

## بررسی تاثیر عصاره‌های فلاونویدی میوه و برگ گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus - castus L.*) بر تغییرات میزان سرمی هورمون پرولاکتین در موش‌های صحرایی ماده

محمد آزادبخت<sup>۱\*</sup>، امین... بهاء‌الدینی<sup>۲</sup>، سیده مریم شوریده ضیابری<sup>۳</sup>، علی ناصرزاده<sup>۳</sup>

۱- دانشیار، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز

۳- کارشناس ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز

\*آدرس مکاتبه: ساری، کیلومتر ۱۷ جاده دریا، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی

صندوق پستی: ۸۶۱-۴۸۱۷۵، تلفن: ۳۳۴۳۰۸۳ (۰۱۵۲)، نمابر: ۳۳۴۳۰۸۲ (۰۱۵۲)

پست الکترونیک: Azadbakhtm@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۸۴/۵/۳۰

تاریخ دریافت: ۸۳/۳/۵

### چکیده

مقدمه: گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus - castus L.*) از خانواده شاه‌پسند (*Verbenaceae*) از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران بوده که از آن در مواردی مثل کاهش میل جنسی و افزایش دادن میزان شیر استفاده می‌کرده‌اند. در این تحقیق اثر عصاره میوه و برگ این گیاه بر میزان سرمی هورمون پرولاکتین بررسی شده است.

روش بررسی: عصاره به روش خوراندن، در دوران پرواستروس و شیردهی به موش‌های صحرایی ماده تجویز شده است. گروه‌های شاهد مربوط به هر دوران، به جای عصاره آب مقطر دریافت کرده‌اند. برای تهیه نمونه خونی از هر موش در مراحل تعیین شده (پرواستروس و روز سوم شیردهی) حیوان با استنشاق اتر بیهوش شده و پس از برداشت مقدار لازم خون از قلب آن کشته می‌شد. سرم خون نمونه‌های بالا به وسیله سانتریفوژ جدا شده و برای اندازه‌گیری میزان هورمون پرولاکتین سرم به روش رادیوایمنواسی (RIA) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آماری به دست آمده به وسیله آنالیز واریانس یگانه و چندگانه و آزمون آماری LSD با در نظر گرفتن  $p < 0/05$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که دوزهای ۷۰ و ۱۰ mg/kg/day عصاره میوه و دوز ۱۰ mg/day عصاره برگ باعث کاهش میزان پرولاکتین در دوره پرواستروس شده ولی دوز ۷۰ mg/kg/day عصاره برگ باعث افزایش پرولاکتین در دوره پرواستروس شده است. از طرفی هر دو دوز و هر دو عصاره باعث افزایش معنی‌دار میزان پرولاکتین در دوره شیردهی نسبت به گروه شاهد شده‌اند. افزایش میزان پرولاکتین توسط عصاره میوه در دوران شیردهی با دوز ۷۰ mg/kg/day بیشتر از دوز ۱۰ mg/kg/day بوده است. از طرفی در مقایسه عصاره‌های برگ و میوه و همچنین مقایسه دوزهای ۷۰ و ۱۰ mg/kg/day عصاره میوه با دوز ۷۰ mg/kg/day در دوره شیردهی باعث بیشترین افزایش در میزان سرمی پرولاکتین شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق با مطالب موجود در طب سنتی در مورد گیاه پنج انگشت مبنی بر اینکه این گیاه باعث افزایش شیر می‌شود ممکن است همخوانی داشته باشد.

گل واژگان: پنج انگشت، پرولاکتین، شیردهی، پرواستروس



## مقدمه

پرواستروس (این مرحله فاز ساخت یا **Building up** است که طی آن هورمون‌های LH و FSH تخمدان را تحریک نموده تا مقدار زیادی استروژن و احتمالاً پروژسترون تولید کند. سپس این دو هورمون سبب آمادگی بیشتر اویدوکت‌ها، رحم و واژن می‌شوند)، استروس (مرحله تخمک‌گذاری)، متاستروس (حدود ۲۰ ساعت) و دی استروس (طولانی‌ترین مرحله سیکل است و ۶۰ تا ۷۰ ساعت طول می‌کشد) [۹].

