اثر عصاره الکلی گیاه آب بشقابی بر غلظت سرمی تستوسترون، FSH و LH در موش صحرایی نر نژاد ویستار

مجید جاسمی[1] ، قاسم ساکی[2] ، فاخر رحیم[3]

[1] استادیار گروه ارولوژی، بیمارستان گلستان ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه جندی شاپور اهواز

[2] دانشیار جنین شناسی و بافت شناسی، گروه علوم تشریحی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز

[3] کارشناس ارشد بیوانفورماتیک، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه جندی شاپور اهواز

نشانی نویسنده مسؤول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی، دکتر قاسم ساکی
E-mail: ghasemsaki@yahoo.com

وصول:۸۷/۱۰/۳۰، اصلاح:۸۸/۱/۲۲، پذیرش:۸۸/۲/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: تعداد اسپرم‌ها و قدرت باروری آن‌ها به سطح هورمون‌های آندروژنی خون وابسته است. بنابراین احتمال می‌رود که عصاره گیاه آب بشقابی بر سطح هورمون‌های مؤثر در روند اسپرماتوژنز اثر بگذارد. به همین منظور، مطالعه‌ای با هدف تعیین اثر عصاره الکلی گیاه آب بشقابی (Centella asiatica (L.) Urban.) بر غلظت سرمی تستوسترون، FSH و LH موش صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ٤٠ سر موش صحرایی نر در پنج گروه (گروه کنترل،گروه شم وگروه‌های تجربی که به ترتیب مقدار۱۰، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم عصاره به مدت ٤٠ روز دریافت کردند) تقسیم شدند. ٢٤ ساعت بعد از آخرین روز تجویز عصاره، ۳ تا ٤ میلی‌لیتر خون از بطن قلب هر موش جمع‌آوری شده سپس با استفاده از روش رادیوایمنواسی، غلظت سرمی هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH اندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست آمده در نرم‌افزار SPSS.13 توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین و انحراف معیار غلظت تستوسترون در گروه کنترل و شم به‌ترتیب برابر ۲/۱۸ ±۱٦/٤ و ۱٤/۱±۰/۰۹ بود و در گروه‌های تجربی که مقدار ۱۰، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم/ بر کیلوگرم عصاره دریافت کردند، به‌ترتیب برابر با ۱/۳۲±۱۵ ، ۰/۰۵±۹/۸ و ۰/۳۱± ۸/٤ نانومول بر لیتر بود. میانگین غلظت تستوسترون در گروه دریافت‌کننده عصاره به میزان ۵۰ و ۸۰ به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل ($p<۰/۰۰۱$ و $p<۰/۰۰۸$)، شاهد ($p<۰/۰۰۳$ و $p<۰/۰۰۱$) و نسبت به گروه دریافت‌کننده ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافته بود ($p<۰/۰۰٤$ و $p<۰/۰۲$). بین دو گروه دریافت‌کننده عصاره به میزان ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم، این اختلاف معنادار نبود ($p>۰/۰۹$). غلظت هورمون‌های FSH و LH در تمام گروه‌های تجربی، اختلاف معناداری در مقایسه با گروه کنترل و شاهد نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی آب بشقابی با تأثیر بر سلول‌های لیدیگ و اختلال در ترشح هورمون تستوسترون تعداد اسپرم‌ها و نیز با تأثیر بر اپی‌دیدیم، تحرک و قدرت باروری آن‌ها را کاهش می‌دهد. ***(مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره۱۶/شماره ۱/ صص ۱۱-۶).***

