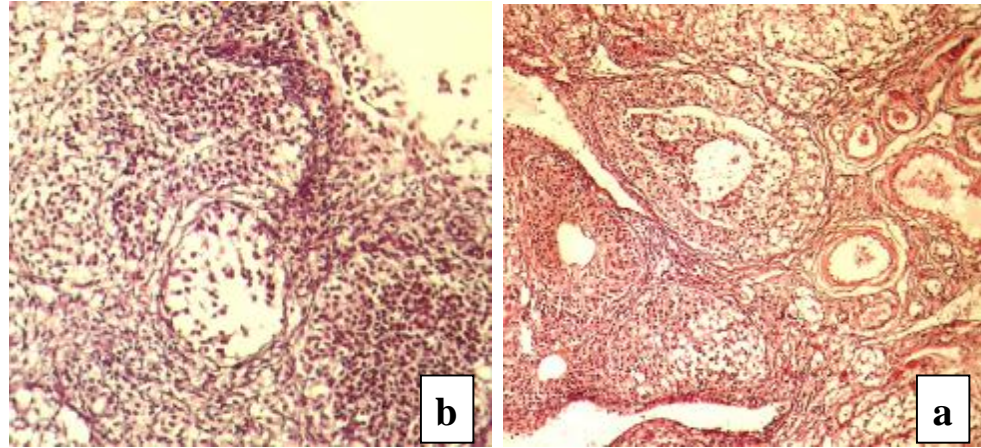
مع مستقبلاته في تحت المهاد ويجعل هذا العضو مستشعرا لنقص الاستروجين في مجرى الدم، وبذلك فإن تحت المهاد يأمر الغدة النخامية على إفراز كمية إضافية من الهرمون المحفز للجريبات FSH والهرمون المحفز للجسم الأصفر LH في مجرى الدم. والمستوى العالي من هرمون FSH يحفز تطور الجريبات والبيوض الخاصة بها. أما عقار الميتفورمين لم يحدث أي تأثيرات إذ يعد من العقاقير الأمانة (Attia, et al., 2001).

6- مجموعة سترات الكلوميدين 6 جرعات مقدار الجرعة 1.6 ملغم/كلغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى، لمدة 8 أسابيع: أوضح الفحص النسيجي وجود عدد من الجريبات في مراحل مختلفة من النضج (صورة a-6) وكذلك لوحظ وجود جريبات متكيسة ذات جدران رقيقة فارغة ووجود بعض التراكيب فيها ما يشير إلى أنها قد تكون جريبات أولية. كما لوحظ في بعض المقاطع وجود مراحل تكون الجسم الأصفر مع ازدياد خلوية المبيض واحتقان الأوعية الموجودة فيه (صورة b-6).

7- مجموعة الميتفورمين بجرعة 300 ملغم/كلغم من وزن الجسم يومياً لمدة 8 أسابيع: أظهر الفحص النسيجي للمبايض وجود جريبات ابتدائية وثانوية في قشرة المبيض مع وجود الجسم الأصفر (صورة a-7)، كما لوحظ ازدياد خلوية وتفجى الخلايا في قشرة ولب المبيض (صورة b-7).

