اثر تاموکسیفن بر اووژنزدر موش های صحرایی ماده نژاد ویستار

زهرا کشتمند[۱*]، شهربانو عریان[۲]، کاظم پریور[۳]

چکیده

مقدمه و هدف: تاموکسیفن،آنتی استروژن غیراسترواییدی است که برای درمان سرطان پستان تجویز می گردد.برخی اثرات منفی این دارو بردستگاه تولید مثلی ، مشاهده گردیده است .مهمترین هدف این تحقیق،بررسی تاثیر تاموکسیفن براووژنز در موش های صحرایی ماده نژاد ویستارمی باشد.

مواد و روش ها : سه گروه از موش های صحرایی به وزن تقریبی۲۵۰ گرم به مدت ۳۰ روز با غلظت دارویی ۲۰۰، ۴۰۰ ،۶۰۰ میکروگرم بر کیلو گرم وزن بدن [تجربی۱،تجربی۲،تجربی۳] تاموکسیفن حل شده در حلال[اتانول۶۰٪ و سرم فیزیولوژی] را به صورت گاواژ دریافت نمودند. گروه شم با حلال گاواژگردید و گروه کنترل دارویاحلالی را دریافت نکرد. در روز اول و سیم پس از پایان دوره دریافت دارو، برش های تخمدان پس از رنگ آمیزی با روش هماتوکسیلین- ائوزین از لحاظ بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفت . تعداد زاده های ماده های گروه های تجربی که با نرها جفت گیری نمودند نیز تعیین گردید. نتایج مشاهده شده با روش آماری ANOVA- oneway ،تست Tukey، نرم افزار SPSS و تعیین انحراف معیار با شرط معنی دار بودن $P\leq0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در اولین نمونه برداری تعداد فولیکول اولیه ،فولیکول ثانویه ،فولیکول گرااف و تعداد جسم زرد در گروه های تجربی که تاموکسیفن را دریافت کردند ، در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد. ($P<0.001$)در نمونه برداری دوم،فولیکول گراف و تعداد جسم زرد درمقایسه با نمونه برداری اول ، افزایش یافت .همچنین تعداد زاده های ماده های گروه های تجربی کمتراز گروه کنترل بود. این یافته هاپیشنهاد می کند،احتمالا" تاموکسیفن توانایی تولید مثل را کاهش داده و تاثیر منفی بر اووژنز درموش های صحرایی ماده نژاد ویستاردارد.باقطع مصرف دارو برخی از تاثیرات منفی تاموکسیفن برتولید مثل به تدریج از بین می رود.

کلید واژه ها: تاموکسیفن، اووژنز، موش صحرایی.

مقدمه

تاموکسیفن (با نام تجاری Nolvadex) داروی غیراسترواییدی –آنتی استروژنی است که به طور گسترده برای درمان سرطان پستان تجویز می گردد. تاموکسیفن بسته به نوع اندام هدف و دوز مصرفی، دارای فعالیت آگونیستی– آنتاگونیستی است، ازاین رومتعلق به گروه داروهایی است که در اصطلاح به آن ها تعدیل کنندگان انتخابی رسپتوراستروژن می گویند[۱،۲،۳] .از جمله تاثیرات آنتاگونیستی تاموکسیفن می توان به عملکرد آن در بافت پستان اشاره کرد.تاموکسیفن به دلیل رقابتی که با استرادیول جهت قرار گرفتن برروی رسپتوراستروژن دارد مانع ازاتصال استرادیول برروی رسپتورشده وازسرطانی شدن بافت پستان جلوگیری می کند[۴ ،۵].در زنانی که در دوران یائسگی قرار دارند و مبتلا

۱*- دانشجوی دکترافیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران ccabaa@yahoo.com

۲- دکترای فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۳- دکترای تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

به استئوپورزمی شوند مصرف تاموکسیفن پیشرفت پوکی استخوان را کاهش می دهد این عملکرد تاموکسیفن، در زنانی که در دوران یائسگی قرار دارند تاثیر آگونیستی آن را نشان داده است [۶]. بررسی ها نشان داده ، تاموکسیفن تاثیر آنتاگونیستی برسیستم عصبی و تاثیر آگونیستی بر کبد، سیستم قلبی – عروقی و همچنین هر دو تاثیرآگونیستی- آنتاگونیستی را براندام تناسلی اعمال می کند[۷]. هدف از این تحقیق،بررسی تاثیر تاموکسیفن براووژنز است. در این مطالعه تعداد سلول های فولیکول اولیه ،ثانویه ،گرااف ،جسم زرد و تعداد زاده های ماده های گروه تجربی که بانرها جفت گیری کردند تعیین گردید.

