

بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی میوه گیاه پنج انگشت بر تغییرات هورمونهای جنسی در سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) القایی در موش صحرایی

غلامعلی جلودار^{۱*}، کبری عسکری^۲

۱. بخش فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز

۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور واحد اصفهان، اصفهان

پذیرش: ۲ اردیبهشت ۹۱

دریافت: ۱۸ بهمن ۹۰

چکیده

مقدمه: PCOS از اختلالات مهم سیستم تولید مثلی و غدد درون ریز زنان در سنین باروری می‌باشد. گزارشاتی مبنی بر تأثیر گیاه پنج انگشت بر محور هیپوفیز-هیپوتالاموس وجود دارد. لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره هیدروالکلی میوه این گیاه بر تغییرات هورمون‌های جنسی پس از القا PCOS طراحی گردید.

روش‌ها: ۳۲ موش صحرایی نژاد Sprague dawley (وزن 20 ± 20 گرم) که سیکل منظم داشتند انتخاب و به چهار گروه تقسیم گردیدند. گروه یک کنترل، گروه دوم کنترل درمان (شم): به مدت ۳۰ روز عصاره گیاه را با دوز ۳۶۵ mg/kg دریافت کردند. گروه سوم PCOS: این گروه جهت القا PCOS به مدت ۲۸ روز لتروزول (۱ mg/kg) دریافت کردند. گروه چهارم PCT: پس از القا PCOS، به مدت ۳۰ روز توسط عصاره گیاه به صورت دهانی تحت درمان قرار گرفتند. در پایان خونگیری از قلب انجام و سطح سرمی هورمون‌های پروژسترون، استروژن، تستوسترون و دهیدرواپی آندروسترون (DHEA) به روش الیزا تعیین شد.

یافته‌ها: در گروه PCOS پس از تجویز لتروزول میزان استروژن و پروژسترون کاهش ولی میزان تستوسترون و DHEA افزایش نشان داد. عصاره گیاه پنج انگشت در گروه شم تغییر معنی داری در هورمون‌های مورد ارزیابی ایجاد نکرد. مصرف عصاره این گیاه موجب افزایش سطح سرمی هورمون پروژسترون و کاهش هورمون تستوسترون در حیوانات مبتلا به PCOS گردید اما تأثیری بر میزان هورمون‌های استرادیول و DHEA نداشت.

نتیجه‌گیری: عصاره گیاه پنج انگشت سبب بهبود وضعیت هورمونهای تستوسترون و پروژسترون در مدل حیوانی PCOS گردید ولی بر میزان استروژن و DHEA تأثیر معنی داری نداشت.

واژه‌های کلیدی: سندرم تخمدان پلی کیستیک، پنج انگشت، موش صحرایی، هورمون‌های جنسی

مقدمه

سندرم شامل ویژگی‌های بالینی (اختلالات قاعدگی، پر موئی، آکنه، طاسی، ناباروری) تغییرات هورمونهای غدد درون ریز (افزایش سطح آندروژن، استروژن، پرولاکتین [۲۰] و کاهش میزان هورمون پروژسترون [۲] و اختلالات متابولیک (مقاومت انسولین، چاقی، اختلالات مربوط به چربی خون و دیابت نوع ۲) می‌باشد. هر چند گاهی میزان هورمون استرادیول در این بیماری تغییر نمی‌کند [۱۱]. در بیشتر بیماران مبتلا، ممکن است تنها یک یا دو علامت بالینی وجود داشته باشد. زنان با