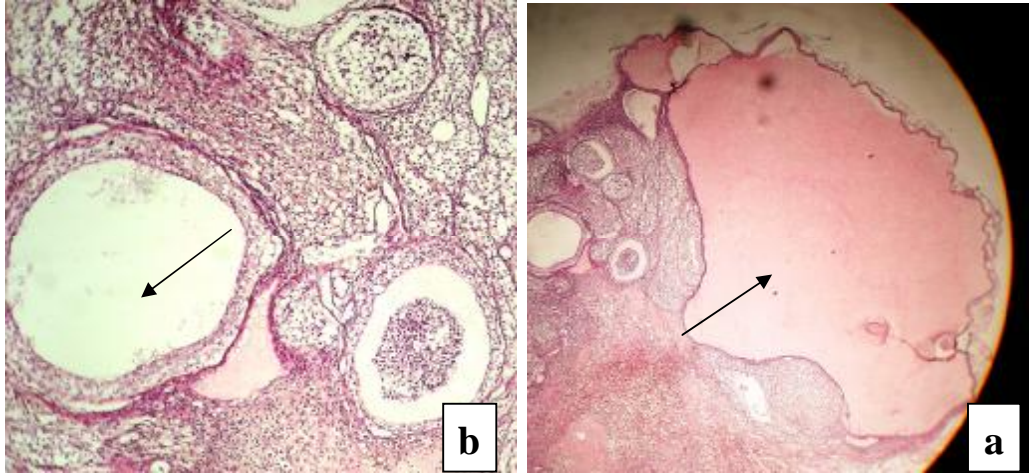


صورة 6: مقاطع نسجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بسترات الكلوميدين 6 جرعات مقدار الجرعة 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى، لمدة 8 أسابيع. a - جريبات في مراحل مختلفة من النضج و الأوب، وجود أجسام صفر متعددة X200، b- أحد مراحل تكوين الجسم الأصفر من جريبة عانت من الأوب X 165 - صبغة H&E



صورة 7: مقاطع نسجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بالميتفورمين بجرعة 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً لمدة 8 أسابيع. a - جريبات في مراحل مختلفة من النضج و تكون الأجسام الصفر X115، b- فرط تنسج متن المبيض X 200 - صبغة H&E

8- مجموعة العقارين معاً لمدة 8 أسابيع: أوضح الفحص النسجي وجود مراحل مختلفة من نضوج جريبات المبيض وكذلك وجود تراكيب كيسية في قشرة المبيض (صورة 8-a)، كما لوحظ ارتشاح الخلايا الصفراوية ووجود الجسم الأصفر. كذلك لوحظ احتقان في بعض أجزاء المبيض (صورة 8-b).

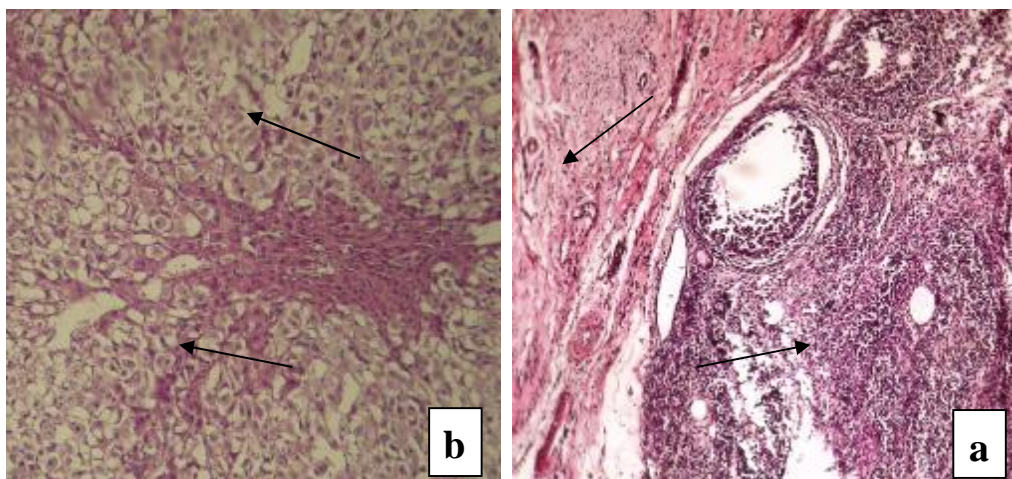


صورة 8: مقاطع نسيجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بالعقارين معاً لمدة 8 أسابيع. a - أكياس غير منتظمة في قشرة المبيض حاوية على سائل (سهم)، X24، b- تراكيب كيسية و بعضها في مراحل تكوين الجسم الأصفر (سهم) X 75 - صبغة H&E