مواد و روش ها

تعداد ۶۰ موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم در۵ گروه ۱۲ تایی تحت شرایط استاندارد با درجه حرارت ۱± ۲۵ و رطوبت ۵ ±۰ ۵ و سیکل شبانه روزی ۱۲ ساعت روز- ۱۲ ساعت شب نگهداری شدند. سه گروه از موش های صحرایی با غلظت دارویی ۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم برکیلو گرم وزن بدن به روش گاواژ تاموکسیفن حل شده در حلال را به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند. گروه شم تنها حلال را دریافت و گروه کنترل دارو یا حلالی را دریافت نکرد.پس از بررسی،از اتانول ۶۰٪ وسرم فیزیولوژی به عنوان حلال مناسب تاموکسیفن سیترات استفاده گردید.داروی تاموکسیفن سیترات به صورت پودر تهیه شد. هر۱۵/۲میکروگرم تاموکسیفن سیترات استفاده شده در این مطالعه به عنوان ماده اولیه دارو حاوی۱۰ میکروگرم تاموکسیفن خالص است، غلظت های استفاده شده در این آزمایش ۲۰۰،۴۰۰و ۶۰۰ میکروگرم برکیلوگرم وزن بدن در روز است که معادل دوز کمتر،مساوی و بیش ازمیزان دوز مصرفی تاموکسیفن بیماران مبتلا به سرطان پستان است.برای تهیه هر کدام ازغلظت های مورد نظرآزمایش(۲۰۰،۴۰۰و ۶۰۰ میکروگرم برکیلوگرم وزن بدن در روز) به روش زیر عمل می شود:

$$X=\frac{\text{غلظت مورد نظر از دارو برای گاواژ}(\mu g/kgbw/day)\times \text{ماده اولیه}(\mu g)}{\text{ماده خالص}(\mu g)} \quad (۱)$$

مقدار ماده اولیه حاوی تاموکسیفن خالص که برای تهیه این غلظت استفاده می شود=X

حال اگر بخواهیم غلظت مورد نظر از تاموکسیفن را به ازای هر کیلو گرم وزن بدن برای یک موش صحرایی بر حسب وزن تهیه نماییم به روش زیر عمل می کنیم:

$$Y=\frac{X(\text{به دست آمده از فرمول (۱)})\times \text{وزن حیوان}(gr)}{۱۰۰۰(gr)} \quad (۲)$$

Y= مقدار ماده اولیه حاوی تاموکسیفن خالص که براساس وزن به موش به صورت گاواژ خورانده می شود

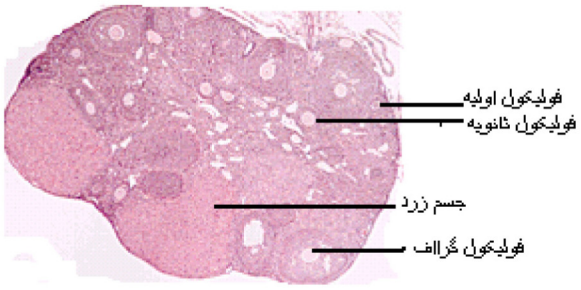
این وزن از دارورا درحلالی به حجم ۰/۴ میلی لیتر(حاوی۰۵/ ۰ میلی لیتر اتانول ۶۰٪+ ۰/۳۵ میلی لیترسرم فیزیولوژی) ریخته و به کمک همزن دارو را کاملا" درحلال حل می نماییم. این محلول ،۴۰ واحد از سرنگ انسولینی را شامل می شود. (الکل استفاده شده بسیارناچیز بوده ،داروبا کمک همزن درحلال حل می گردد.الکل بخار شده وتاثیری بر بافت مورد بررسی نخواهد داشت)دارو با غلظت های متفاوت به مدت ۳۰ روز، هر روز بعد ازاندازه گیری وزن موش با روش گاواژ به موش ها خورانده شد.