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از شایع‌ترین و پیچیده‌ترین اختلالات اندوکرین می‌باشد که تقریباً ۶ تا ۱۰ درصد زنان را در سنین باروری مبتلا می‌کند. ویژگی‌های این

jelodar@shirazu.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

مهم، در پیشرفت علم پزشکی به شمار می‌رود. یکی از مهمترین گیاهانی که در بسیاری از کتب به اهمیت درمانی آن در بیماریهای زنان اشاره شده است گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus-castus*) است [۱۵]. گیاه پنج انگشت از خانواده شاه پسند است [۱۷] که بطور سنتی برای درمان بی نظمی‌های قاعدگی، و بطور خاص برای کمک به ایجاد سیکل طبیعی قاعدگی و همچنین بهبود باروری استفاده می‌شده است. ویتکس محتوی هورمون نیست، ولی با اثر بر غده هیپوفیز، بویژه بر تولید هورمون LH، فعالیت هورمونی نشان می‌دهد. تصور می‌شود ویتکس یک اثر adabtogetic بر هیپوفیز قدامی، در تنظیم ترشح LH دارد. LH ترشحات جسم زرد را بعد از تخمک گذاری برای تولید پروژسترون تحریک می‌کند، که سرانجام منجر به تنظیم سیکل جنسی زن می‌شود [۳]. بر اساس مطالعات انجام شده عصاره گیاه به ویژه با تغییر میزان هورمونهای جنسی تا برطرف شدن عدم تعادل عمل می‌کند [۱۷]. ممکن است عصاره گیاه پنج انگشت با تنظیم ترشح گنادوتروپین ها و هورمون‌های جنسی بر سندرم تخمدان پلی کیستیک موثر باشد. لذا این مطالعه به منظور بررسی اثر عصاره هیدروالکلی میوه این گیاه بر تغییرات هورمون‌های جنسی پس از القا PCOS در موش‌های صحرایی طراحی گردید. به دلیل پیچیدگی جنبه های گوناگون سندرم تخمدان پلی کیستیک، ایجاد موفقیت آمیز نمونه حیوانی این سندرم پیوسته با چالش‌هایی همراه بوده است. روش‌های مختلفی برای ایجاد این سندرم مطرح می‌باشد از آن جمله می‌توان به تجویز آندروژن ها مانند تستوسترون و دی هیدرواپی آندروسترون، استروژن‌ها مانند استرادیول والرات و مهار کننده های آروماتاز مانند لئروزول اشاره نمود. استفاده از هر کدام از این ترکیبات می‌تواند مزایا و مشکلاتی را در پی داشته باشد [۱۸].

مواد و روش ها

جمع آوری گیاه و تهیه عصاره: در این تحقیق از میوه گیاه پنج انگشت، جمع آوری شده از بستر رودخانه های اطراف شهر خاوران واقع در ۱۲۰ کیلومتری جاده شیراز- جهرم استفاده شد. گیاه توسط گروه زیست شناسی دانشکده علوم شیراز شناسایی شد. میوه‌ها پس از جدا شدن از شاخه، در شرایط

