

موفقیت بارداری بدنبال مصرف متفورمین در بیماران با سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) تحت درمان با ART

مهتاب زینال زاده (M.D.)^۱، اشرف آلیاسین (M.D.)^۲، مرضیه آقاسینی (M.D.)^۲.

۱-استادیار، گروه زنان و زایمان، بیمارستان شهید یحیی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بابل، بابل، ایران.

۲-استادیار، گروه زنان و زایمان، بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

ناباروری با شیوع حدود ۱۵٪ یکی از مشکلات عمده جامعه بوده که گاهی در طولانی مدت تداوم زندگی خانوادگی را تهدید می‌کند. یکی از شایعترین علل ناباروری در زنان، علل تخمدانی به خصوص سندرم تخمدان پلی کیستیک می‌باشد. از آنجائیکه در این بیماران متفورمین از طریق کاهش سطح انسولین ممکن است سبب بهبود تعداد و کیفیت تخمکها و افزایش میزان باروری گردد، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر متفورمین در بهبود پاسخ بیماران سندرم تخمدان پلی کیستیک در سیکل ART صورت گرفت. این مطالعه به صورت کلینیکی-تصادفی بر روی ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک، به بیمارستان شریعتی شهر تهران در طی سال ۷۹-۱۳۷۸ انجام شد. افراد بر اساس معیارهای ورود به مطالعه، به دو گروه (A، ۴۴ نفر و B، ۴۶ نفر) به صورت تصادفی تقسیم شدند و ۱۰ بیمار به دلیل عدم استفاده صحیح از داروها از مطالعه حذف گردیدند. در گروه A علاوه بر پروتکل بلندمدت برای تحریک تخمک‌گذاری، متفورمین با دوز ۵۰۰mg سه بار در روز تجویز شد و یافته‌ها با استفاده از شاخصهای آماری و آزمون آماری t-test و مجذور کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $P < 0/05$ معنی‌دار تلقی شد. نتایج نشان داد سطح استرادیول در گروه A بطور متوسط $2159 \pm 1056 \text{ pg/ml}$ و در گروه B $2842 \pm 1050 \text{ pg/ml}$ بود و اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P = 0/002$). میزان HMG مصرفی در گروه A $23 \pm 7/6$ آمپول و در گروه B $31/34 \pm 8/12$ آمپول بود و بین دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P = 0/001$). تعداد تخمک‌ها اختلاف معنی‌دار نداشتند، ولی از نظر تعداد تخمک‌های نارس (ژرمینال و زیگل) اختلاف معنی‌دار بوده است ($P = 0/047$). از نظر طول مدت درمان، تعداد تخمک و تعداد بارداری اختلاف معنی‌دار بین دو گروه دیده نشد. بنابراین با توجه به یافته‌های فوق متفورمین قادر خواهد بود از طریق کاهش میزان مقاومت به انسولین و هیپرآندروژنیسم در افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک سبب کاهش واضح در سطح استرادیول سرم و میزان HMG مصرفی در این بیماران شده و در بهبود کیفیت تخمکها تأثیر می‌گذارد.

کل واژگان: متفورمین، ناباروری، سندرم تخمدان پلی کیستیک و روشهای کمک باروری.

آدرس مکاتبه: دکتر مهتاب زینال‌زاده، ترک محله، مرکز ناباروری فاطمه زهرا، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بابل، بابل، ایران.

پست الکترونیک: zeinalmahtab@yahoo.com

مقدمه

ناباروری نه تنها به عنوان یک بیماری بلکه به عنوان یک مسئله جدی تأثیرگذار بر زندگی خانوادگی می‌تواند به بهداشت خانوادگی جامعه صدماتی وارد کند (۱).