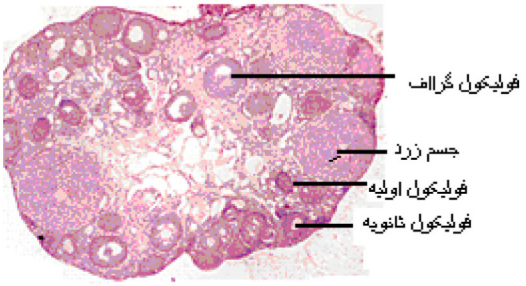
درنمونه برداری اول, تعداد ۶ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به صورت تصادفی یک روز پس از دریافت دارو جدا نموده آنها را با کلروفرم بیهوش کرده ،ناحیه شکم را شکافته و تخمدان را خاج کرده در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت و برای مطالعه مورفولوژیکی،آبگیری وبرای قالب گیری درپارافین قرار داده،سپس برش هایی با ضخامت ۶ میکرون تهیه وبا روش هماتوکسیلین- ائوزین جهت بررسی میکروسکوپی رنگ آمیزی شدند. لام های تهیه شده به وسیله میکروسکوپ نوری دو چشمی(Olympus ژاپن) مشاهده و تعداد سلول های اووژنتیک شمارش شد. نمونه برداری دوم سی روز پس ازدریافت دارودرگروه های باقی مانده انجام و همانند نمونه برداری اول برش ها تهیه وتعداد سلول ها شمارش گردید.نتایج آماری با استفاده از نرم افزار۱۱ SPSS و با بهره گیری ازآزمون ANOVA- oneway ،تستTukey تحلیل و هیستوگرام های مربوطه توسط نرم افزار Excel رسم شد.نتایج با شرط $P\leq 0.05$ معنی دار بود.

یافته ها

نتایج به دست آمده از تیمار موش های صحرایی به مدت ۳۰ روز با غلظت دارویی ۲۰۰ ،۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن درروز دراولین نمونه برداری یک روزپس ازدریافت دارو با استفاده از روش آماری ANOVA- oneway ، کاهش تعداد سلول های فولیکول اولیه ، ثانویه و گراف و جسم زرد در گروه های تجربی را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. (شکل ۱) اختلاف معنی داری در گروه های دریافت کننده دارو با غلظت مختلف مشاهده شد.کمترین تعداد سلول های اووژنتیک شمارش شده درگروه تجربی ۳ که غلظت ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز تاموکسیفن را دریافت نمودندنشان داده شد($P<0.001$). در دومین نمونه برداری ،۳۰ روز پس از پایان مدت زمان دریافت دارو، تعداد سلول های اووژنتیک در موش های صحرایی گروه های آزمایشی شمارش شد که ،در مقایسه با نمونه برداری اول افزایش نسبی را نشان داد(نمودارهای۵-) (جدول۲-۱)

جهت بررسی تعداد زاده ها علاوه بر۶۰ سرموش آزمایش حدود ۲۰ سر موش صحرایی در ۵ گروه ۴ تایی، دارو را با همان غلظت ها به مدت ۳۰ روز دریافت کردند.پس از پایان دوره دریافت دارو،درهر قفس موش ماده، موش نری که دارویی دریافت نکرده بود قرارداده بعد از جفت گیری موش نر با ماده و گذشت دوران بارداری ماده ها ،تعداد زاده های ماده های گروه های آزمایش تعیین گردید. تعداد زاده ها در گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود،کمترین تعداد در گروه تجربی ۳ نشان داده شد($p<0.001$)(نمودار۷، جدول ۳).