سندرم تخمدان پلی کیستیک دارای علائم کلینیکی گسترده‌ای می‌باشند ولی معمولاً آن‌ها بعلت سه اختلال به پزشک مراجعه می‌کنند که عبارتند از نامنظمی قاعدگی، نازایی و علائم همراه با افزایش آندروژن مثل هیرسوتیسم و آکنه [۲۰]. بیماران مبتلا به PCOS به علت عوامل خطری نظیر چاقی، هیپرانسولینمی، هیپراندرژنمی، مقاومت انسولینی و دیس لیپیدمی^۱ در معرض بیماری‌های دیگری از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی و ترومبوتیک^۲ قرار دارند که توجه فیزیولوژیست‌ها را به خود معطوف کرده است و نیازمند توجهات پزشکی ویژه‌ای است. [۱۶،۷]. تشخیص اتیولوژی یا اتیولوژی های PCOS دشوار است. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که در PCOS تعدادی از اختلالات آندوکراین باعث تقویت و تشدید همدیگر می‌گردند. این اختلالات شامل نقص در عملکرد محور هیپوتالاموس-هیپوفیز، عملکرد تخمدان و عملکرد آدرنال است. در واقع PCOS با ترشحات غیرطبیعی گنادوتروپین ها (LH (هورمون مولد جسم زرد) و FSH (هورمون محرک فولیکول))، افزایش ترشح استروئیدهای تخمدان و همچنین مقاومت به انسولین همراه است [۱۱]. افزایش مقدار LH سبب افزایش تولید آندروژن ها می‌شود [۱۹]. افزایش ترشح آندروژن ها یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های تخمدان‌ها در PCOS می‌باشد. در این حالت تخمدان‌ها مقدار زیادی تستوسترون، آندروستندیون و دئیدرواپی آندروسترون^۳ تولید می‌کنند اما افزایش تستوسترون سرم شایع‌تر است [۱۱]. روش‌های درمانی متعددی برای سندرم تخمدان پلی کیستیک مطرح شده‌اند، مانند تغییر عادت زندگی، جراحی و مصرف دارو. در حال حاضر شناخته شده ترین روش درمانی استفاده از داروهایی مانند کلومیفن سیترات، متفورمین، لئروزول و تاموکسیفن است [۱۱]. با توجه به عوارض جانبی ناشی از این داروها، شناسایی و تهیه داروهای جایگزین دارای اهمیت زیادی است.

طب گیاهی قدیمی‌ترین شکل درمان است که از سوی بشر شناخته شده و از دیرباز مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از این روش درمانی در تمامی تمدن‌ها سابقه دارد و یک جزء

1. Dyslipidemia
2. Thrombotic
3. Dehydroepiandrosterone (DHEA)

گیری از ترشحات واژن و مشاهده سلول های موجود در اسمیر در زیر میکروسکوپ نوری انجام گرفت. در موش صحرایی آزمایشگاهی طول دوره استروس ۴ یا ۵ روز بوده و دارای چهار مرحله اصلی است: ۱- پرواستروس^۱، ۲- استروس^۲، ۳- مت استروس^۳، ۴- دی استروس^۴ [۴].

القاء سندرم تخمدان پلی کیستیک: جهت القاء سندرم تخمدان پلی کیستیک از قرص لتروزول (۱ mg/kg) استفاده شد. تیمار موش ها با قرص لتروزول با توجه به تقسیم بندی گروهها به صورت دهانی توسط گاواژ و به مدت ۲۸ روز انجام شد [۶].

تجویز عصاره گیاه: تجویز عصاره به صورت دهانی و توسط گاواژ انجام شد. بدین ترتیب که حجم معینی از عصاره مطابق با دوز تعیین شده (۳۶۵ mg/kg) به صورت روزانه و به مدت ۳۰ روز، به حیوان خوراندند شد [۱۴، ۱۳].

خونگیری و اندازه گیری غلظت هورمون ها: در پایان دوره بعد از تعیین سیکل جنسی، موش های صحرایی در مرحله پرواستروس با استفاده از اتر در یک ظرف مخصوص بیهوش شدند و ۵-۳ میلی لیتر خون از قلب آنها کشیده شد. سرم خونها جدت شده و غلظت سرمی هورمون های پروژسترون، استروژن، تستوسترون و DHEA به روش الایزا اندازه گیری شد. برای اندازه گیری از کیت های پروژسترون، استروژن، تستوسترون و DHEA ساخت شرکت مونوبایند استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) با هم مقایسه شدند و از آزمون LSD برای مقایسه جفت گروه ها استفاده شد. جهت بررسی نتایج $P < 0.05$ به عنوان معنی دار بودن تفاوتها در نظر گرفته شد.