میزان غلظت پرولاکتین در دوران بارداری ۱۰ تا ۲۰ بار بالاتر از حالت معمولی است. پرولاکتین سیکل استروس را به عقب می‌اندازد و باعث القای شیردهی می‌شود [۱۰]. در این تحقیق به منظور بررسی اثر عصاره فلاونوئیدی میوه و برگ گیاه پنج‌انگشت بر میزان پرولاکتین، میزان سرمی پرولاکتین در دوران پرواستروس و روز سوم شیردهی در موش‌های صحرایی ماده مورد اندازه‌گیری قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

**مواد و دستگاه‌ها:** شامل کیت پرولاکتین (ساخت شرکت کاو شیار تهران) اتانول، متانول، پترولئوم اتر، اتر، هگزامیلین تترامین، منیزیم و کلرید آلومینیوم شرکت مرک آلمان، اسید کلریدریک شرکت فلوکای آلمان و دستگاه شمارشگر گاما، (Gamatic - 1 آمریکا) روتاری (Heidolph)، سانتریفوژ (شرکت Ecco Berlin)، حمام آب گرم (مدل Sueria QRD ساخت آلمان)، میکروسکوپ (مدل Zeiss آلمان)، اسپکتروفتومتر (مدل Uv - 120 - 20 ساخت شرکت شیمادزو، ژاپن)، مواد و وسایل معمولی آزمایشگاه

**تهیه و شناسایی گیاه:** گیاه *Vitex agnus - castus* از منطقه بین روستای بوستان و روستای چم بلبل واقع در ۱۳۰ کیلومتری جاده یاسوج - گچساران (ارتفاع از سطح دریا ۵۷۰ متر) جمع‌آوری گردید و توسط گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم شیراز شناسایی شد.

از چوب، برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت از زمان‌های قدیم در طب سنتی ایران برای کاهش میل جنسی و افزایش شیر استفاده شده است [۱]. این گیاه در یونان و روم به دلیل کاهش دادن میل جنسی به درخت پاکدامنی<sup>۱</sup> یا فلفل راهب<sup>۲</sup> شهرت یافته است [۲].

گیاه پنج‌انگشت<sup>۳</sup> به خانواده شاه‌پسند<sup>۴</sup> تعلق دارد. این گیاه به صورت درختچه‌ای پایا با شاخه‌های دو ردیفی قهوه‌ای و پوست آن به صورت ورقه ورقه یا تکه‌تکه است. ارتفاع آن نیم تا سه متر و گاهی به پنج متر می‌رسد. برگ‌های آن دارای پنج تا هفت برگچه است. درشتی گلبرگ‌ها سه برابر کاسبرگ‌ها، کاسه گل پیوسته، جام گل آبی تا بنفش، دارای چهار پرچم (دو تا بلندتر از دیگری) می‌باشد [۳، ۴].

مهمترین ترکیبات شیمیایی چوب، برگ و میوه این گیاه، در جدول شماره ۱ ارایه شده است.

همانطوری‌که در این جدول ملاحظه می‌شود فلاونوئیدها، ترکیبات اصلی قسمت‌های مختلف گیاه را تشکیل می‌دهند [۴].

اثرات ضد التهابی و التیام‌دهندگی زخم‌ها با عصاره گونه *Vitex leucoxylon* گزارش شده است [۵]. فلاونوئیدهای استخراج شده از دانه گونه *V. negundo* دارای اثرات ضدبارداری<sup>۵</sup> و ضدآندروژنی<sup>۶</sup> روی سیستم تولید مثلی سگ‌های نر است [۶، ۷].