شیوع ناباروری حدود ۱۵٪ می‌باشد. در حدود ۴۰-۳۰٪ از علل ناباروری زنان مربوط به اختلال عملکرد تخمدان می‌باشد و شایع‌ترین این علل اختلال سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS)^۱ می‌باشد که تظاهرات آن بصورت ناباروری، الیگومنوره^۲ یا آمنوره^۳، هیرسوتیسم^۴، آکنه و چاقی می‌باشد (۱). در سندرم به علت افزایش استروژن و به احتمال زیاد با کاهش غلظت SHBG^۵، حساسیت هیپوفیز و هیپوتالاموس تغییر کرده و در نتیجه سطح هورمون LH بالا و هورمون FSH پائین می‌باشد. ۴۰٪ از خانمهای مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک دارای LH بالا و ۳۰٪ آنها تستوسترون بالا دارند و با اینکه افزایش ترشح استرادیول وجود ندارد میزان استرادیول آزاد افزایش می‌یابد (۲). سطح پرولاکتین بالا در ۱۵٪ بیماران وجود دارد که در یک سوم آنها با استفاده از تکنیک MRI^۶ آدنوم تشخیص داده شده است (۳).

یافته مهم دیگر بالا بودن سطح انسولین است. چاقی مرکزی ارتباط زیادی با این افزایش دارد و حتی در خانمهای غیرچاق هم افزایش غلظت انسولین وجود دارد (۴). مکانیسم‌های مختلف جهت مقاومت به انسولین عبارت از: مقاومت بافت محیطی هدف، کاهش پاک‌سازی کبد و افزایش حساسیت کبد می‌باشد (۵).

انسولین بالا به سه طریق باعث افزایش سطح آندروژنها می‌شود: ۱- با اثر بر روی گیرنده انسولینی که سبب تشدید پاسخ آندروژنی سلولها تکا به LH می‌شود، ۲-

کاهش ساخت SHBG در کبد و ۳- کاهش ساخت پروتئین متصل‌شونده به IGF^۷ (۶).

از طرفی بین میزان انسولین پلاسما و فشارخون و افزایش در سطح تری‌گلیسریدها و کاهش سطح کلسترول - HDL رابطه مستقیم وجود دارد (۷). اولین قدم درمانی برای این بیماران کاهش وزن می‌باشد. به علت عوارض کلومیفن نمی‌توان بطور طولانی مدت از آن استفاده کرد. در درمان این بیماران از FSH نیز استفاده شده و جهت بهبود پاسخ درمانی دگزامتازون و بروموکریپتین در مواردی اضافه می‌گردد (۸).

اخیراً با توجه به مشاهده افزایش سطح انسولین سرم در این بیماران، مصرف داروهای پائین‌آورنده قندخون از جمله متفورمین پیشنهاد شده است. متفورمین با مکانیسم‌هایی از جمله مهار گلوکونئوژنز در کبد، تحریک برداشت محیطی گلوکز و تاخیر در برداشت گلوکز از دستگاه گوارش سبب کاهش سطح انسولین، LH و آندروژن تخمدان می‌شود (۹). درمان با متفورمین (۵۰۰ میلی‌گرم سه بار در روز) سبب کاهش سطح انسولین سرم، سطح پایه LH و غلظت تستوسترون آزاد در خانمهای مبتلا به PCOS می‌شود (۱۰). از عوارض بسیار نادر متفورمین اسیدوز لاکتیک بوده که همه این موارد در افراد با بیماری داخلی پیشرفته از جمله سپسیس^۸ و نارسایی قلبی و کلیوی گزارش شده بنابراین متفورمین در بیماران با تستهای کلیوی غیر طبیعی نباید استفاده شود (۱).

متفورمین با بهبود تعداد و کیفیت تخمک‌ها، همراه با کاهش میزان OHSS^۹ میزان بارداری را افزایش می‌دهد (۱۱). این مطالعه نیز به همین منظور طرح‌ریزی شده و در آن اثرات متفورمین در میزان بارداری و تعداد و کیفیت تخمکها و سطح استرادیول خون در افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک مورد بررسی قرار گرفت.