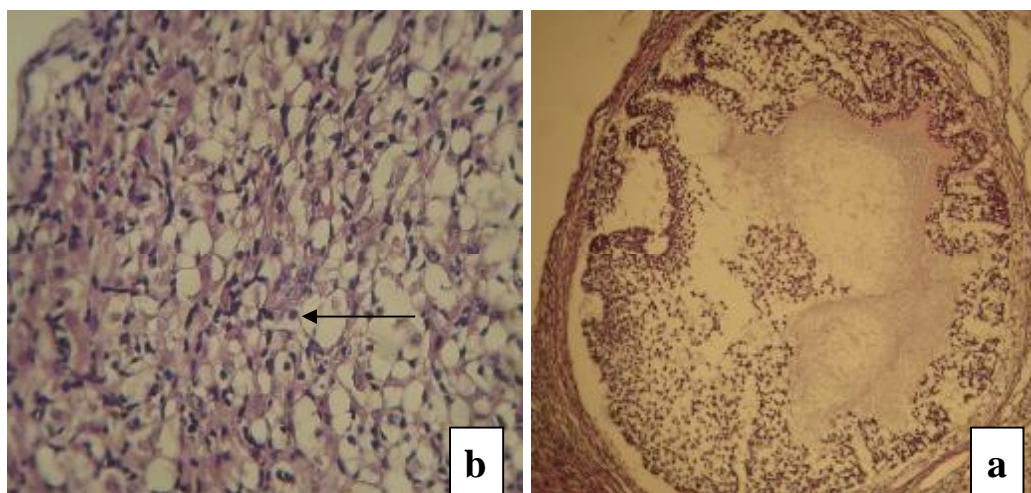
9- مجموعة سترات الكلوميدين 9 جرعات مقدار الجرعة 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى، لمدة 12 أسبوعاً: أوضح الفحص النسيجي وجود جريبات مبيضية في مراحل مختلفة من النضج وقد أصيبت بالتقهقر في مرحلة الأوب. وازدياد خلوية المبيض وارتشاح أعداد كبيرة من الخلايا وحدوث تليف في متن المبيض (صورة 9-a)، ووجود أوعية دموية محتقنة في لب المبيض مع ازدياد النسيج الضام فيه (صورة 9-b).

10- مجموعة الميتفورمين 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً لمدة 12 أسبوعاً: أظهر الفحص النسيجي وجود جريبات مختلفة النضج كما لوحظ أيضاً مراحل تكون الجسم الأصفر (صورة 10-a)، وازدياد خلوية وتفجى الخلايا المبيضية (صورة 10-b).

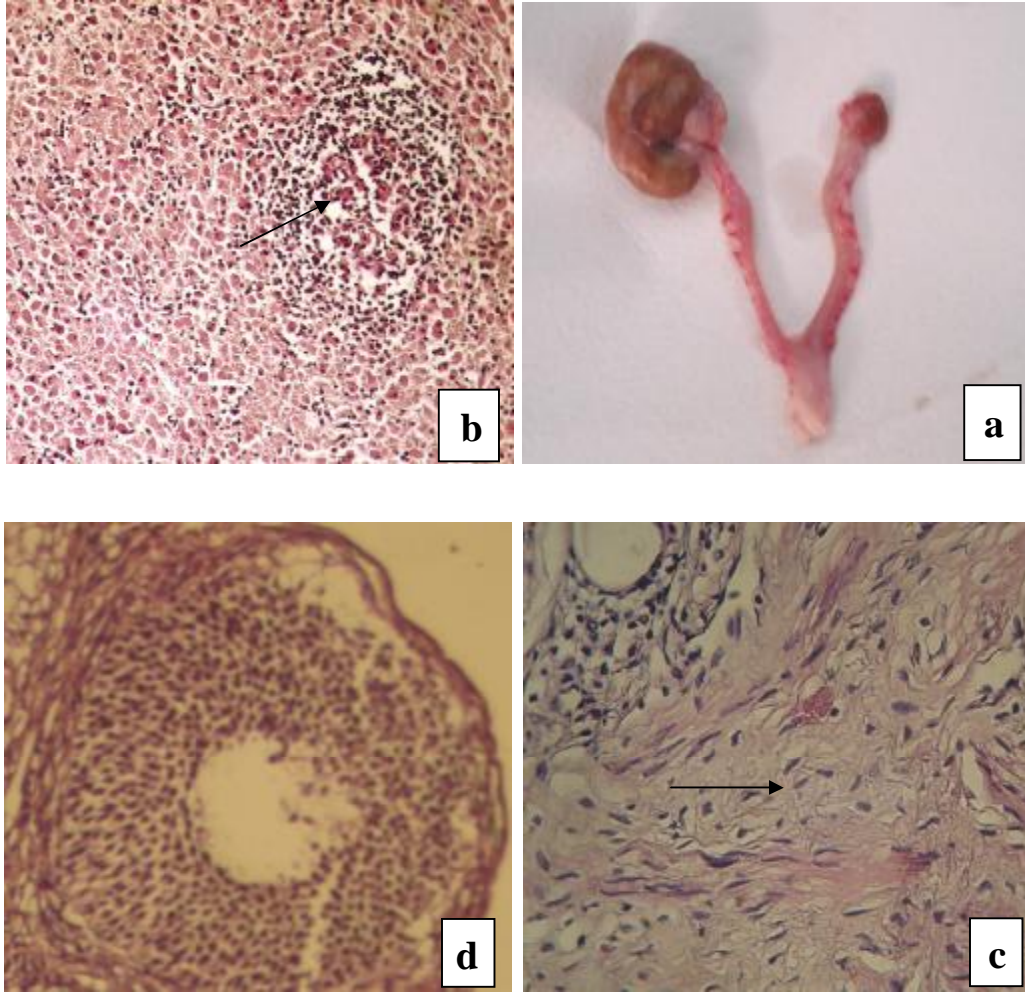
11- مجموعة العقارين معاً لمدة 12 أسبوعاً: في 3 عينات لوحظ تضخم احد المبيضين واختفت التراكيب الجريبية وظهر كأنه تركيب واحد وعند قطعه احتوى على مادة كثيفة القوام تشبه الفلين لونها أخضر ذات رائحة كريهة (صورة 11-a)، كما أظهر الفحص النسيجي وجود مراحل مختلفة من الجريبات و بعضها ناضجة مع ظهور تراكيب كيسية في قشرة المبيض ووجود الجسم الأصفر كما لوحظ ازدياد خلوية المبيض (فرط تنسج) و وجود بؤر تكاثرية واضحة (صورة 11-b) فضلاً عن التليف الواضح في قشرة المبيض (صورة 11-c)، وجريب ناضج في قشرة المبيض (صورة 11-d).