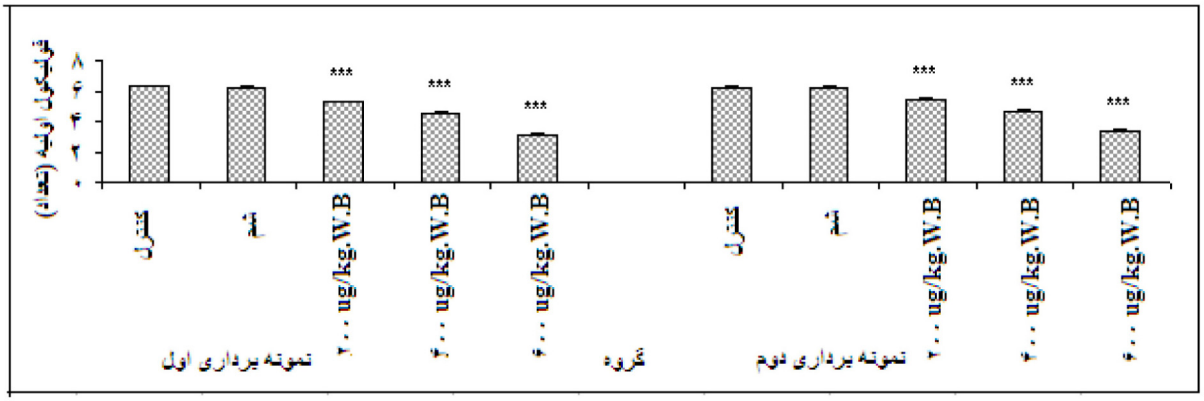


گروه کنترل

گروه تجربی ۳ ،غلظت دارویی ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم

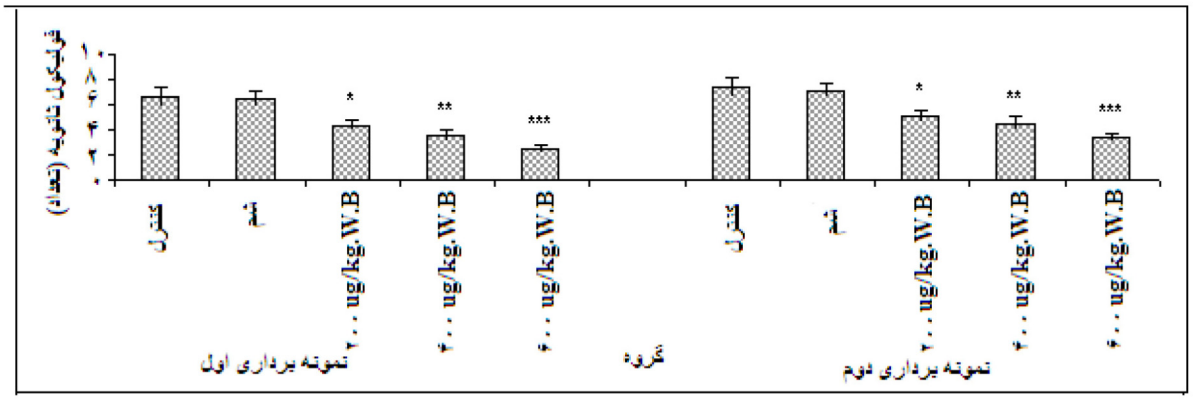
وزن بدن در روز را دریافت نمودند .

شکل۱- مقایسه تعداد سلول های اووژنتیک در گروه های تجربی ۳ با گروه کنترل(بزرگنمایی تصاویر× ۳۰)



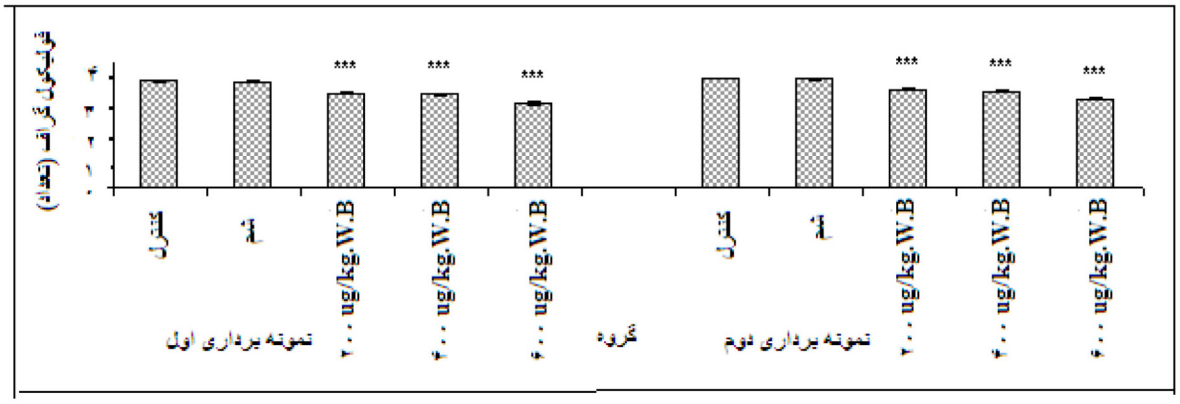
***:P<0.001

نمودار۱- مقایسه تاثیر تاموکسیفن با غلظت های kg B.W /۲۰۰،۴۰۰و ۶۰۰ بر تعداد فولیکول اولیه در نمونه برداری اول و دوم در گروه های آزمایشی.