7-Insulin Lick Growth Factor

8-Sepsis

9-Overhyper Stimulation Syndrome

1-Polycystic Ovarian Syndrome

2-Oligomenorrhea

3-Amenorrhea

4-Hirsutism

5-Sex Hormone Binding Globulin

6-Magnetic Resonance Imaging

جدول ۱- خصوصیات بالینی و پروفایل هورمونی در دو گروه افراد مبتلا به PCOS قبل از درمان

متغیر	گروه A (n=۴۴) M±SD	گروه B (n=۴۶) M±SD	P Value
سن (سال)	۲۸/۶۸±۳/۰۹	۲۹/۴۵±۳/۷	P>۰/۰۵
BMI (kg/m ²)	۲۷/۲۲±۵/۴۳	۲۷/۹۲±۴/۲۱	P>۰/۰۵
طول مدت ناباروری (سال)	۶/۷۵±۲/۷۵	۸/۲۶±۴/۲۱	P>۰/۰۵
سطح سرمی LH (mIU/ml)	۴/۷۶±۹/۲۶	۴/۱۰±۶/۹	P>۰/۰۵
سطح سرمی FSH (mIU/ml)	۴/۵۵±۲/۳۲	۴/۸۲±۳/۰۶	P>۰/۰۵
LH/FSH	۲/۴۶±۱/۲۲	۲/۴۳±۱/۳۵	P>۰/۰۵
سطح سرمی پروژسترون (pg/ml)	۰/۷۲±۰/۴	۰/۷۵±۰/۵	P>۰/۰۵

مواد و روشها

این مطالعه به صورت کلینیکی-تصادفی بر روی ۱۰۰ خانم مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک مراجعه کننده به بخش ناباروری بیمارستان شریعتی شهر تهران از اردیبهشت ماه سال ۱۳۷۸ تا فروردین ۱۳۷۹ جهت درمان ناباروری از طریق روشهای ART، انجام گرفته است.

معیارهای ورود به مطالعه: ۱-بیماران نابارور PCOS (تشخیص PCOS بر اساس وجود علائم بالینی اصلی اولیگومنوره یا آمنوره با دو مورد یافته های زیر: الف) $LH/FSH > 2$ ، ب) شواهد سونوگرافیک دال بر تخمدان پلی کیستیک و ج) شواهد لاپاراسکوپی دال بر تخمدان پلی کیستیک)

۲-طبیعی بودن TSH، پرولاکتین و ۱۷هیدروکسی پروژسترون

۳- تستهای طبیعی کبد و کلیه.

در تمام بیماران آزمایشات LH،FSH، استرادیول، پروژسترون، TSH و پرولاکتین به روش RIA^۱ اندازه گیری شده و لاپاراسکوپی (Olympus PINE-C Germany) تشخیصی جهت بررسی وضعیت لوله های

رحمی و تخمدانها انجام شده است. افراد دارای مشکلات

کلیوی، کبدی، قلبی، دیابت یا تست تحمل گلوکز (GTT)^۲ مختل نیز از مطالعه حذف شدند.

بیماران بطور تصادفی براساس جدول اعداد تصادفی به دو گروه مورد (A) و شاهد (B) تقسیم شدند. ۶ نفر از گروه A و ۴ نفر از گروه B بدلیل عدم مصرف صحیح دارو از مطالعه حذف شدند. به جز مصرف متفورمین درمان در دو گروه مشابه بود. به همه افراد تحت مطالعه اثرات مثبت و عوارض احتمالی متفورمین توضیح داده شده و از آنها رضایتنامه شرکت در مطالعه اخذ گردید.

به هر دو گروه طبق پروتکل بلندمدت^۳ از روز سوم سیکل قاعدگی روزانه یک قرص LD به مدت ۲۱ روز آمپول سوپرفکت روزانه ۵۰۰ میکروگرم از روز ۲۱ سیکل و ادامه آن با دوز روزانه ۲۵۰ میکروگرم همراه با شروع HMG^۴ تجویز شد (۹). در گروه A همزمان با شروع LD، متفورمین با دوز ۵۰۰ میلی گرم سه بار در روز تا روز تزریق HCG^۵ داده شد. سپس در هر دو