یافته ها

میانگین ($\pm SE$) میزان هورمونهای پروژسترون، استروژن،

استاندارد، دور از نور خورشید، رطوبت، آلودگی میکروبی با تهویه مناسب و در سایه خشک شدند. جهت عصاره گیری میوه های خشک شده گیاه پنج انگشت توسط آسیاب برقی پودر گردید. مقدار ۵۰۰ گرم از پودر میوه گیاه را با ۱ لیتر الکل ۷۰٪ مخلوط کرده و به مدت ۴۸ ساعت در حلال الکل خیسانده شد. سپس محتویات داخل ظرف را به وسیله کاغذ صافی و قیف شیشه ای صاف کرده و محلول صاف شده به یک بالن منتقل شد. حلال آن با استفاده از دستگاه روتاری تنظیم شده در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد با دور متوسط خارج گردید. حدود ۵۰ گرم عصاره از مجموع ۵۰۰ گرم پودر میوه گیاه پنج انگشت به دست آمد.

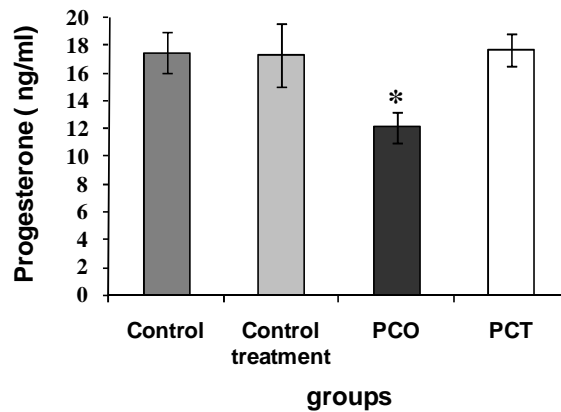
حیوانات و گروه های مورد آزمایش: این مطالعه بر روی موش صحرایی ماده بالغ، نژاد Sprague dawley (با میانگین وزن 20 ± 200 گرم) انجام گرفت. حیوانات از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تهیه شده و در اتاق حیوانات بخش فیزیولوژی در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. موشهای مورد مطالعه قبل از تجویز دارو به مدت حداقل ۷ روز در شرایط فوق نگهداری شدند، تا به شرایط محیط کاملاً عادت نمایند، طی این مدت حیوانات از غذای معمولی و آب کافی بهره مند بودند. سیکل جنسی همه موش ها با تهیه اسمیر واژنی طی ۱۴ روز تعیین شد و ۳۲ موش که سیکل منظم داشتند انتخاب شده و به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم گردیدند. **گروه کنترل:** موش های این گروه تحت هیچ تیماری قرار نداشتند. **گروه دوم یا گروه کنترل درمان:** حیوانات این گروه به منظور بررسی اثر عصاره گیاه بر میزان ترشح هورمون های تخمدان در شرایط عادی، همزمان با موش های گروه سه، به مدت ۳۰ روز عصاره گیاه را با دوز ۳۶۵ mg/kg دریافت کردند. **گروه سوم گروه PCO:** در این گروه موش ها به مدت ۲۸ روز لتروزول دوز ۱ mg/kg دریافت کردند. **گروه PCT:** موش های این گروه مانند گروه سوم مدت ۲۸ روز لتروزول دریافت نموده و پس از تعیین سیکل جنسی و وزن بدن به منظور درمان به مدت ۳۰ روز عصاره گیاه را با دوز ۳۶۵ mg/kg دریافت کردند و در پایان نیز مجدداً سیکل جنسی و وزن آنها ارزیابی شد.

تعیین سیکل جنسی: حیوانات در ابتدای کار و همچنین قبل از انجام خونگیری به مدت ۱۴ روز از نظر نظم مراحل سیکل جنسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این کار از طریق نمونه