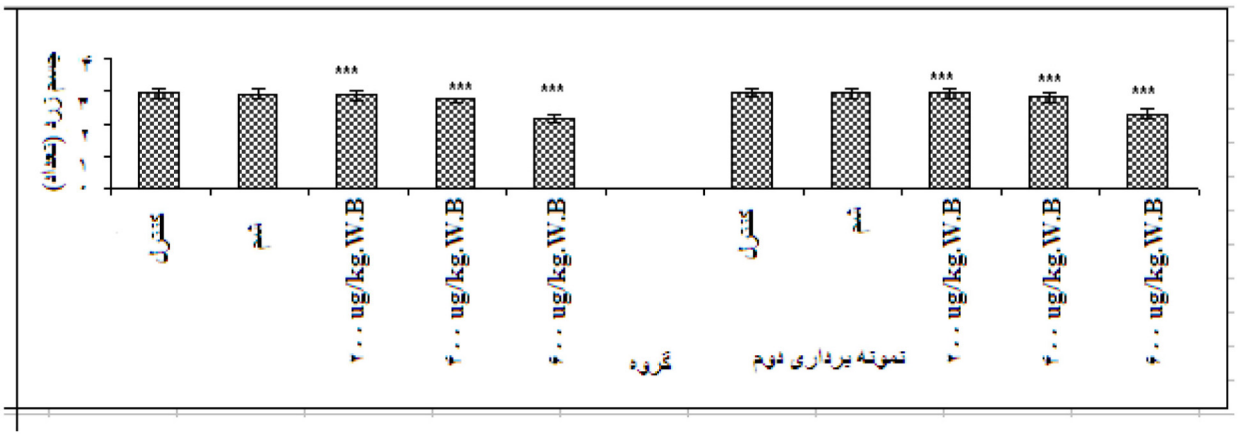
***:P<0.001
**:P<0. 01

نمودار۲- مقایسه تاثیر تاموکسیفن با غلظت های µg/kg B.W ۴۰۰،۲۰۰و ۶۰۰ بر تعداد فولیکول ثانویه در نمونه برداری اول و دوم در گروه های آزمایشی.



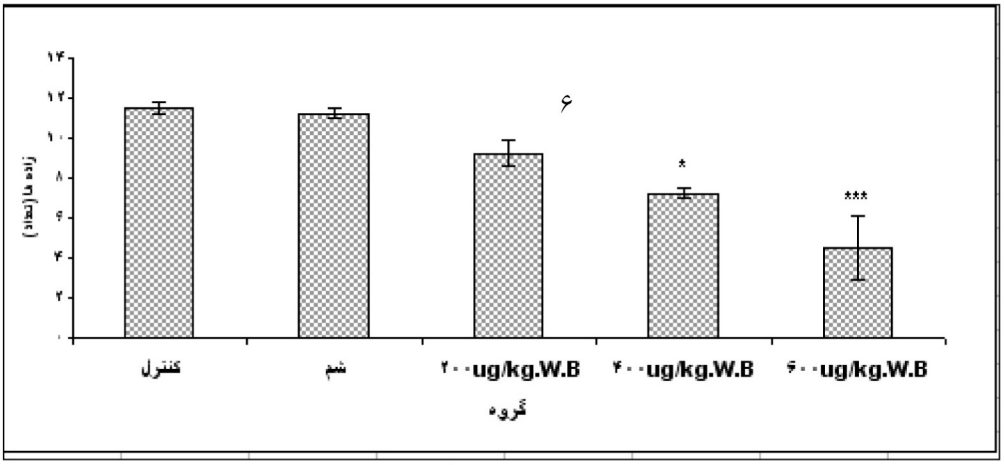
***:P<0.001

نمودار۳- مقایسه تاثیر تاموکسیفن با غلظت های µg/kg B.W ۴۰۰،۲۰۰و ۶۰۰ بر فولیکول گرااف در نمونه برداری اول و دوم در گروه های آزمایشی.



***:P<0.001

نمودار۴- مقایسه تاثیر تاموکسیفن با غلظت های µg/kg B.W ۲۰۰،۴۰۰و ۶۰۰ بربر تعدادجسم زرددر نمونه برداری اول و دوم در گروه های آزمایشی .



*: p<0.05

***:P<0.001

نمودار۵- تاثیر تاموکسیفن با غلظت دارویی ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن برتعداد زاده های گروه های آزمایشی.

جدول۱-مقایسه میانگین تعداد فولیکول های اولیه و ثانویه درگروه های آزمایشی در نمونه برداری اول و دوم.

نمونه برداری / گروه	تعداد فولیکول اولیه (اول) MS±SE	P-value	فولیکول اولیه (دوم) MS±SE	P-value	فولیکول ثانویه (اول) MS±SE	P-value	فولیکول ثانویه (دوم) MS±SE	P-value
کنترل	۵/۹±۰/۵	۰/۹۸	۶/۲۵ ±۰/۴۶	۰/۹۳	۶/۱۵ ±۰/۷۳	۰/۱۳	۶/۲۰ ±۰/۶۳	۰/۱۰
شم	۵/۶ ±۰/۳۱	۰/۹۸	۵/۹۷±۰/۲۷	۰/۹۳	۵/۹۳±۰/۱۵	۰/۱۳	۶/۰۱± ۰/۲۶	۰/۱۰
تجربی۱	۳/۰۰ ±۰/۴۷	***	۳/۱۷ ±۰/۲۳	***	۴/۰۸±۰/۲۹	*	۴/۶۰ ±۰/۲۹	*
تجربی۲	۱/۲۳ ±۰/۳۲	***	۱/۷ ۰±۰/۲۶	***	۱/۸۰ ± ۰/۵۵	**	۱/۸۹ ±۰/۲۳	**
تجربی۳	۱/۰۰ ±۰/۲۹	***	۱/۳±۰/۲۱	***	۱/۶۲ ±۰/۳۰	***	۱/۸۴ ±۰/۲۳	***