2-Glucose Tolerance Test

3-Long protocol

4-Human Menopausal Gonadotropin

5-Human Chorionic Gonadotropin

1-Radioimmunoassay

جدول ۲- مقایسه نتایج درمانی در دو گروه افراد مبتلا به PCOS به دنبال دریافت (گروه A) و عدم دریافت (گروه B) متفورمین

متغیر	گروه A (n=۴۴) M±SD	گروه B (n=۴۶) M±SD	P Value
دوز روزانه HMG (عدد آمپول)	۲/۵۹±۰/۷۲	۳/۴۱±۰/۷۱	۰/۰۰۱
دوز نهائی HMG (عدد آمپول)	۲۳±۷/۶۸	۳۱/۳۴±۸/۱۲	۰/۰۰۱
طول درمان با HMG (روز)	۹/۱۳±۱/۶۳	۹/۱۷±۱/۴۵	۰/۸۷
تعداد اووسیت	۸/۹۱±۴/۲۹	۹/۱۱±۴/۲۴	۰/۸۲۵
تعداد ژرمینال وزیکول (GV)	۱/۱۸±۱/۳	۱/۷±۱/۴	۰/۰۴۷
تعداد اووسیت در متافاز I	۲±۱/۴۸	۲/۲±۱/۴۵	۰/۵۴۹
تعداد اووسیت در متافاز II	۵/۸۹±۳/۱۳	۵/۲۲±۳/۱۳	۰/۲۷۷
سطح استرادیول (pg/ml)	۲۱۵۹±۱۰۵۶	۲۸۴۲±۱۰۵۰	۰/۰۰۲

بسته به مورد از آزمونهای student t-test و مجذور کای جهت تجزیه و تحلیل آماری استفاده گردید مقادیر $P < ۰/۰۵$ معنی دار تلقی شد.

نتایج

براساس مطالعه نتایج حاصل در دو گروه A و B نشان می‌دهد که سطح استرادیول سرم در روز تزریق HCG در گروه A بطور متوسط ۲۱۵۹ ± ۱۰۵۶ pg/ml و در گروه B، ۲۸۴۲ ± ۱۰۵۰ pg/ml بدست آمد که بین دو گروه اختلاف معنی دار بوده است ($P = ۰/۰۰۲$).

دوز روزانه و دوز نهائی HMG، تعداد وزیکول ژرمینال بین دو گروه اختلاف معنی دار بوده است ($P < ۰/۰۵$). از نظر طول مدت درمان با HMG، تعداد تخمک و تعداد تخمکها در مرحله متافاز I و II اختلاف معنی داری وجود نداشت (جدول ۲).

تعداد بارداری در گروه A، ۱۹ مورد (۴۳/۲٪) و در گروه B، ۱۶ مورد (۳۴/۸٪) بوده است که اختلاف بین دو گروه معنی دار نیست ($P = ۰/۶$).

لازم به ذکر است که ۶ بیمار از گروه A، ۴ بیمار از گروه B تحت عمل GIFT و دو بیمار از گروه A و سه

گروه آمپول HMG با دوز ۲-۱ آمپول روزانه از روز سوم سیکل قاعدگی شروع شد سونوگرافی واژینال (ESOATE AU530 Probe 5 MHZ, Italy) جهت بررسی اندازه فولیکولها در تاریخهای معین و تغییر دوز آمپول HMG بر اساس مورد انجام گردید. زمانیکه متوسط سایز فولیکولها به ۱۷-۱۸ میلی متر رسید HMG و سوپر فکت قطع شده و $۱۰۰۰ IU$ HCG عضلانی تزریق و ۳۶ ساعت بعد بیماران جهت دریافت تخمک و انجام (Microinjection-IVF-ZIFT- ATR GIFT) بسته به مورد مراجعه می‌کردند. شیاف پروژسترون ۴۰۰ میلی گرم ۲ بار در روز جهت حمایت مرحله لوتئال و اندازه‌گیری βHCG خون ۱۵-۱۴ روز بعد از ART انجام شد. در صورت مثبت بودن تست بارداری ادامه شیاف پروژسترونی و تکرار تست به فاصله ۴۸ ساعت انجام شد. جهت بررسی وضعیت بارداری در هفته ۶-۵ سونوگرافی واژینال و در هفته ۷-۸ سونوگرافی آبدومینال انجام گردید.