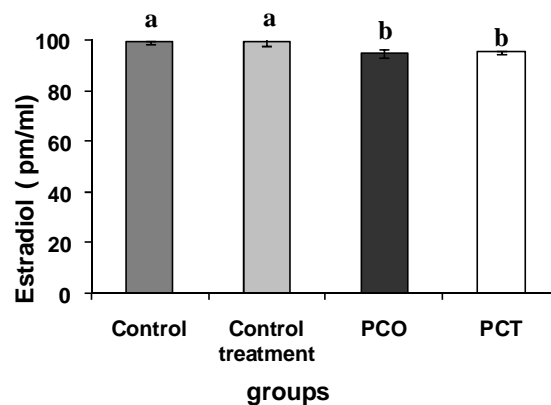
1. Proestrus
2. Estrus
3. Metestrus
4. Diestrus

در موش‌های صحرایی سبب افزایش میزان هورمون‌های تستوسترون و DHEA و کاهش میزان هورمون‌های پروژسترون و استرادیول در سرم خون موش‌های گروه PCO در مقایسه با گروه کنترل شد. این تغییرات از لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). میانگین هورمون پروژسترون در گروه

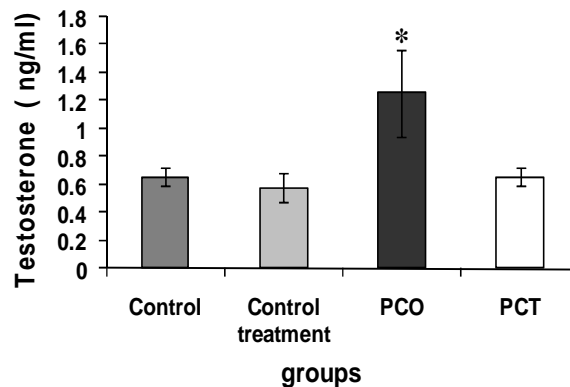
تستوسترون و DHEA در گروه‌های مختلف در نمودارهای ۱ تا ۴ نشان داده شده است. عصاره گیاه پنج انگشت در دوز 365 mg/kg در گروه ششم تغییر معنی داری در هورمون‌های مورد ارزیابی ایجاد نکرد. استفاده از لتروزول جهت ایجاد سندرم تخمدان پلی کیستیک



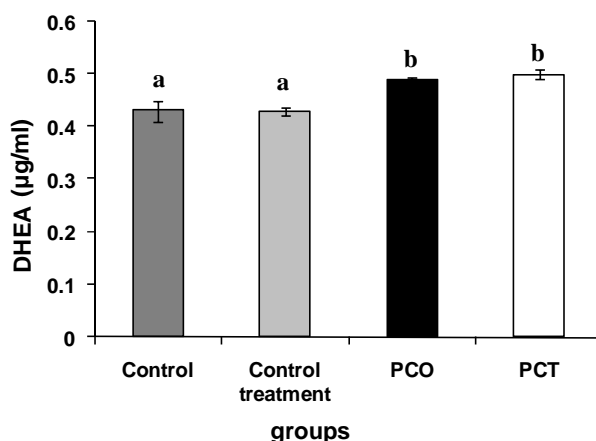
شکل ۱- مقایسه میزان پروژسترون بین گروه‌های مختلف، * نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$). PCO: گروه مبتلا به PCOS، PCT: گروه مبتلا به PCOS درمان شده با عصاره گیاه



شکل ۲- مقایسه میزان استرادیول بین گروه‌های مختلف، حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$). PCO: گروه مبتلا به PCOS، PCT: گروه مبتلا به PCOS درمان شده با عصاره گیاه



شکل ۳- مقایسه میزان تستوسترون بین گروه‌های مختلف، * نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد ($P < 0.05$). PCO: گروه مبتلا به PCOS، PCT: گروه مبتلا به PCOS درمان شده با عصاره گیاه



شکل ۴- مقایسه میزان DHEA بین گروه های مختلف، حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه ها می باشد ($P < 0.05$). PCO: گروه مبتلا به PCOS، PCT: گروه مبتلا به PCOS درمان شده با عصاره گیاه

[۶].

معمولاً در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک میزان هورمون پروژسترون کاهش و میزان هورمونهای استرادیول، تستوسترون و DHEA افزایش می یابد [۲]. هر چند گاهی میزان هورمون استرادیول تغییر نمی کند [۱۱].

