مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره دوازدهم، شمارهٔ ۲، خرداد – تیر ۱۳۸۹، صفحه ۱۲-۷

تاثیر دوزهای مختلف کلومیفن سیترات بر مورفولوژی و تکثیر سلول های استرومای آندومتر انسانی در محیط کشت

مظفر خزاعی(PhD) [۱*]، فرزانه چوبساز(MD) [۱]، صابر خزاعی [۲]

۱- مرکز تحقیقات باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
۲- دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

دریافت: ۸۸/۶/۲۰ ، اصلاح: ۸۸/۹/۱۸، پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: کلومیفن سیترات در تحریک تخمک گذاری در زنان نابارور به کار می رود، علی رغِم تاثیر مناسب آن در افزایش تعداد تخمک ها، میزان باروری گـزارش شده در طی مصرف آن پایین است. با توجه اهمیت سلولهای استرومای آندومتر انسانی در تغییرات منتهی به لانه گزینی، این مطالعه بـه منظـور شناسـایی تـاثیر دوز هـای مختلف کلومیفن سیترات بر مورفولوژی و تکثیر این سلول ها در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، ۷ نمونه آندومتر انسانی در شرایط استریل و با روش مکانیکی خُرد شده و سلول های استرومایی با روش هضم آنزیمی (کلاژناز) و عبور از صافی های سلولی و سانتریفیوژ، جدا شده و سپس با رنگ آمیزی تریپان بلو، درصد زنده بودن و تعداد آنها تعیین گردید. سلول های هر نمونه بطور مساوی به چهار گروه تقسیم شد. گروه کنترل فقط محیط کشت DMEM/F12 دارای آنتی بیوتیک و FBS- ۵٪ و گروه های آزمایش، محیط کـشت و یکـی از دوزهـای ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار کلومیفن سیترات را به مدت دو هفته گرفتند. در آغاز و پایان کشت از سلولها عکس برداری و نهایتا" با استفاده از آنزیم تریپسین (۰/۲۵٪) سـلول هـا از کـف ظرف کشت جمع آوری و مجددا" زنده بودن و تعداد آن ها تعیین و گروهها مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: تغییرات مورفولوژیک در گروه کنترل و دوز ۱ میکرومولار مشابه و شامل تبـدیل سـلولهای اسـترومال کـروی بـه شـکل فیبروبلاسـتی بـود. دوزهـای ۵ و ۱۰ میکرومولار کلومیفن سیترات مانع تکثیر و تغییرات مورفولوژیک طبیعی این سلول ها شدند. اختلاف معنی داری بین این دو گـروه و گـروه هـای کنتـرل و ۱ میکرومـولار مشاهده شد (p<۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد گه تاثیر کلومیفن سیترات بر سلولهای استرومای آندومتر در محیط کشت وابسته به دوز بوده و دوزهای بالاتر آن اثر مهار کننده دارند.

واژه های کلیدی: *آندومتر انسانی، سلول استروما، کشت سلول، کلومیفن سیترات.*

مقدمه

تحریک تخمک گذاری با کلومیفن سیترات یک روش موثر در بهبود باروری زنان بدون تخمک گذاری است(۱). علی رغم تاثیر قابل توجه آن در تحریک تخمک گذاری، میزان موفقیت بارداری در طی مصرف کلومیفن سیترات کمتر است. این عدم تطابق بین میزان تخمک گذاری و حاملگی پس از درمان با کلومیفن سیترات را ناشی از اثر ضد استروژنی آن بر آندومتر و گردن رحم می دانند (۲). در بیمارانی که تحت درمان با کلومیفن سیترات بوده اند، بلوغ آندومتر به تاخیر افتاده و تغییراتی در جریان خون رحمی رخ داده است (۳). کلومیفن سیترات در سال ۱۹۵۶ ساخته و در ۱۹۶۰ مورد کارآزمایی بالینی

هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۸۴۰۵۲ دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: کرمانشاه، بلوار شهید شیرودی، خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، تلفن: ۲۱-۴۲۷۴۵=۶۱۷-۰۸۳۱.
e-mail:mkhazaei1345@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.2.1.5]

قرارگرفت. این دارو یک ترکیب تری فنیل کلرواتیلن با خواص ضداستروژنی است که طی چهل سال گذشته به طور وسیعی در درمان نازایی ناشی از عدم تخمک گذاری استفاده شده و بطور معمول بصورت قرص های خوراکی تجویز می شود. از مزایای آن مصرف آسان، در دسترس بودن، ارزانی و بی خطر بودن نسبی است که آن را به عنوان اولین داروی انتخابی درنازایی ناشی از عدم تخمک گذاری معرفی می کند (۴و۳).

تحقیقات متعددی در زمینه فهم بهتر عملکرد، مکانیسم و تغییرات آندومتر درطی لانه گزینی انجام شده است (۵). در طی درمان نازایی با کلومیفن، درصد موفقیت پایین است که برخی علت آن را اثرات جانبی نامطلوب کلومیفن سیترات بر بافت آندومتر می دانند.

Nelson و همکاران نشان دادند که کلومیفن سیترات دارای اثرات منفی مستقیم بر پذیرندگی آندومتر و باروری است (۶). Wu و همکاران تاثیر کاهشی کلومیفن سیترات بر گیرنده های استروژنی و مهار میتوز در بافت آندومتر مرحله تکثیری را بیان کردند(۷). Xia و همکاران نیز نشان دادند که کلومیفن سیترات تولید گیرنده استروژنی و پروژسترونی در آندومتر را مهار کرده و تکامل آندومتر را تحت تاثیر قرار می دهد (۸).

در تحقیقات قبلی در مدل حیوانی، مشخص شد که کلومیفن سیترات در مقایسه با HMG و PMSG اثرات کاهش دهنده بر تعداد نوزادان، بارداری، و تعداد مکان های لانه گزینی داشته و ساختار بافتی آندومتر را تغییر میدهد (۱۰و۹). London و همکاران نیز افزایش معنی دار هیپرپلوییدی ناشی از کلومیفن سیترات در طی کشت آزمایشی اووسیت را نشان دادند (۱۱). Sereepepong و همکاران، کاهش تراکم غدد و افزایش سلول های واکوئله در اثر کلومیفن سیترات در آندومتر زنان دارای دوره قائدگی منظم را معرفی کردند (۱۲). Smruta و همکاران بیان کردند که کلومیفن سیترات بعلت اثر طولانی ضد استروژنی، بلوغ آندومتر را به تاخیر می اندازد (۳) اما Kilic Okman و همکاران اثرات ضد استروژنی کلومیفن سیترات بر آندومتر را بدست نیاوردند (۱۳). Bonhoff و همکاران مصرف کلومیفن سیترات را با افزایش ادم استرومای آندومتری، اختلال در تکامل آندومتر ترشحی و عدم همزمانی تکامل آندومتر با رویان لانه گزین مرتبط دانستند (۱۴) اما Hosie و همکاران بیان کردند که کلومیفن سیترات فعالیت آپوپتوزی نرمال در طی لانه گزینی را مختل نساخته است ولی مورفولوژی سلول های اپی تلیوم رحمی را تغییر و احتمالاً از این طریق بر عدم موفقیت لانه گزینی تأثیر می گذارد (۱۵). علی رغم درصد پایین بارداری طی مصرف کلومیفن سیترات، هنوز هم بعنوان معمول ترین داروی نسخه شده در درمان ناباروری بکار می رود (۱۶).