صورة 9: مقاطع نسيجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بسترات الكلوميدين 9 جرعات مقدار الجرعة 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى، لمدة 12 أسبوعا: a - فرط تنسج خلايا المبيض و تليف متن المبيض (سهم) X90، b- نخر في قشرة و لب المبيض و تقجي الخلايا فيهما (سهم) 145 X - صبغة H&E



صورة 10: مقاطع نسيجية لمبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بالميتفورمين 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يوميا لمدة 12 أسبوعا ، a - جريبات مبيضية و مراحل أوب و تكوين الجسم الأصفر X115، b- تقجي خلايا متن المبيض (سهم) X 370 - صبغة H&E



صورة 11: مبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بالعقارين معاً لمدة 12 أسبوعاً ، a- تضخم أحد المبيضين في المظهر الخارجي b- فرط تنسج الخلايا المبيضية و وجود بؤر تكاثرية واضحة (سهم) X100 ، c- فرط تنسج ليفي في متن المبيض (سهم) ، X370 ، d- جريب ناضج في قشرة المبيض X 850 - صبغة H&E

أظهرت الدراسة الحالية أن إعطاء سترات الكلوميفين لوحده بواقع ست جرعات بمقدار جرعة واحدة لكل دورة شبقية وأخرى، لفترة 8 أسابيع قد زاد من شدة فرط التنسج وحدوث التليف وظهور تكيس المبيض. أما عند إعطائه بنفس الجرعة مع الميتفورمين يومياً لفترة 8 أسابيع فقد حدث فرط تنسج شديد وتليف شديد ودرجة متوسطة من تكيس المبيض. وأدى إعطاء سترات الكلوميفين لوحده 9 جرعات بمقدار جرعة واحدة لكل دورة شبقية وأخرى، لفترة 12 أسبوعاً إلى وصول شدة فرط تنسج وتليف المبيض إلى ذروته مع وجود درجة متوسطة من التكيس، في حين إعطاء الميتفورمين لوحده يومياً للفترات 8 و 12 أسبوعاً لم تلاحظ أي تغييرات نسجية (الجدول 1). هذه النتائج تتفق مع الدراسات السابقة التي أشارت إلى أن إعطاء سترات الكلوميفين ولفترات زمنية طويلة يؤدي إلى حدوث تكيس المبيض واحتمالية حدوث سرطان المبيض. وكلما كانت فترة استخدام عقار سترات الكلوميفين أطول، كان الاختلال كبيراً في تركيز FSH و LH مما يؤدي