جدول۲-مقایسه میانگین تعداد فولیکول گرااف و جسم زردگروه های آزمایشی در نمونه برداری اول و دوم.

نمونه برداری / گروه	فولیکول گرااف (اول) MS±SE	P-value	فولیکول گرااف (دوم) MS±SE	P-value	جسم زرد (اول) MS±SE	P-value	جسم زرد (دوم) MS±SE	P-value
کنترل	۲/۷۷±۰/۱۵	۰/۹۹	۳/۰۶±۰/۱۶	۰/۹۹	۳/۵۰ ±۰/۴۱	۰/۹۹	۳/۸ ±۰/۳۳	۰/۹۵
شم	۲/۶۰ ±۰/۹۷	۰/۹۹	۳/۰۰±۰/۲۱	۰/۹۹	۳/۳۰±۰/۱۳	۰/۹۹	۳/۷±۰/۲۷	۰/۰۹۵
تجربی۱	۲/۰۰±۰/۲۰	***	۲/۱۱ ±/۱۸	***	۲/۳۲±۰/۲۱	***	۲/۵ ±۰/۱۶	***
تجربی۲	۱/۲۲ ±۰/۱۵	***	۱/۵۰±/۱۶	***	۱/۵ ±/۱۶	***	۲/۰۰ ±۰/۲۱	***
تجربی۲	۱/۰۰ ±۰/۱۵	***	۱/۲۰±/۲۰	***	۰/۸ ±/۲۰	***	۱/۳ ±۰/۱۶	***

*: p<0.05 ،**:P<0. 01 ***:P<0.001

جدول۳-مقایسه میانگین تعداد زاده های ماده ها در گروه های آزمایشی .

نمونه برداری / گروه	تعداد زاده MS±SE	P- value
کنترل	۱۱/۵±۰/۲۸	۰/۹۹
شم	۱۱/۲۵±۰/۲۵	۰/۹۹
تجربی۱	۹/۲۵±۰/۶۲	۰/۲۱
تجربی۲	۷/۲۵±۰/۲۵	*
تجربی۳	۴/۵±۱/۵۵	***

***:P<0.001 ،*: p<0.05

بحث

درمطالعات قبلی، بررسی تاثیرتاموکسیفن برلایه اندومتریوم درحیوانات آزمایشگاهی مختلف نشان داده شده است، اساس این تحقیق بررسی تاثیر تاموکسیفن تعداد سلول های فولیکول اولیه ، ثانویه ، گرااف و جسم زرد بود.نتایج مطالعات قبلی پیشنهاد می کند،استرادیول به واسطه نوع رسپتوری که درسلول فعال می کند اعمالی را درمیتوکندری به راه می اندازد که در نهایت موجب تحریک تقسیم سلولی ومهارآپوپتوزیس می گردد[۸].همچنین تاموکسیفن و۴-هیدروکسی تاموکسیفن ترکیباتی هستند که با توجه به میزان دوز مصرفی(پایین یا بالا)مسیر مرگ سلولی خاص خود را فعال می کنند.دردوزهای بالا تاموکسیفن و۴- هیدروکسی تاموکسیفن که عمل آن ها مستقل ازرسپتورهای استرادیولی است ،باعث افزایش تولید اکسیژن واکنشی شده ،منجربه فعال نمودن مسیراکسیداتیوشده وبا فعال کردن پروکاسپاز- ۹ و به دنبال آن پروکاسپاز-۳ مسیر آپوپتوزیس را به راه می اندازد، درحالی که مسیر آپوپتوزیس در دوزهای پایین تاموکسیفن و۴- هیدروکسی تاموکسیفن، مربوط به رقابت این ترکیبات با استرادیول جهت قرارگرفتن بررسپتوراسترادیول بوده،رونویسی پروتئینBax را افزایش داده ،این پروتئین را به درون میتوکندری آزادنموده و مرگ سلولی را به راه می اندازد[۹].همچنین تاموکسیفن از طریق فاکتورهای رشد میانجی مانندTGF- αوTGF- ß با فعالیت میتوزی استرادیول رقابت کرده و از فعالیت وعملکرداسترادیول جلوگیری می کند[۱۰]. ممانعت از اعمال وابسته به استرادیول مانندتخمک گذاری در مدل های حیوانی مختلف به وسیله تاموکسیفن نیزمشاهده شده است.توانایی تاموکسیفن برای جلوگیری از اعمال وابسته به استرادیول به علت توانایی این ترکیب دررقابت با استرادیول جهت اتصال به رسپتورهای استرادیول در بافت های متعدد است[۱۱].تغییرات مختلف ایجاد شده درسطح گنادوتروپین (کاهش LH) به وسیله تاموکسیفن از طریق جلوگیری از فعالیت آروماتازاست.آروماتاز آنزیم است که درتبدیل آندروستندیون وتستوسترون به استرادیول نقش دارد.مصرف تاموکسیفن مانع از عملکرد این آنزیم شده که نتیجه آن کاهش میزان استرادیول بود، به این دلیل تاموکسیفن درسطح محورهیپوتالاموس–هیپوفیز– تخمدان ازمکانیسم فیدبک