در این بررسی نتایج مربوط به متغیرهای کمی پیوسته بصورت $M \pm SD$ بیان شد و برای مقایسه دو گروه

در مطالعه دیگری در سال ۱۹۹۷ متفورمین بر میزان بارداری تأثیری نداشته که با مطالعه ما مطابقت دارد (۱۶).

مطالعه‌ای مشابه مطالعه ما در مورد اثر متفورمین در PCOS و تعداد و کیفیت تخمکها، لقاح و تشکیل جنین انجام شد که در این مطالعه در کسانی که متفورمین استفاده کردند میزان لقاح ۷۷٪ مشاهده شد و در صورتی که در گروه شاهد میزان لقاح ۴۷٪ بود که بین دو گروه اختلاف معنی‌داری است (۱۷).

در این مطالعه به دلیل اینکه بیشتر نمونه‌ها تحت عمل ZIFT قرار گرفتند، بررسی لقاح و تشکیل جنین مقدور نبود ولی نتیجه درمان یعنی بارداری بررسی شد و بین دو گروه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. لازم به ذکر است که در مطالعه فوق بین میزان بارداری دو گروه بررسی خاصی صورت نگرفته بود (۱۷).

در این بررسی مطابق مطالعات فوق کاهش در سطح استرادیول سرم و بهبود کیفیت تخمکها (کاهش ژرمینال و زیگول) مشاهده شد. از آنجائیکه یکی از دلائل اثر متفورمین در PCOS را اثر آن بر کاهش وزن بیماران نسبت می‌دهند (۱) و بیماران ما از نظر اندکس توده بدن (BMI) و سطح سرمی LH و نسبت LH/FSH اختلاف معنی‌داری نداشتند، بنابراین تفاوت معنی‌داری در بارداری دو گروه دیده نشد.

در هر حال نتایج بارداری در هر دو گروه از میزان بالایی برخوردار بوده است.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات مشابه دیگر، متفورمین قادر خواهد بود میزان HMG مصرفی در بیماران PCOS را کاهش داده و در بهبود کیفیت تخمکها تاثیر بگذارد.

مشکلات و محدودیت‌ها: در اجرای این طرح خوشبختانه مشکل عمده‌ای وجود نداشت. بیماران هم پس از توجه

بیمار از گروه B تحت عمل IVF قرار گرفتند و بقیه بیماران دو گروه تحت عمل ZIFT قرار گرفتند. تمامی موارد بارداری به جز یک مورد GIFT در گروه A در بیمارستان تحت درمان به روش ZIFT بوده است.

بحث

یکی از اختلالات شایع در سنین بزرگسالی افزایش سطح سرمی انسولین و مقاومت به انسولین است. انسولین از طریق افزایش بیشتر آندروژنهای تخمدانی، آدرنال و کاهش تولید کبدی SHBG باعث افزایش سطح آندروژنهای آزاد سرم شده و مانع رشد مناسب فولیکولهای تخمدانی می‌گردد (۱).

بر اساس مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۹ بر روی بیماران با PCOS مقاوم به کلومیفن انجام شد، متفورمین باعث کاهش سطح آندروژنهای سرم، سطح LH و نسبت LH/FSH و افزایش SHBG گردید (۹).

در مطالعه Vanderمولن در سال ۲۰۰۱ بر روی بیماران PCOS با عدم تخمک‌گذاری مقاوم به کلومیفن دیده شد که متفورمین بطور قابل ملاحظه‌ای میزان تخمک‌گذاری و بارداری را افزایش می‌دهد، ولی در بررسی Sturrock در سال ۲۰۰۲ در مقایسه متفورمین با پلاسبو در گروه مشابه با این بیماران میزان بارداری افزایشی را نشان نداد (۱۳-۱۲).