استفاده از عصاره گیاه پنج انگشت در موش های PCOS سبب افزایش میزان پروژسترون و کاهش میزان تستوسترون سرم شد، در صورتی که بر غلظت هورمونهای استروژن و DHEA تأثیر قابل توجهی نداشت.

برگمن و همکارانش (۲۰۰۰) با مطالعه بر روی ۶۷ بیمار با اختلال تخمک گذاری شامل، ۳۷ زن مبتلا به الیگومنوره و ۳۰ زن مبتلا به آمنوره، بیان کردند، استفاده از گیاه پنج انگشت باعث افزایش سطح پروژسترون شده با کوتاه کردن سیکل جنسی منجر به تخمک گذاری می شود [۱]. همچنین نتایج حاصل از مطالعه و تحقیق Milewicz و همکاران در سال ۱۹۹۳ بر روی ۵۲ زن با اختلال در فاز لوتئال به علت هیپرپرولاکتیمی، نشان داد که استفاده از عصاره گیاه پنج انگشت به مدت ۳ ماه باعث افزایش سطح پروژسترون و نرمال شدن فاز لوتئال می گردد [۱۲]. ناصرزاده در مطالعه ای با هدف بررسی تأثیر عصاره گیاه پنج انگشت بر تغییرات میزان هورمون های استروئیدی در موش های صحرایی بیان کرد، پس از تجویز دهانی عصاره میوه گیاه غلظت پلاسمایی هورمون پروژسترون افزایش و غلظت هورمون استرادیول کاهش می یابد [۱۴]. یافته های ما نیز نشان داد که عصاره گیاه پنج انگشت میزان هورمون پروژسترون سرم را افزایش می دهد این افزایش

PCOS دریافت کننده عصاره گیاه (PCT) به طور معنی داری نسبت به گروه PCOS افزایش نشان داد در حالی که میانگین هورمون تستوسترون در گروه PCT نسبت به گروه PCOS کاهش یافت ($P < 0.05$). میزان هورمون های استرادیول و DHEA در گروه PCT تفاوت معنی داری نسبت به گروه PCOS نداشت.

بحث

در مطالعه حاضر پس از القا سندرم تخمدان پلی کیستیک در موش های PCOS مقادیر هورمونهای پروژسترون و استرادیول کاهش ولی میزان هورمون های تستوسترون و DHEA افزایش یافت.

در این تحقیق جهت ایجاد تخمدان پلی کیستیک در مدل حیوانی از مهار کننده آنزیم آروماتاز یعنی لتروزول استفاده شد و تغییرات هورمونی به عنوان مهمترین علائم این سندرم مورد توجه قرار گرفت. لتروزول یک مهار کننده آروماتاز غیر استروئیدی است و توانایی زیادی در مهار کردن آنزیم آروماتاز دارد. کاهش فعالیت آنزیم آروماتاز باعث ایجاد اختلال در استروئیدوژنز تخمدان شده در نهایت باعث القا PCOS می شود. این آنزیم بیوسنتز استروژن از آندروژن را کاتالیز می کند، کاهش فعالیت این آنزیم باعث مهار آروماتیزاسیون تستوسترون به استرادیول شده در نتیجه میزان تستوسترون افزایش و میزان استرادیول کاهش می یابد. کاهش میزان هورمون پروژسترون در حیوانات گروه PCOS به علت عدم تخمک گذاری است

تستوسترون و تبدیل نمودن آن به استرادیول سبب کاهش میزان تستوسترون شده باشد. انتظار می‌رفت به این ترتیب غلظت استروژن افزایش یابد ولی نتایج حاصل، چنین تغییری را نشان نداد. همچنین بر اساس گزارشات موجود عصاره میوه گیاه پنج انگشت محتوی تعدادی ترکیبات فیتواستروژنی است. فلاوونوئیدهای apigenin، vitexin، penduletin از عصاره گیاه جدا شده‌اند که توانایی اتصال به گیرنده های استروژنی را دارند [۲۱]. استفاده دراز مدت از عصاره های گیاهی که حاوی فیتواستروژن ها هستند می‌تواند با اثر فیدبک منفی بر LH میزان تستوسترون را کاهش می‌دهند [۹].