مطالعات متعددی در مورد اثر کلومیفن سیترات بر ضخامت آندومتر در نمای بالینی (۱۶و۳و۲) و تغییرات سلول های اپیتلیال (۱۷) و رگ زایی (۲۰–۱۸) وجود دارد اما اثر آن بر سلول های استرومای آندومتر انسانی مد نظر قرار نگرفته است، این سلول ها مهمترین جمعیت سلولی آندومتر هستند که در تغییرات ماهیانه، تجدید ساختار آندومتر در طی دوره ماهیانه، لانه گزینی و بیماری هایی نظیر آندومتریوز نقش اساسی ایفا می کنند. با توجه به فقدان بررسی علمی در این زمینه و ضرورت شناسایی اثر مستقیم کلومیفن بر این سلول ها، این مطالعه به منظور شناسایی اثر کلومیفن سیترات بر سلول های استرومای آندومتر انسانی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از ۷ نمونه بیوپسی آندومتر از رحم های هیسترکتومی شده زنان ۳۷ـ۲۵ ساله بدون سابقه خونریزی غیرطبیعی رحمی و هورمون درمانی در سه ماه قبل که جهت اعمال جراحی به دلایل غیر بدخیمی آندومتر نظیر میوم، مراجعه کرده بودند، با اخذ رضایت نامه استفاده شد. کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه نیز استفاده از بافت های انسانی در این تحقیق را تایید نمود. بخشی از هر نمونه جهت تشخیص پاتولوژی ارسال و در صورت گزارش نرمال و در فاز تکثیری بودن آندومتر در مطالعه باقی مانده و در غیر این صورت حذف شدند.

جداسازی سلول های استروما از نمونه های آندومتر: جهت جداسازی سلول های استروما از سایر عناصر سلولی آندومتر انسانی از روش گزارش شده توسط مطالعات دیگر استفاده شد (۲۱). پس از شستشوی کامل نمونه از خون و مخاط با محلول Hank's حاویآنتی بیوتیک (۲٪)، خُرد کردن بافت با تیغ بیستوری در یک پتری دیش استریل انجام شد. سپس هضم آنزیمی بافت خُرد شده در محیط DMEM/F12 دارای FBS –۵٪ و آنزیم کلاژناز I (sigma): ۲ mg/ml برای مدت ۹۰–۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

سوسپانسیون سلولی به ترتیب از صافی های سلولی (cell strianer) ۷۰ و ۴۰ میکرومتری عبور داده شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰g مایع رویی را دور ریخته و رسوب سلو ل ها با محیط کشت شکسته شده و بر محلول فیکول (ficoll) لایه گذاری و با دور ۴۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس لایه سلولی سطح فیکول را جمع آوری و با محلول نمکی رقیق مخلوط کرده و در دور ۱۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب نهایی حاوی سلول های استرومایی است که ماهیت آن ها با رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی (آنتی ویمنتین) در مطالعات قبلی تایید شده است (۲۱). سلولها با تریپان بلو رنگ آمیزی و با لام نئوبار (هموسیتومتر) شمارش و به نسبت مساوی (حداقل ۲×۱۰^{۴}) در ظروف کشت بعنوان گروههای کنترل و آزمایش (دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار کلومیفن) توزیع گردید.

دوزهای دارو بر اساس مطالعات آزمایشگاهی مرتبط انتخاب شد(۲۰) نمونه ها به مدت ۱۵ روز در شرایط مناسب کشت (دمای۳۷?c و ۵٪ Co2 و رطوبت حداکثر) کشت گردید. در آغاز و پایان مطالعه از سلول ها عکس برداری شد و محیط کشت آن ها هر سه روز یکبار تعویض و تغییرات سلولی بررسی گردید. سپس با کمک آنزیم تریپسین ۰/۲۵٪ (sigma) سلول ها از کف ظرف کشت جدا و با تریپان بلو رنگ آمیزی و با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند. از مقایسه تصاویر، تغییرات مورفولوژیک بدست آمد.