در بررسی اثر متفورمین در سیکل IVF توسط Stadtmayer در سال ۲۰۰۱، در تعداد تخمکها افزایشی دیده نشد ولی تعداد تخمکهای رسیده افزایش داشته و کیفیت جنین‌ها نیز بهتر بود. همچنین میزان لقاح تخمکها و بارداری بطور معنی‌داری افزایش داشته است (۱۴).

در مطالعات مشابه در بررسی اثر متفورمین در سیکل‌های تحریک تخمک‌گذاری با گنادوتروپین‌ها، متفورمین سبب بهبود کیفیت و تعداد تخمکها شد که با مطالعه ما نیز همخوانی دارد (۱۵-۱۴).

از نظر فواید احتمالی داروی متفورمین آن را مصرف نموده، فقط تعدادی در مصرف داروها اشتباه کرده بودند که از مطالعه خارج شدند. یکی از محدودیت‌های این طرح عدم توانایی در بررسی تعداد و کیفیت جنین‌ها بود که آن هم بدلیل انجام Rapidzif در اکثر بیماران بوده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات خانم دکتر صفدریان، خانم دکتر خادمی، آقای دکتر سعیدی، آقای دکتر پویان و کلیه کارکنان ناباروری بیمارستان شریعتی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- 1-Speroff L., Glass R.H., Kase N.G. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 6th Edition, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. 1999; pp 1097- 133.
- 2-Balen A.H., Conway G.S., Kaltsas G., et al. PCOS: the spectrum of the disorder in 1741 patients. Hum Reprod. 1995; 10: 2107.
- 3-Conway G.S. PCOS: clinical aspects. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1996; 10:263.
- 4-Conway G.S., Jacobs H.S. Clinical implications of hyperinsulinemia in women. Clin Endocrinol. 1993; 39: 623.
- 5-Soule S.G. Neuroendocrinology of PCOS. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1996; 10: 205.
- 6-Balen A.H., Tan S.L., Jacobs H.S. Hypersecretion of Luteinising hormone: a significant cause of infertility and miscarriage. Br J Obs Gyn. 1993; 10: 82.
- 7-Kiddy D.S., Hamilton F.D., Seppala M, et al. Diet-induced changes in sex hormone binding globulin and free testosterone in women with normal or PCO correlation with serum insulin and ILGF-1. Clin Endocrinol. 1994; 31: 771.
- 8-Rossing M.A., Daling J.R., Weiss N.S. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. N Engl J Med. 1994; 331: 771.
- 9-Seibel M.M. A comprehensive text of infertility. 2th Edition, Boston, Appelton & Lange. 1999; pp 121- 32.
- 10-Velazquez E.M., Mendoza S.G., Wang P., et al. Metformine therapy is associated with a decrease in plasma plasminogen activator inhibitor-1, Lipoproteine (a), and immunoreactive insuline levels in patients with the PCOS. Metabolism. 1997; 46: 54.
- 11-Jacobs H.S. PCOS: etiology and management. Curr Opin Obs Gyn. 1995; 7: 203.
- 12-Vandermolen D.T. Metformine increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who resistant to clomiphene citrate alone. Fertil Steril. 2001; 75(2): 310- 5.
- 13-Sturrock N.D., Lannon B., Fay T.N. Metformine does not enhance ovulation induction in clomiphene resistant polycystic ovary syndrome in clinical practice. Br J Clin Pharmacol. 2002; 53(5): 469- 73.
- 14-Stadtmauer L.A. Metformine treatment of patients with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization improves outcomes and is associated with modulation of the insuline-like growth factors. Fertil Steril. 2001; 75(3): 505-9.
- 15-Leo V., Carca A.L. Effect of Metformine gonadotropine induced ovulation with polycystic ovary syndrome. Fertil Steril. 1999; 72(2): 282-5.
- 16-Uhelan J.G., Vdahos N.F. The ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil Steril. 2000; 72(2): 282- 5.
- 17-Fulghesa A.M., Villa P. The impact of insulin secretion on the ovarian response to exogenous gonadotropins in PCOS. Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(21): 644- 8.