مثبت ممانعت کرده واز طریق کاهش هورمون ها از تخمک گذاری جلوگیری می نماید [۱۲].Activin یکی از پروتئین هایی است که،توسط هیپوفیزساخته می شود.درشرایط عادی Activin پس از ساخته شدن باعث تحریک هورمون های گنادوتروپین شده که در نهایت باعث افزایش ساخته شدن استرادیول و پروژسترون از تخمدان می شود.زمانی که تاموکسیفن و یا داروهای متعلق به گروه تعدیل کنندگان انتخابی رسپتوراستروژن استفاده شود پروتئین دیگر به نام Follistatinکه توسط غده هیپوفیز تولید شده به پروتئین *Activin*متصل ومانع ازفعالیت پروتئین *Activin* و در نهایت ساخته شدن هورمون های استرادیول و پروژسترون می گردد[۱۳،۱۴]. باتوجه به اهمیت هورمون های استرادیول و پروژسترون برتعداد سلول های اووژنزومشاهده کاهش این هورمون ها درمطالعات قبلی، نتایج به دست آمده از کاهش تعداد سلول های فولیکولی و جسم زرد دراین مطالعه راتایید می کند.همچنین جلوگیری ازساخته شدن هورمون استرادیول و پروژسترون با توجه به اهمیت این هورمون ها در تخمک گذاری و باروری، خود به عنوان عاملی برای کاهش تعداد زاده های گروه های تجربی می باشد. نتایج به دست آمده از بررسی های *Philip* وهمکاران درجوندگان نشان داده،مصرف تاموکسیفن به مقدار۰/۴۲گرم بر کیلوگرم به مدت دو ماه تاثیر منفی برتواژن واندومتریوم رحم و بافت تخمدان شده،اگرچه با قطع مصرف تاموکیسفن به مدت ۳،۱ و۹ ماه سطح آسیب های ایجادشده به تدریج کاهش می یابد.نتایج به دست آمده از نمونه برداری اول ودوم در این بررسی پس از پایان مصرف دارو، مشابه بررسی های انجام شده درجوندگان است[۱۵].تحقیقات انجام شده در بین راسوهای ماده ای که تاموکسیفن را درغذای روزانه خود دریافت نمودند نشان می دهد که ،این ماده ها دچار عفونت رحم وآتروفی تخمدن شده اند، همچنین قدرت جفت گیری ماده ها با نرها وتعداد زاده های آن ها کاهش یافته است[۱۶]. دروزغ های ماده *Bufo viridi* که تاموکسیفن با دوز ۸ و۵/۱ میلی گرمی را درزمان شروع دوره تولید مثل دریافت نمودند تاثیرمنفی برساختار اویداکت وتعداد زاده های آن ها مشاهده شده است [۱۷]. مطالعات دیگرنشان داده،مصرف۳ میلی گرم برکیلوگرم وزن بدن در روز تاموکسیفن به مدت ۱۲ روزقبل ازجفت گیری درمیمون های*Macca radiata* تاثیرضد بارداری را نشان داده است[۱۸].نتایج حاصل از شمارش تعداد زاده های گروه های تجربی این تحقیق که، دارو را با غلظت های متفاوت۲۰۰،۶۰۰،۴۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن درروز دریافت نمودندبا نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی مشابه است.اختلاف معنی داردر، غلظت های۴۰۰و۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن درروز مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری

از نتایج به دست آمده چنین تتیجه می شود که ، مصرف تاموکسیفن با غلظت دارویی ۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم برکیلوگرم وزن بدن درروزدرمدت زمان ۳۰ روز تاثیر منفی برساختار تخمدان و تعداد سلول های فولیکول اولیه ،ثانویه گرااف، جسم زرد و قدرت باروری درموش های صحرایی نژاد ویستارداشته است ،اگرچه ،با قطع مصرف دارو تاثیرمنفی آن بر فاکتور های اندازه گیری شده به تدریج تا حدودی کاهش می یابد.از این رو پیشنهاد می گردد با توجه به نتایج به دست آمده پزشکان در زمان تجویز داروی تاموکسیفن به بیماران دقت داشته ومیزان دوز مصرفی و مدت زمان تجویز و استفاده از دارو را مورد توجه قراردهند.

تشکر و قدردانی

از گروه زیست شناسی و مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه علوم و تحقیقات جهت مساعدت درا نجام این پروژه تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع

1-Fentiman PS,Fourquet A.(2006),Hortobagyi PN.Male breast cancer.J The lancet; 367[9510]595-604.

2-Lewis JS,Jordan VC.(2005).Selective estrogen receptor modulators (SERM):mechanism of anticarcinogenesis and drug resistance. J Mutant.591(1-2)247-263.

3.Smith L,O'Mally BW.(2004).Coregulator function;Aky to understanding tissue specificity of selective estrogen receptor modulators. J Endocrine Review .265(1): 45-71.

4.Jensen EV,Jordan VC.[2003]. The estrogen receptor. J Clinical Cancer Research. 9:1980-1989.

5- McNeilly AS, Crawford JL, Taragnat C, Nicol L, McNeilly JR.(2003). The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. J Reproduce Suppl. 61: 463–476.

6-Michae lH,Harkonen PL,Kangas.L.(2007).Differential effects of selective estrogen receptor modulators tamoxfien ,oesemifene and raloxifen on human oesteoclats in vitro.J pharmacology.57:215–224.

7-Turgeon JL,Carr MC,Maki PM,Mendelsohn ME,Wise PM.(2006).Complex actions of sex steroids in adipose tissue,the cardiovascular system,and brain: insights from basic science and clinical studies.J Endocrine Review. 27:575–605.

8-Chen JQ,Yager JD.(2005).Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens /estrogen receptors and potential physiological patho physiological implication.J Molecellular cell Research.1746:1-17.

9- Yigael D, Beyth Y.(2007).Ultrasonographic evaluation of the endometrium and correlation with endometrial sampling in postmenopausal patients treated with tamoxifen.J Ultrasound Medicine .12: 275-280.

10 -Butta A ,Maclennan K ,Flanders KC.(1992).Induction of transing tamoxifen growth factor ß1 in human breast cancer in vitro following tamoxifen treatment.J Cancer.52:4261-4264.

11-Philip C,Richard EE,Barbara M,Nolan E,Martin A,Lewis L.(1998).Tamoxifen associated uterine pathology in rodents: relevance toWomen .J Carcinogenesis 1577-1582.

12-Mitwally MFM,Casper RF.(2004).Aromatase inhibition decreases FSH dose needed during controlled ovarian hyper stimulation: a controlled prospective trial. Soc Gynecology Invest; ,11(6) :406–415.

13-Baratta M, West LA, Turzillo AM, Nett TM.(2001).Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary ells. J Biological Reproduce .64:714–719.

14-DePaolo LV. (1997).Inhibins,activins, and follistatins:the saga continues.Proc Soc Exp J Biological Medicine. 214: 328–339.

15-Obrero MY,Shapiro DJ.(2002) .Estrogen receptor- dependent and estrogen receptor – in dependent pathway for tamoxifen and 4-hydroxitamoxifen –induced programmed cell death.J Biological. 277;45695-45703.

16−Shouqi L, Ce´line M, Antigone S, Sylvain G1, Yves ME, Alain B, Claude L, Fernand L.(1997).Comparative effects of 28-day treatment with the new anti-estrogen em-800 and tamoxifen on estrogen-sensitive parameters in intact mice Int. J. Cancer;73: 381–391.

17-Yang HH,Aluerich RJ,Helferich W,Yamini B,Chou KC,Miller ER,Bursian SJ.(1995).Effect of zearalenone and or tamoxifen on Bofu and Mink reproduction.J Apple Toxicol.15(3):223-232.

18−Ravindranath,NRMoudgal.(1995).Antifertility effect of tamoxifen as teasted in the female bonnet monkey(Macaca radiata).J Biosci.167-170.