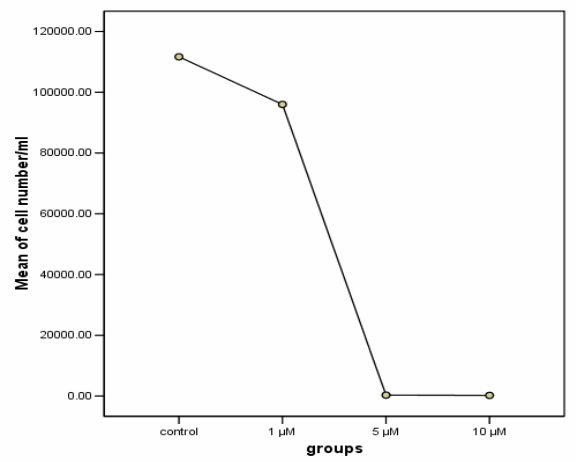
سپس داده ها (تعداد سلولهای هر گروه) با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

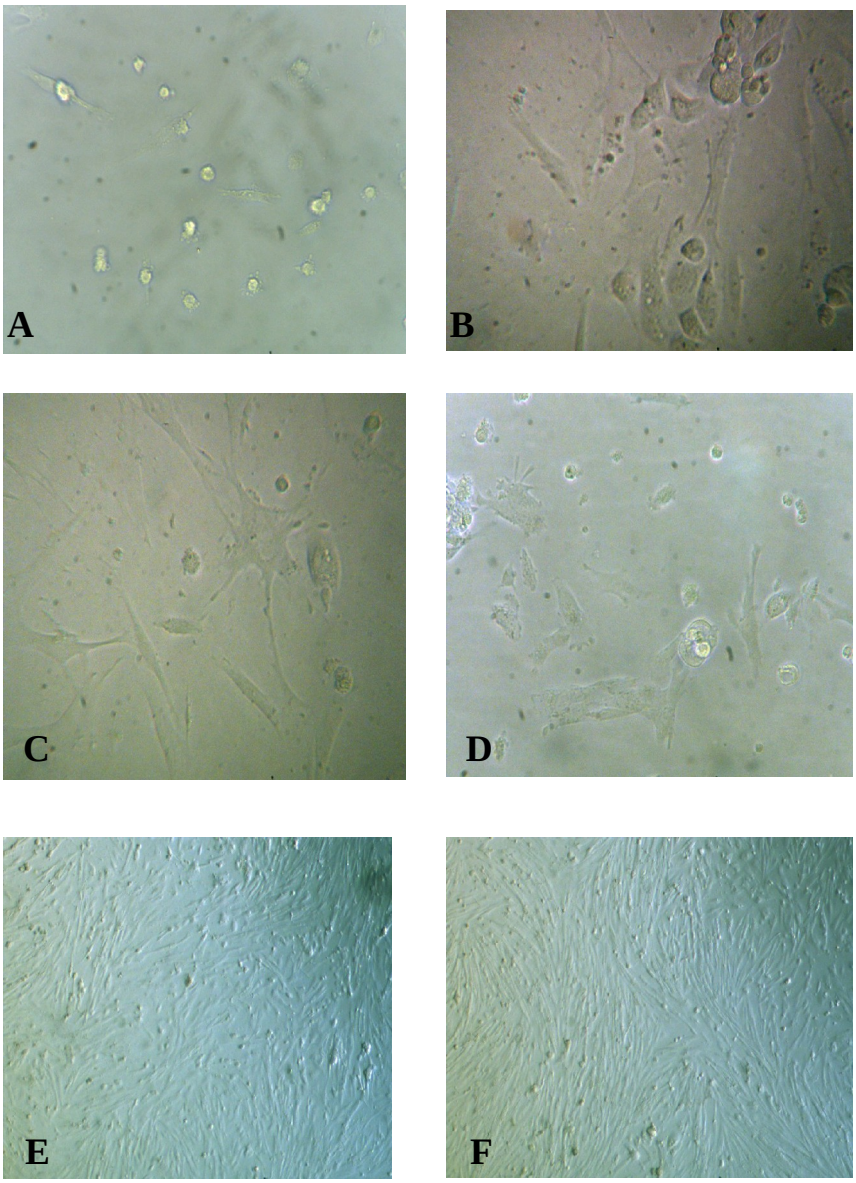
در گروه کنترل، تکثیر و افزایش تعداد سلولها همراه با تغییرات مورفولوژیک از سلولهای کروی کوچک به حالت درشت و فیبروبلاستی انجام شد