إلى ظهور تغيرات مرضية خطيرة مثل تكوين الأكياس وحدوث الأورام (Bulun, 2003). إن زيادة شدة التغيرات النسجية في المبيض عند استخدام العقارين معاً قد تعطل في ضوء احتمال وجود تأثيرات تآزرية بينهما في تأثيرهما على نشاط المبيض، وقد أشار Moll وآخرون (2006) بأن استعمال العقارين تؤدي إلى زيادة معدل الإباضة بنسبة 5% وعلى الرغم من سلامة استخدام الميتفورمين إلا أن إضافته ترافقها ظهور تأثيرات جانبية كبيرة، وذكر الباحث بأنه من غير المناسب أخذهما سوياً كطريقة أولية لحث عملية الإباضة في النساء. أما إعطاء الميتفورمين لوحده فلم يؤدي إلى أية تغيرات مرضية في المبيض إذ أنه يعد من العقاقير الآمنة (Attia et al., 2001).

الجدول 1 : شدة التغيرات النسجية في مبيض إناث الجرذان المعاملة بسترات الكلوميدين والميتفورمين بحسب فترات زمنية مختلفة (بعد شهرين من انتهاء المعاملة).

التغيرات النسجية			المجاميع
تكيّس المبيض	تليف	فرط تنسج	
-	-	-	مجموعة السيطرة
-	++	++	مجموعة سترات الكلوميدين 3 جرعات لمدة 4 أسابيع
-	-	+	مجموعة الميتفورمين لمدة 4 أسابيع
-	+++	++	مجموعة سترات الكلوميدين 3 جرعات والميتفورمين لمدة 4 أسابيع
+	+++	+++	مجموعة سترات الكلوميدين 6 جرعات
-	-	+	مجموعة الميتفورمين لمدة 8 أسابيع
++	++++	++++	مجموعة سترات الكلوميدين 6 جرعات والميتفورمين لمدة 8 أسابيع
++	++++	++++	مجموعة سترات الكلوميدين 9 جرعات
-	-	+	مجموعة الميتفورمين لمدة 12 أسبوعاً
+	++++	++++	مجموعة سترات الكلوميدين 9 جرعات والميتفورمين 9 جرعات لمدة 12 أسبوعاً

جرعة سترات الكلوميدين 1.6 ملغم/كغم من وزن الجسم لكل دورة شبقية وأخرى.

جرعة الميتفورمين 300 ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً.

(-) عدم وجود تغير. (+) درجة بسيطة من التغير. (++) درجة متوسطة من التغير.

(+++) درجة فوق المتوسطة من التغير. (++++) درجة شديدة من التغير.

المتغيرات الكيموحيوية:

يوضح الجدول 2، ارتفاعاً معنوياً في تركيز المالوندايالديهيد بنسبة (21%) مع انخفاض معنوي في تركيز الكلوتاثيون بنسبة (38%) في نسج المبيض المتعدد الأكياس في إناث الجرذان البالغة مقارنة مع مجموعة السيطرة.

الجدول 2 : تركيز المالوندايالديهيد والكلوتاثيون في نسج المبيض المتعدد الأكياس لإناث الجرذان البالغة المعرضة للإضاءة المستمرة (لمدة 14 أسبوعاً).