اسانس برگ‌های گیاه *Vitex agnus - castus* دارای فعالیت ضد میکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بوده است [۴]. عصاره این گیاه عدم تعادل هورمونی وابسته به استروژن بالا<sup>۷</sup> یا سندرم پیش قاعدگی را تصحیح کرده و علائم مربوط را کاهش می‌دهد [۸].

پس از فرا رسیدن بلوغ جنسی و قبل از حاملگی، ظهور فعالیت جنسی در موش‌های صحرایی ماده (استروس) به صورت دوره‌ای اتفاق می‌افتد. در موش صحرایی<sup>۸</sup> طول دوره استروس ۴ یا ۵ روز بوده و دارای چهار مرحله زیر است:

<sup>1</sup> Chaste tree

<sup>2</sup> Monks pepper

<sup>3</sup> *Vitex agnus - castus* L.

<sup>4</sup> Verbenaceae

<sup>5</sup> Antifertility

<sup>6</sup> Antiandrogenic

<sup>7</sup> Hyperproestrogenism

<sup>8</sup> Rat



جدول شماره ۱- ترکیبات شیمیایی گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus - castus L.*)

استروئید	گلیکوزید	آلکالوئید	فلاونوئید	ایریدوئید	
-	-	-	Flavon - c-glycoside (type orentin)	Aucubin Agnuside	اندام چوبی
A4-3-ketoester	Vitexin, Vitexinin	Viticin	Casticin, Omoorientin, Orientin Isoorientin, Isovitexin Isovitexin-glucoside Isovitexin-xyloside Luteolin-7-glycoside	Aucubin Agnuside Eterostoside	برگ
-	Castin	-	Casticin 6-idrossikamferol-3,6,7,4 tetramethyl= ether Pendulein, Chyosplenol D	Aucubin Agnuside	میوه

مطالعه می‌شدند و پس از اطمینان از وجود نظم مزبور، از طریق نمونه‌گیری از ترشحات واژن و مشاهده سلول‌های موجود در اسمیر در زیر میکروسکوپ و تعیین وضعیت سیکل، عصاره‌ها داده می‌شدند. حیوانات دوران شیردهی حداقل چند روز پیش از زایمان به محل نگهداری منتقل شده و عصاره‌دهی می‌شدند و پس از زایمان فرزندان حیوان به همراه مادر در قفسه جداگانه نگهداری می‌شدند.

**گروه‌های حیوانی مورد مطالعه:** موش‌های صحرایی به دو گروه شاهد و آزمایشی تقسیم شدند. گروه آزمایشی خود به دو گروه دریافت‌کننده دوزهای ۱۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز تقسیم گردیدند. در گروه شاهد از مایع هم حجم آب مقطر معادل دوز تعیین شده، استفاده می‌شد. در هر یک از مراحل پرواستروس، دوران شیردهی و گروه شاهد، پنج موش به طور جداگانه مورد آزمایش قرار گرفتند.

**روش تجویز عصاره:** پیش از تجویز عصاره موش‌ها وزن می‌شدند و براساس وزن موش عصاره داده می‌شد. برای تجویز عصاره از سرنگ‌های معمولی مجهز به Feeder - needle دهانی - حلقی (Oropharyngeal tube) استفاده شد.

**خون‌گیری و تهیه سرم از موش صحرایی:** عمل خون‌گیری طی مرحله پرواستروس سیکل جنسی پس از عصاره‌دهی، برای هر یک از موش‌ها انجام گردید. بدین ترتیب که با پیش‌بینی زمان پیدایش مرحله پرواستروس عمل نمونه‌گیری از واژن

**تهیه عصاره فلاونوئیدی از برگ و میوه:** مقدار ۵۰ گرم از بودر برگ و میوه به طور جداگانه در داخل دستگاه سوکسله ریخته شد و با ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری به مدت ۶ - ۴ ساعت انجام گردید. پایان زمان استخراج با انجام تست سیانیدین جهت استخراج کامل فلاونوئیدها تعیین شده است. حاصل استخراج توسط اسیدکلریدریک اسیدی شده و توسط اتیل استات سه بار و هر بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر دکانته شد. حاصل استخراج اتیل استاتی توسط دستگاه دوار تقطیر در خلا تغلیظ شده و پس از تعیین درصد، ماده خشک موجود در عصاره‌ها و همچنین اندازه‌گیری میزان فلاونوئید، در هر کدام با استفاده از هگزامتیلن تترامین (با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۲ نانومتر)، عصاره‌ها در یخچال نگهداری می‌گردید [۱۱].