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.2.1.5]

(تصویر ۱: A, B, C, E). دوز ۱ میکرومولار کلومیفن نسبت به گروه کنترل تغییرات عددی و مورفولوژیک معنی دار نشان نداد (شکل۱: D,F) و خصوصیات سلول ها یکسان و مشابه به نظر می رسید. در هر دو گروه و با گذشت زمان، سلول های استرومال از حالت کروی اولیه به شکل پهن و چند وجهی و نهایتاً درشت و فیبروبلاستی در آمدند. دوز ۵ میکرومولار و ۱۰میکرومولار، در روزهای اولیه کشت مانع تغییر مورفولوژیکی سلول ها (کروی به فیبروبلاستی) و نهایتاً باعث مرگ آن ها طی هفته اول کشت گردیدند (p<۰/۰۰۱). اثر مهاری این دارو در پایان هفته اول رشد کاملاً مشخص گردید و ادامه دوره کشت را برای دوزهای ۵ و ۱۰ میکرومولار غیر ضروری می نمود. ادامه کشت در هفته دوم برای گروه های کنترل و ۱ میکرومولار با تکثیر و تمایز بیشتر سلول ها همراه بود هر چند تعداد نهایی سلول ها در گروه ۱ میکرومولار (۳۸۰۰±۹۶۰۰۰) از گروه کنترل (۳۵۰۰±۱۱۱۰۰۰) کمتر بود اما این اختلاف معنی دار نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه میانگین تعداد سلول های استروما ی آندومتر در گروه های کنترل و آزمایش



تصویر ۱. سلولهای استرومای آندومتری در آغاز کشت(A). چهار روز بعد در گروه کنترل(B) و ۷ روز بعد در گروههای کنترل(C) و۱ µM (D) و دو هفته بعد در در گروههای کنترل(E) و۱ µM (F).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.2.1.5]

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه هر دو اثر وابسته به دوز و دوره زمانی کلومیفن سیترات ،بر سلول های استرومای آندومتر انسانی مشاهده شد که قبلا" در مورد سلولهای آندوتلیال (۱۹) و سلولهای پوششی آندومتر (۲۲) معرفی شده بود. به نظر می رسد این اثر مربوط به تاثیر مستقیم کلومیفن سیترات بر سلولها باشد و ارتباطی با خواص ضد استروژنی آن ندارد (۱۹و۱۷). دوز ۱ میکرومولار کلومیفن سیترات تغییرات مورفولوژیک و عددی معنی داری نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد، اما دوزهای بالاتر (۱۰و۵ میکرومولار) آن مانع تکثیر سلول ها با اختلاف معنی داری نسبت به گروه های کنترل و ۱ میکرومولار و مانع تغییرات مورفولوژیک آن ها گردید. تغییرات موفولوژیک آندومتر در طی مصرف کلومیفن سیترات قبلا" مدنظر قرار گرفته بود (۲۳و۱۲) اما هیچکدام اثر کلومیفن سیترات را بر سلولهای استرومای آندومتر مطرح نساخته بودند. اثرات قابل قبول دوز کمتر کلومیفن سیترات بر سلول های استرومای آندومتر انسانی نسبت به گروه شاهد نکته مهمی است که باید مد نظر قرار گیرد. اثرات منفی و زیانبار کلومیفن سیترات بر بافت آندومتر، لانه گزینی و نهایتاً باروری در مطالعات متعددی بیان شده است (۱۱و۱۰و۸و۶) که با نتایج حاصل از دوزهای بالاتر مطالعه حاضر تطابق دارد. اما اثرات بهتر آن در دوزهای پایین تر تا کنون مد نظر قرار نگرفته است.