المجاميع	تركيز المالوندايالديهيد** نانومول / غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي*	التركيز %	الزيادة %	تركيز الكلوتاثيون** مايكرمول / غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي*	التركيز %	النقصان %
السيطرة	1.12 ± 658 a	100	-	0.15 ± 1.85 a	100	-
المبيض المتعدد الأكياس	2.55 ± 798 c	121	21	1.63 ± 1.15 c	62	38

• المعدل ± الخطأ القياسي هو لخمسة مكررات. ** الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمالية 0.05 والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل إليه Elia وآخرون (2006) في دراستهم لنسيج مبيض إناث الفئران من نوع Balb / c المحقونة بمادة ديهيدروبيندرسترون كما أوضح أن فرط الأندروجين سبب إجهاد تأكسدي في مبيض الفئران المحقونة بهذه المادة مما أدى إلى حدوث التكيس المتعدد لمبيض الفئران، وأشارت بعض الدراسات إلى أن زيادة تركيز المالوندايالديهيد مع انخفاض في فعالية إنزيم اوكسيد النترريك ساينثيز نتيجة لحصول إجهاد تأكسدي للمبيض مما يؤدي نقص تأثير اوكسيد النترريك على فعالية الأنزيمات وتأثيرها على النظام البيولوجي وتوليد أصناف الأوكسجين الفعالة ودورها في إحداث الإجهاد التأكسدي (Sander et al., 2006). بينت نتائج الجدول (3) ارتفاعاً معنوياً في نسبة تركيز المالوندايالديهيد في نسج مبيض إناث الجرذان المعاملة اعتماداً على نوع العقار المستخدم وفترة المعاملة، إذ كانت أعلى نسبة ارتفاع في نسيج

الجدول 3: تركيز المألوندايديهايد في نسيج مبيض اناث الجرذان البالغة المعاملة بعقاري سترات الكلوميدين والميتفورمين كل لوحده وسترات الكلوميدين والميتفورمين معاً لفترات زمنية مختلفة.

المعاملة/ (اسبوع)	المجاميع	السيطرة	سترات الكلوميدين	الميتفورمين	سترات الكلوميدين مع الميتفورمين
4	تركيز المألوندايديهايد ** نانومول/غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي *	2.03 ± 654 a	1.50 ± 740 b	1.30 ± 668 a	1.78 ± 794 d
	% التركيز	100	113	102	121
	% الزيادة	-	13	2	21
8	تركيز المألوندايديهايد ** نانومول/غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي *	1.91 ± 662 a	1.69 ± 820 b	2.92 ± 680 a	1.59 ± 860 c
	% التركيز	100	124	103	130
	% الزيادة	-	24	3	30
12	تركيز المألوندايديهايد ** نانومول/غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي *	1.11 ± 675 a	0.89 ± 890 c	1.80 ± 699 a	2.91 ± 976 d
	% التركيز	100	132	104	145
	% الزيادة	-	32	4	45

* المعدل ± الخطأ القياسي هو لخمسة مكررات . ** الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمالية 0.05 والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن (Duncan test).

مبيض اناث الجرذان المعاملة بعقاري سترات الكلوميدين والميتفورمين معاً إذ بلغت 21% ، 30% و 45% للفترات 4 ، 8 ، 12 أسبوعاً على التوالي. وكان هناك زيادة في ارتفاع نسبة تركيز المألوندايديهايد طردياً مع زيادة فترة المعاملة. في حين كان تركيز المألوندايديهايد في نسيج مبيض اناث الجرذان المعاملة بعقار سترات الكلوميدين لوحده بلغت 13% ، 24% و 32% للفترات 4 ، 8 ، 12 أسبوعاً على التوالي. أما عقار الميتفورمين لوحده لم يظهر زيادة معنوية في تركيز المألوندايديهايد في نسيج مبيض اناث الجرذان المعاملة بهذا العقار إذ بلغت نسب تركيز المألوندايديهايد فيها 2% و 3% و 4% للفترات 4 ، 8 ، 12 أسبوعاً على التوالي.

أظهرت نتائج الجدول (4) انخفاضاً معنوياً في نسبة تركيز الكلوتاتايون في نسيج مبيض إناث الجرذان المعاملة اعتماداً على نوع العقار المستخدم وفترة المعاملة، إذ كانت أعلى نسبة انخفاض في نسيج مبيض إناث الجرذان المعاملة بعقاري سترات الكلوميفين والميتفورمين معا بلغت 34% و 42% و 58% للفترات 4، 8، 12 أسبوعاً على التوالي. إذ كان هناك انخفاض في نسبة تركيز الكلوتاتايون طردياً مع زيادة فترة المعاملة. في حين كان تركيز الكلوتاتايون في نسيج مبيض إناث الجرذان المعاملة بعقار

الجدول 4: تركيز الكلوتاتايون في نسيج مبيض إناث الجرذان البالغة المعاملة بعقاري سترات الكلوميفين والميتفورمين كل لوحده و سترات الكلوميفين والميتفورمين معاً لفترات زمنية مختلفة.