**تغذیه و نگهداری موش صحرایی:** برای انجام این تحقیق از موش‌های صحرایی آزمایشگاهی ماده بالغ و سالم از نژاد Charles River با وزن حدود ۲۲۰ - ۱۸۰ گرم و سن چهار تا پنج ماهگی استفاده شد. در مدت مطالعه موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. موش‌های مورد مطالعه قبل از تجویز عصاره به مدت حداقل چهار روز در شرایط فوق نگهداری شدند تا به شرایط محیط کاملاً عادت نمایند و طی مدت فوق حیوانات از غذای معمولی و آب کافی بهره‌مند بودند. در این مدت حیوانات از نظر نظم مراحل دوران استرس



## روش‌های تجزیه و تحلیل آماری:

از مقادیر به دست آمده در آزمایش‌ها میانگین‌گیری شد و سپس با روش واریانس (Multiple comparison ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. ضمناً برای تعیین گروه‌های متفاوت از تست آماری LSD با در نظر گرفتن  $p < 0/05$  استفاده شد.

## نتایج

از ۵۰ گرم پودر برگ و میوه به ترتیب ۶/۸ و ۳/۰۰۶ گرم عصاره خشک به دست آمد عبارتی عصاره خشک شده برگ و میوه حاصل از الکل ۵۰° به ترتیب ۱۴ و ۶/۰۱۲ درصد می‌باشد.

میزان فلاونوئید موجود در عصاره‌های برگ و میوه گیاه، که از نمودار بی‌لامبرت تهیه شده از ویتکسین استاندارد به دست آمده، محاسبه شد و مقادیر آن به ترتیب ۹/۲۷۵ و ۸/۳۲۴ درصد بوده است.

میزان تاثیر دوزهای مختلف عصاره برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت بر میزان پرولاکتین سرم در مرحله پرواستروس سیکل جنسی و همچنین در زمان شیردهی در موش‌های صحرایی در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

انجام گرفته و پس از اطمینان یافتن از پیدایش مرحله جنسی بالا، حیوان توسط استنشاق اثر بیهوش می‌گردید. عمل خون‌گیری در دوران شیردهی در روز سوم انجام شده است. در این مرحله پس از شکافتن سینه حیوان، به میزان لازم، از قلب خون‌گیری به عمل می‌آمد. خون تهیه شده در لوله آزمایش مخصوص به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شد و سرم‌های تهیه شده در دمای (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری و در زمان معین برای اندازه‌گیری غلظت هورمون پرولاکتین مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

## اندازه‌گیری غلظت هورمون:

میزان ۲۵ میکرولیتر نمونه هر سرم به همراه ۳۰۰ میکرولیتر از Sample tracer در لوله کیت مخصوص اندازه‌گیری پرولاکتین (Coated با آنتی‌بادی علیه پرولاکتین و نشان‌دار شده با ید ۱۲۵) ریخته شده و پس از مخلوط شدن به مدت یک ساعت همراه با تکان دادن در دمای اتاق انکوبه می‌شد. سپس محلول روی نمونه‌ها خالی و با آب مقطر شستشو می‌شدند. سپس لوله‌ها خالی و کاملاً خشک شده و آن‌گاه به مدت معین (به ازای ۱۰۰۰۰ شمارش در هر لوله یا شمارش به مدت حداقل یک دقیقه) توسط دستگاه شمارشگرگاما، میزان پرولاکتین اندازه‌گیری می‌شد.