کلومیفن القای تشکیل گیرنده های استروژنی و پروژسترونی را در بافت آندومتر مهار کرده و بدین ترتیب تکامل آن را مختل می نماید و این کاهش در سلو ل های غددی (اپی‌تلیال) بارزتر از سلول های استرومایی است (۸) که به نظر می رسد این اثر ناشی از اثر مستقیم آن خصوصاً در دوزهای بالاتر باشد که در تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید و قبلاً در مورد رگ زایی ناشی از کشت حلقه آئورتی و تغییرات سلول های آندوتلیال در محیط کشت در روش CAM گزارش شده است (۱۹و۱۸).

باتوجه به کاربرد وسیع کلومیفن سیترات در حدود نیم قرن گذشته، برخی معتقد به بازنگری در مصرف آن هستند و پایان دوران کلومیفن سیترات و جایگزینی آنرا با لتروزول یا دوز پایین FSH محتمل می دانند (۱۶). کلومیفن سیترات در دوز کمتر و دوره زمانی کوتاهتر اثر منفی بر مورفولوژی و تعداد سلول های استرومای آندومتر انسانی دارد، لذا استفاده از دوز کمتر و دوره درمانی کوتاهتر آن طی تحریک تخمک گذاری انسانی توصیه می شود. همچنین شناسایی اثرات کلومیفن سیترات در کشت سه بعدی بافت آندومتر در مطالعات بعدی مد نظر است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه جهت تامین هزینه انجام این تحقیق قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.2.1.5]

The Effect of Different Doses of Clomiphen Citrate on Morphology and Proliferation of Human Endometrial Stromal Cells in In-Vitro Culture

M. Khazaei (PhD) [1*], F. Chobsaz (MD) [1], S. Khazaei[2]

1. Fertility and Infertility Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
2. Dental Student, Dentistry Faculty, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Received: Sep 11th 2009, Revised: Dec 9th 2009, Accepted: Mar 10th 2010.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Clomiphene citrate is a drug which used for superovulation in infertile women. Despite increasing oocyte number, its pregnancy rate is low. Endometrial stromal cells have pivotal role in implantation events. The aim of present investigation was to determine the effect of different clomiphene citrate doses on morphology and proliferation of human endometrial stromal cell in in-vitro culture.

METHODS: In this experimental study, human endometrial biopsies (n=7) chopped in sterile condition and digested by enzymatic methods (collagenase). Stromal cell harvested after using cell strainer and centrifugation. Their viability and cell number were determined with Trypan blue staining. Stromal cells divided into four groups: control and cases: (1, 5 and 10 µM clomiphene). Control group received DMEM/F12 media supplemental with FBS (5%) and antibiotic and cases groups received same media with one dose of clomiphene citrate. Duration of study was two weeks and cells were photographed at beginning and the end of study. Finally cell collected enzymaticly by tripsin (0.25%) and their viability and cell number were determined.

FINDINGS: Morphological changes resembled in control and 1 µM groups and consist of oval cell transformation into large polyclonal fibroblast. 5 and 10µM doses of clomiphene citrate inhibit normal proliferation and morphological changes. There are significant differences between 5 and 10µM with control and 1µM groups ($p<0.001$).

CONCLUSION: Clomiphene citrate showed dose dependant effect on endometrial stromal cell and higher doses inhibit proliferation and morphological changes of these cells.

KEY WORDS: *Human endometrium, Stromal cell,Cell culture, Clomiphene citrate.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Fertility and Infertility Research Center, Medical School, Shahid Shiroodi Boulevard, Daneshgah St., Kermanshah, Iran
Tel: +98 831 4274617-21
E-mail: mkhazaei1345@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.2.1.5]