المجاميع المعاملة/ (أسبوع)	السيطرة	سترات الكلوميفين	الميتفورمين	سترات الكلوميفين مع الميتفورمين
4	تركيز الكلوتاتايون ** مايكرومول/غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي *	0.08 ± 1.89 a	0.06 ± 1.56 b	0.76 ± 1.84 a
	% التركيز	100	83	97
	% النقصان	-	17	3
8	تركيز الكلوتاتايون ** مايكرومول/غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي *	0.12 ± 1.82 a	0.93 ± 1.34 c	1.11 ± 1.74 a
	% التركيز	100	74	96
	% النقصان	-	26	4
12	تركيز الكلوتاتايون ** مايكرومول/غرام نسيج رطب المعدل ± الخطأ القياسي *	0.65 ± 1.79 a	0.15 ± 1.12 c	0.90 ± 1.69 a
	% التركيز	100	63	94
	% النقصان	-	37	6

* المعدل ± الخطأ القياسي هو لخمسة مكررات . ** الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمالية 0.05 والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن (Duncan test).

سترات الكلوميفين لوحده بلغت 17% و 26% و 37% للفترات 4 ، 8 ، 12 أسبوعاً على التوالي. أما عقار الميتفورمين لوحده لم يظهر انخفاضاً معنوياً في تركيز الكلوتاتايون في نسيج مبيض إناث الجرذان المعاملة بهذا العقار إذ بلغت نسب تركيز الكلوتاتايون فيها 3% و 4% و 6% للفترات 4 ، 8 ، 12 أسبوعاً على

التوالي. وقد يعزى السبب إلى أن آلية عمل سترات الكلومفين بتحفيزها للغدة النخامية على إفراز كميات من الهرمون المحفز للجريبات FSH والهرمون المحفز للجسم الأصفر LH لتحفيز نمو الجريبات وتكوين البيوض ونضجها، واستخدامها للفترات (4، 8، 12) أسبوعاً تمثل فترة طويلة قد تكون كافية لإفراز كميات إضافية من الهرمون المحفز للجريبات FSH والهرمون المحفز للجسم الأصفر LH وبذلك يحدث إجهاداً تأكسدياً في المبيض، و سببه التغيرات غير الطبيعية في البيئة أو ضمن الجسم نفسه (Fatemi et al., 2003).

توصي هذه الدراسة بمراجعة المتابعة الطبية الدقيقة والمستمرة للنساء عند استخدامهن العقاقير المنشطة للخصوبة مثل سترات الكلومفين والميتفورمين، لما تسببه من تغييرات مرضية نسجية وكيموحيوية خطيرة في المبيض مثل التكريس وفرط التنسج والتليف والتي تقلل أو تقضي على الخصوبة .

المصادر الأجنبية

- Agresti, A. ; Franklin C.(2007). "Statistics the Art and Science of Learning from Data". Pearson Prentice Hall, USA, 693 p.
- Attia, G. R. ; Rainey, W. E. ; Carr, B. R.(2001). Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil. Steril.*, **76** , 517 – 524.
- Brown, F.; Wyckoff, J. ; Rowan, J. ; Jovanovic, L. ; Sacks, D.(2006). Metformin in pregnancy : its time has not come yet. *Diabet. Care.*, **29** , 485-486.
- Bulun, S. (2003). Ovulation induction in women with infertility : a new indication for aromatase inhibitors. *Fertile. Steril.*, **80**, 1338-1339.
- Charnvise, K.; Weerakiet, S.; Tingthanatikul, Y. ; Wansumrith, S.(2005). Acanthosis nigricans clinical predictor of abnormal glucose tolerance in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.*, **21**, 161-164.
- Christian, C.A.; Mobley, J.L. ; Moenter, S.M. (2005). Diurnal and estradiol dependent changes in gonadotropin – releasing hormone neuronfiring activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 15682-15687.
- Conn, J. J. ; Jacobs, H. S. ; Conway, J. S. (2000). The prevalence of polycystic ovaries in women with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Endocrinol.*, **52** , 81-86.
- David, T.; Vander Molen, Valerie, S. ; Ratt, S. (2001). Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertil. Steril.*, **75**, 310-314.
- Elia, E.; Sander, V.; Luchetti, C. ; Solano, M. ; Girolomo, G. ; Gonzalez, C. ; Motta, A. (2006). The mechanisms involved action of metformin in regulation of ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mole. Hum. Repr.*, **12**(8), 475- 481.
- Eliting, M. W. ; Korsen, T. J. ; Rekers-Momberg, L. T.; Schoemaker, J. M.(2000). Women with polycystic ovary syndrome gain regular cycles when aging. *Hum. Reprod.*, **15**, 24-28.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- Epping, J. ; Wigglesworth, K. ; Pendola, F. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 2890-2894.