گزارشات نشان می‌دهد میزان هورمون DHEA در ۷۵-۷۰ درصد از افراد مبتلا به PCOS افزایش می‌یابد [۱۰]. بیش از ۸۵٪ از این هورمون از غده آدرنال ترشح می‌شود. با توجه به اینکه درصد قابل توجهی از هورمون DHEA در بدن توسط غده آدرنال تولید می‌شود و از طرف دیگر بیشترین اثر گیاه پنج انگشت بر گنادوتروپین های هیپوفیز است انتظار تغییر قابل توجهی در میزان این هورمون وجود نداشت.

نتیجه گیری: عصاره گیاه پنج انگشت می‌تواند با ایجاد تغییر در ترشح هورمون‌های جنسی سبب بهبود وضعیت این هورمون‌ها در حیوان پلی کیستیک شود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. از زحمات سرکار خانم احمدی کارشناس محترم بخش فیزیولوژی و آقای جلالی کارشناس محترم بخش فارماکولوژی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند تشکر می‌گردد.

می‌تواند به دلیل انجام تخمک گذاری در موش‌های PCOS پس از دریافت عصاره باشد. بر اساس تحقیقات انجام شده، سندرم پیش از قاعدگی به دلیل تغییر میزان استروژن و پروژسترون ایجاد می‌شود به طوری که میزان پروژسترون نسبت به استروژن کاهش می‌یابد و عصاره گیاه پنج انگشت سبب تعادل طبیعی بین استروژن و پروژسترون در دوره قاعدگی می‌گردد [۱۲]. در حقیقت گیاه پنج انگشت با اثرات فیزیولوژیک-فارماکولوژیک خود سبب می‌شود که بدن کاهش یا افزایش هورمونی را متعادل کند [۸]. در مطالعه حاضر میزان هورمون استرادیول پس از تجویز عصاره تغییر قابل توجهی نشان نداد که ممکن است دلیل آن مناسب نبودن دوز مصرفی و یا کافی نبودن مدت درمان باشد. همچنین چون زمان نمونه گیری از موش‌ها با توجه به کوتاه بودن سیکل تولید مثلی آنها نقش مهمی در میزان غلظت هورمون‌های جنسی بخصوص استروژن دارد، علی‌رغم اینکه سعی شد از تمام حیوانات پس از تعیین مرحله سیکل و در فاز پرواستروس خون گیری بعمل آید، تغییر سریع این هورمون طی نمونه گیری و عدم امکان هماهنگی کامل زمان نمونه گیری بین گروه‌ها ممکن است عامل تغییراتی در میزان استروژن باشد که توجیه آن به آسانی امکان پذیر نباشد.

گزارش نصری و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد، عصاره میوه گیاه پنج انگشت سبب کاهش میزان هورمون تستوسترون در سرم خون موش‌های نر می‌شود که بیشترین کاهش در دوز ۳۶۵ میلی گرم بر کیلو گرم بوده است هر چند گزارش این محققین بر حیوان نر می‌باشد ولی با نتایج تحقیق حاضر هم خوانی دارد [۱۳]. مصرف عصاره گیاه نیز ممکن است سبب افزایش فعالیت آنزیم آروماتاز شده باشد و با آروماتیزاسیون