References

1. Hughes E Brown J, Collins JJ, Vanderkerchove P. Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. Cochrane Database of systematic review 2000;1:CD00057.
2. Lacin S, Vatanserver S, Kuscu NK, Koyuncu F, Ozbilgin K, Ceylan E. Clomiphen citrate dose not affect the secretion of α3, αV and β1 integrin molecules during the implantation window in patients with unexplained infertility. Hum Reprod 2001;16(11):2305-9.
3. Smruta S, Siladitya B. Clomiphen citrate- a review of its current status. J Obstet Gynecol Ind 2003;53(2):127-30.
4. Cowan BD. Adjunctive medical treatment in follicular stimulation. Reprod Med Rev 1999;7:27-36.
5. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wollf M. The human endometrium as a ferility –determining factor. Hum Reprod Update 2006;12(5):617-30.
6. Nelson LM, Hershlag A, Kurl RS, Hall JL, Stillman RJ. Clomiphen citrate directly impairs endometrial receptivity in the mouse. Fertil Steril 1990;53(4):727-31
7. Wu R, Zhou F, Zhou S. Morphometric studies of effects of Clomiphene citrate on histological characteristic of proliferative endometrium. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 1995;30(11):673-6.
8. Xia Y, Zhou F, Huang H. Effects of clomiphene citrate treatment on endometrial estrogen and progesterone receptors expression. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 1996;31(10):606-9.
9. Khazaei M, Fathi M, Ghorbani R. Comparison of three superovulation methods on number and weight of mouse pop. 11th congress on reproductive medicine, Feb 2005, Tehran, Iran. (in Persian)
10. Fathi M, Khazaei M, Ghorbani R, Pourmottabed A. Comparession of three superovulation methods in mice. 16th congress of Physiology and Pharmacology. May 2003; Tehran. Iran. (in Persian)
11. London SN, Young D, Caldito G, Mailhes JB. Clomiphene citrate induced perturbations during meiotic maturation and cytogenetic abnormalities in mouse oocytes in vivo and in vitro. Fertil Steril 2000;73(3):620-6.
12. Sereepapong W, Suwajanakorn S, Triratanachat S, et al. Effects of clomiphene citrate on the endometrium of regularly cycling woman. Fertil Steril 2000;73(2):287-91.
13. Kilic Okman T, Kucuk M, Altaner S. Comparison of the effects of letrozole and clomiphene citrate on ovarian follicles, endometrium, and hormone levels in the rat. Fertil Steril 2003;80(6):1330-2.
14. Bonhoff AJ, Naether OG, Johannisson E. Effects of clomiphene citrate stimulation on endometrial structure in infertile women. Hum Reprod 1996;11(4):844-9.
15. Hosie MJ, Stewart CM. Apoptosis is not altered by clomiphene citrate in pseudopregnant rat uteri. Acta Histochem 2006;108(2):105-16.
16. Homburg R. Clomiphene citrate--end of an era? A mini review. Hum Reprod 2005;20(8):2043-51.
17. Hosie MJ, Shaw TJ, Dwart DM, Murphy CR. Expression of glucosamine trisaccharides on the rat uterine surface is altered by clomiphene citrate. Acta Histochem 1999;101(4):383-96.
18. Gagliardi A, Collins DC. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. Cancer Res 1993;53(3A):533-5.
19. Gagliardi AR, Hennig B, Collins DC. Antiestrogens inhibit endothelial cell growth stimulated by angiogenic growth factors. Anticancer Res 1996;16(3A):1101-6.
20. Manolopoulos VG, Liekens S, Koolwijk P, et al. Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels. Gen Pharmacol 2000;34(2):107-16.
21. Esfandiari N, Khazaei M, Ai J, Nazemian Z, Jolly A, Casper RF. Angiogenesis following three-dimensional culture of isolated human endometrial stromal cells. International J Fertil Steril 2008;2(1):19-22.
22. Hosie MJ, Murphy CR. A scanning and light microscope study comparing the effects of clomiphene citrate, estradiol 17-beta and progestron on the strcture of uterin luminal epiyhelial cells. Eur J Morphol 1995; 33(1):33-50.
23. Elkind Hirsch KE, Phillips K, Bello SM, McNicho M, De Ziegler D. Sequential hormonal supplementation with vaginal estradiol and progesterone gel corrects the effect of clomiphene on the endometrium in oligo-ovualtory women. Hum Reprod 2002;17(2):295-98.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.2.1.5]

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1389.12.2.1.5]