- Fatemi, H.; Kalibianakis, E.; Tournaye, H.; Camus, M.; Van Steirteghem; Devroey P. (2003). Clomiphene citrate letrozole for ovarian stimulation : a pilot study. *Reprod. Biomed.*, **7**, 543-546.
- Fleming, R.; Hopkinson, Z. Wallace, M.; Greer, I. ; Sattar, N. (2002). Ovarian function and metabolic factors in women with oligomenorrhea treated with metformin in a randomized double blind placebo-controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**,1- 6.
- Francis, S.; Greenspan, M. ; David, G. Gardner, M. (2004)."Basic and Clinical Endocrinology". 7th edn. McGraw- Hill, Inc., New York, pp. 314 -320.
- Futterweit, W. M. (1998). Polycystic ovarian disease: etiology, diagnosis and treatment. *Compr. Ther.*, **14** ,12-20.
- Gilbert, H.S.; Stump, D.D. ; Roth, E.F. (1984). A method to correct for errors caused by generation of interfering compounds during erythrocytes lipid peroxidation. *Analyt. Biochem.*, **137**, 282-286.
- Goldziener, J. W. ; Green, J. A.(1993). Clinical and biochemical features of polycystic ovarian disease. *Fertil. Steril.*, **14** , 631-653.
- Jacob, R. A. ; Burri, B. J. (1996). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*, **41** , 1819 – 1828.
- Katakam, P., Ujhelyi, M.; Hoenig, M. ; Miller, A. (2000). Metformin improves vascular function in insulin- resistant rat. *Amer. Heart Asso- Inc.*, **35** , 106- 112.
- Khattab, S.; Mohsen, I.; Foutouh, A. ; Ramadan, S. ; Moaz, M. ; Al-Inany H.(2006). Metformin reduces abortion in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.*, **22**, 680-684.
- Luna, L. G. (1968)." Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology". 3rd edn. The Blakiston Division, McGraw- Hill Book Company, New York. pp.5-35.
- Moll, E.; Bossuyt, P.; Korevaar, J.; Lambalk, C. ; van der Veen, F.(2006). Effect of clomifene citrate plus metformin and clomiphene citrate plus placebo on induction of ovulation in women with newly diagnosed polycystic ovary syndrome: randomized double blind clinical trial. *B. M. J.*, 332, 1485-1500.
- Ozdemir, I.; Ustundag, N.; Guven, A.; Duran, B. ; Demirel, F.(2005). Effect of clomiphene citrate on ovarian endometrial and cervical histologies in rat model. *Gynecol. Obstet. Invest.*, **60**, 181-185.
- Salvett, N.R. ; Gimeno, E.J. ; Canal, A.M. ; Lorente, J.A. ; Ortega, .H.(2003). Histochemical study of the extracellular matrix components in the follicular wall of polycystic ovary. *Braz. J. Morphol. Sci.*, **20**, 3-10.
- Sander, V.; Luchetti, C.; Solano, M.; Elia, E.; Di Girolamo, G.; Gozanlez; Motta, A.(2006). Role of the N,N' dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reprod.*, **131**, 591-602.
- Valko, M. ; Morris, H. ; Cornin, M. T. (2005). Metals toxicity and oxidative stress. *Gurr. Med. Chem.*, **12** (10) , 161 – 208.