جدول شماره ۲- میزان تاثیر عصاره فلاونوئیدی برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت بر میزان پرولاکتین سرم در مراحل پرواستروس سیکل جنسی و شیردهی در موش‌های صحرایی

مرحله	غلظت سرمی پرولاکتین (miu/ml) در مرحله شیردهی		غلظت سرمی پرولاکتین (miu/ml) در مرحله پرواستروس	
	با عصاره میوه	با عصاره برگ	با عصاره میوه	با عصاره برگ
دوز ۱۰ mg/kg/day	۳۱/۰ ± ۴/۸	۳۲/۴ ± ۵/۲	۳۲/۶ ± ۳/۹	۳۸/۲ ± ۴/۵
دوز ۷۰ mg/kg/day	۳۹/۷ ± ۱۰/۳	۳۰/۴ ± ۱/۶	۳۰/۵ ± ۲/۶	۵۰/۵ ± ۷/۴
شاهد	۲۹/۹ ± ۱/۸	۲۶/۸ ± ۱/۸	۳۷/۲ ± ۴/۲	۴۵/۱ ± ۱/۶

پرواستروس و شیردهی مورد آزمایش قرار گرفته و میزان تفاوت وزن پایانی نسبت به شروع آزمایش در پاسخ به تجویز

همچنین در این تحقیق اثر عصاره برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت بر میزان وزن حیوانات گروه آزمایشی در مرحله



عصاره برگ باعث کاهش میزان پرولاکتین در دوره پرواستروس شده ولی دوز  $70 \text{ mg/kg/day}$  عصاره برگ باعث افزایش پرولاکتین در دوره پرواستروس شده است. از طرفی هر دو دوز و هر دو عصاره باعث افزایش معنی دار میزان پرولاکتین در دوره شیردهی نسبت به گروه شاهد شده‌اند. افزایش میزان پرولاکتین توسط عصاره میوه در دوران شیردهی با دوز  $70 \text{ mg/kg/day}$  بیشتر از دوز  $10 \text{ mg/kg/day}$  بوده است. از طرفی در مقایسه عصاره‌های برگ و میوه و همچنین مقایسه دوزهای  $10$  و  $70 \text{ mg/kg/day}$ ، عصاره میوه با دوز  $70 \text{ mg/kg/day}$  در دوره شیردهی باعث بیشترین افزایش در میزان سرمی پرولاکتین شده است.

نتایج این تحقیق با مطالب موجود در طب سنتی در مورد گیاه پنج‌انگشت مبنی بر اینکه این گیاه باعث افزایش شیر می‌شود ممکن است همخوانی داشته باشد [۱] به دلیل اینکه در زمان شیردهی و بارداری میزان پرولاکتین افزایش می‌یابد و از طرفی عصاره برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت نیز به طور کلی باعث افزایش ترشح پرولاکتین به ویژه در دوران شیردهی شده است هر چند که پاسخ میزان ترشح با دوزهای مختلف عصاره برگ و میوه متفاوت می‌باشد.

از طرفی در طب سنتی ادعا شده است که این گیاه باعث کاهش میل جنسی می‌شود [۱]. ممکن است این اثر با واسطه استروژن انجام گیرد و از طرفی در این تحقیق مشخص شده است که عصاره برگ و میوه این گیاه باعث افزایش کلی پرولاکتین می‌گردند. بنابراین ممکن است مکانیسم افزایش ترشح پرولاکتین در ارتباط با استروژن و گناد و تروپین‌ها باشد [۱۳].

دوزهای مختلف اندازه‌گیری شده است. میانگین تغییرات وزن در هیچ یک از گروه‌های آزمایشی نسبت به قبل از تجویز عصاره تفاوت معنی‌داری ندارد.