References

- [1] Bergmann J, Luft B, Boehmann S, Runnebaum B, Gerhard I, The efficacy of the complex medication Phyto-Hypophyson L in female, hormone-related sterility. A randomized, placebo-controlled clinical double-blind study. *Forsch komplementarmed klass naturheilkd* 7 (2000) 190-9.
- [2] Elizabeth M, Leslie N S, Critch E A, Managing Polycystic Ovary Syndrome: A Cognitive Behavioral Strategy. *Nursing for Women's Health* 13 (2009) 292-300.
- [3] Gerhard I I, Patek A, Monga B, Blank A, Gorkow C, Mastodynon (R) bei weiblicher Sterilität. *Forsch Komplementarmed* 5 (1998) 272-8.
- [4] Hafez, E. S. E. (1970). *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Philadelphia: Lea and Febiger. P: 22-116, 147-155, 302-303.

- [5] Kacsoh B, *Endocrine physiology*. Philadelphia: McGraw-Hill; 2000.
- [6] Kafali H, Iridam M, Ozardali I, Demir N, Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res* 35 (2004) 103-108.
- [7] Kazerooni T, Asadi N, Dehbashi S, Zolghadri J, Effect of folic acid in women with and without insulin resistance who have hyperhomocysteinemic polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet*. 101 (2008) 156-160.
- [8] Liu J, Burdette JE, sun Y and et al, Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of vitex agnus castus (Chaste-berry). *Phyto medicine* 11 (2004) 18-23.
- [9] Malaivijitnond S, Patthama K, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K, Different effects of pueraria mirifica, a herb containing phytoestrogens on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rat. *J Pharmacol Sci*, 96 (2004) 428- 435.
- [10] Marshall K, Candidate ND, Polycystic Ovary Syndrome: Clinical Considerations. *Altern Med Rev* 6 (2001) 272-292.
- [11] Marx TL, Mehta AE. Polycystic ovary syndrome: pathogenesis and treatment over the short and long term. *Cleveland Clinic J Med* 70 (2003) 31-45.
- [12] Milewicz A, Gejdel E, Sworen H, Sienkiewicz K, Jedrzejak J, Teucher T, Schmitz H, vitex agnus castus extracted in the treatment of luteal phase defect due to latent hyperprolactinemia. *Arzneimittelforschung* 43 (1993) 752-756.
- [13] Nasri S, Oryan Sh, Haeri Rohani A, Amin GH, Taghizadeh M, The effects of Vitex agnus castus L. extract and interaction with bromocriptine on luteinizing hormone and testosterone in male mice. *Medical journal of Hormozgan university* 9 (2005) 113-118.
- [14] Nasserzadeh A, The effects of vitex agnus castus extract on the serum concentration of steroid hormones in female rats. Shiraz University. *Thesis of biology (animal science)* 2000. (in Persian)
- [15] Newall C, Anderson L, Phillipson J, *Herbal medicines*, 3rd ed, London, The Pharmaceutical Press 1996; pp: 19-20.
- [16] Palep-Singh M, Picton HM, Yates ZR, Barth JH, Balen AH, Plasma homocysteine concentrations and the single nucleotide polymorphisms in the methionine synthase gene (MTR 2756A>G): Associations with the polycystic ovary syndrome An observational study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 138 (2008) 180-186.
- [17] Russo M, Galletti G C, Medicinal properties and chemical composition of vitex agnus-castus L.: A review. *Acta Hort. (ISHS)* 426 (1996) 105- 112.
- [18] Singh KB, Persistent estrus rat models of polycystic ovary disease: an update. *Fertil Steril* 84 (2005) 1228-1234.
- [19] Speroff L, Fritz M. *Anovulation and the polycystic ovary*. *Clinical Gynecology Endocrinology and Infertility*. 2005; 7th Edition: 465-498.
- [20] Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS, The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 60 (2004) 1-17.
- [21] Webster D, Lu j, Chen S, Activation of the μ -opiate receptor by Vitex agnus-castus methanol extracts: Implication for its use in PMS. *J Ethnopharmacol*, 106 (2006) 216-221.