## بحث

ترشح هورمون پرولاکتین به وسیله هیپوتالاموس و با ترشح دو فاکتور، یکی مهارکننده (PIF) و دیگری به نام PRH که ترشح آن را تحریک کند، کنترل می‌شود. میزان ترشح پرولاکتین به طور فیزیولوژیکی در مدت بارداری و پس از زایمان در دوران شیردهی افزایش می‌یابد به طوری که در دوران بارداری غلظت پرولاکتین  $10$  تا  $20$  برابر بیشتر از حالت معمول است [۱۰]. نقش‌های بی‌شمار و گوناگون پرولاکتین همچون پایداری فعالیت ترشحی غدد پستانی، همراهی عمل آن با آندروژن‌ها و اثر آن در متابولیسم آندروژن‌ها، شباهت آن با فاکتور رشد سلولی، تاثیر آن در حیوانات بر عمل تخمدان‌ها و مهار سیکل استروس، اثر بر رشد جسم زرد (اثر لوتوتروپیک) از جمله نقش‌های پرولاکتین می‌باشد. پرولاکتین همچنین قادر به تنظیم گنادوتروپین‌ها است به طوری که بالا رفتن میزان پرولاکتین، ترشح LH را مهار می‌کند. ترشح پرولاکتین و گنادوتروپین‌ها LH و FSH و وقوع تخمک‌گذاری تحت اثر استروژن بوده و افزایش غلظت استروژن همراه با رشد فولیکول، محرکی فیزیولوژیک برای رشد گناد و تروپین‌ها و پرولاکتین می‌باشد [۹، ۱۲].

با توجه به نتایج به دست آمده، در این تحقیق، دوزهای  $70 \text{ mg/kg/day}$  و  $10 \text{ mg/kg/day}$  عصاره میوه و دوز

## منابع

۱. ابن‌سینا، قانون در طب. ترجمه شرفکندی، انتشارات سروش، جلد دوم، ۱۳۷۰، صفحات ۵۸، ۹۸.
۲. Houghton P. Herbal products, Agnus – castus, *The pharmaceutical Journal*, 1994; 253: 720 – 721.
۳. آزادبخت محمد. رده‌بندی گیاهان دارویی. انتشارات تیمورزاده (نشر طبیب). تهران، ۱۳۷۸، صفحات ۷ – ۲۵۵.
۴. Russo M and Galletti CG. Medicinal properties and chemical composition of *Vitex agnus – castus* L.: A review, *Acta. Hort. ISHS*. 1996; 426: 105 – 112.
۵. Samara SP and srenivasan KK. Antiinflammatory and wound healling activities of the crude alcoholic extract and flavonoids of *vitex leucoxydon*. *Fitotropia*. 1990; 61: 263 – 264.



6. Bhargara SK. Antifertility effect of the flavonoids of the vitex negundo seeds in dogs. *Phyt. Plant Med.* 1986; 188 – 197.
7. Bhargara SK. Antiandrogenic effects of the flavonoid – rich fraction of *Vitex negundo* seeds: A histological and biochemical study in dogs. *J. E. pharmacology.* 1989; 327 – 339.
8. Reynolds JBF. *Agnus – castus*, Martindale, The extrapharmacopoeia, 31ed., V. 102, 1996, P: 1670.
9. Fox RR and laird cw. Sexual cycles in: reproduction and breeding techniques for laboratory animals, E. S. E. Hafez (ed) Lee & Febiger, Philadelphia. pp: 107 – 122.
10. Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM and Stainer P. Text book of physiology, 21th ed., W. B. Saunders company, Philadelphia, Vol. 2, 1989, PP: 1209 – 1261.
11. قاسمی دهکردی، نصراله و طالب امیرمهدی استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود در گیاهان دارویی شاخص. نشر چوگان و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۱۳۸۰، صفحات ۶۳ – ۱۵۹.
12. Evans NP and et al. Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin – releasing hormone surge: implication for neuroendocrine processing of the estradiol signal, *Endocrinology.* 1997; 183: 5408 – 5414.
13. Neill JD, Freeman ME and Tilson SA. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone by estrogen in the rat. *Endocrinol.* 1971; 89: 1448 – 1453.

Archive of SID