واژه‌های کلیدی: *آب بشقابی؛ تستوسترون؛ FSH؛ LH؛ موش صحرایی.*

مقدمه

گیاه آب بشقابی(Centellae Asiatica) که از خانواده چتریان (Apiaceae) است، گیاهی پایا و علفی بوده و در محل بندها ریشه زاست (۱). این گیاه با توجه به منابع معتبر، مشاهدات محققین و نمونه‌های دقیق هرباریومی تاکنون پراکندگی فراتر از محدوده تالاب بندر انزلی برای آن گزارش نشده است (۲,۳). این‌گونه گیاهی نیازمند رویش در بخش‌های نمناک و مرطوب حواشی تالاب است (٤). زمان رویش و گل‌دهی این گیاه در اردیبهشت و خرداد و زمان میوه‌دهی آن در تیر و مرداد است (٤). عصاره این گیاه دارای ترکیبات متعددی است که شامل آمینواسیدها، اسیدهای چرب، فلاونوئیدها (کویرستین،کامپرول)، مادکاسسول، اسید مادکاسسیک، تانن،گلیکوزیدهای مختلف ایندوسنتالوزید، براهموزید، براهمینوزید، اسید اسیاتیک، اسید آسیاتیسنوتیک، اسید سنتویک، اسید سنتلیک، ایزوتانکونزید و فیتواسترول می‌باشد (٥,٦). ترکیبات اصلی این گیاه اسید اسیاتیک و اسید مادکاسسیک و سایر مشتقات گلیکوزیدهای استری ترینی، آسیاتیاکوزید و مادکاسوزید است (۱).

گیاه آب بشقابی که آن را در گذشته‌های دور عصاره معجزه‌آسای حیات می‌نامیدند، از هزاران سال پیش در کشورهایی همچون هند، چین، اندونزی ، سری لانکا و در جنوب آفریقا برای درمان بیماری‌های مختلف همچون سفیلیس، جذام، روماتیسم، صرع و بیماری‌های مغزی به‌طور وسیعی استفاده می‌شد. هم‌چنین برای افزایش هوش، طولانی شدن عمر و تقویت حافظه، درمان آسیب‌های پوستی ناشی از اثر اشعه، بهبود زخم و سوختگی، بی‌خوابی و التهابات پوستی استفاده شده است (۱۱-۷). در حال حاضر، در کشورهای هندوستان و چین از عصاره بشقاب آبی به عنوان داروی ضد بارداری برای انسان استفاده می‌شود (۱۲). هم چنین مطالعات تجربی انجام شده نشان داده است که در صورت تجویز خوراکی این عصاره به موش صحرایی نر کاهش معناداری در میزان اسپرماتوزوئیدهای زنده، متحرک و ذخیره اسپرماتوزوئیدهای اپی‌دیدیم ایجاد می‌شود (۱۲). مکانیسم اثر عصاره این گیاه بر روند اسپرماتوژنز تاکنون مشخص نشده است اما به‌نظر می‌رسد که با توجه به این‌که رشد و تمایز اسپرم‌ها و هم چنین قدرت بارورسازی آن‌ها و حتی تعداد آن‌ها به سطح هورمون‌های آندروژنی وابسته است (۱۳)، این عصاره باعث بر هم خوردن تعادل هورمونی شود.

لذا با توجه به این که مسأله کنترل جمعیت در رأس برنامه بسیاری از کشورهای جهان بوده و مسؤولان بهداشت در این کشورها تلاش می‌کنند تا با ارائه روش‌های نوین جلوگیری از بارداری این امر مهم را به مرحله اجرا درآورند، هم چنین با توجه به این که این عقیده که جلوگیری از بارداری به عهده زن است، در حال تغییر بوده و این تغییر همراه با پیشرفت در شناخت فیزیولوژی دستگاه تولید مثل مردان می‌باشد، اما داروی ضد باروری که تأثیر ناگواری بر صفات ثانویه و تمایلات جنسی مردان نداشته و بدون عوارض جانبی باشد، در دسترس نیست تصمیم گرفته شد تا در رابطه با اثر عصاره گیاه آب بشقابی بر سطح هورمون‌های مؤثر در روند اسپرماتوژنز مطالعه‌ای صورت گیرد و در جهت افزایش دانسته‌ها در مورد گیاه آب بشقابی که احتمالاً در آینده به‌عنوان یک ماده ضد بارداری مردانه معرفی شود، گامی برداشته شود.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و حیوانات آزمایشگاهی: در این پژوهش تجربی، از ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۱۲-۱۰ هفته و با وزن تقریبی۱۰±۲۰۰ گرم که از مرکز تکثیر و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه جندی شاپور اهواز و پس از دریافت مجوز از کمیته اخلاق پزشکی خریداری شده بودند، از شهریور ماه سال ۱۳۸٦ تا مهر ماه سال ۱۳۸۷ استفاده شد. حیو انات در مرکز نگه‌داری حیوانات گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی در

دمای معمولی (۲±۲۳) و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. غـذای مـورد اسـتفاده حیوانات به صورت غذای آمـاده مـوش از شـرکت دام و طیور پارس تهیه گردید و به شـکل Pellet بـه همـراه آب تصفیه شده شهری در آبخور هـای مخصـوص در اختیـار آن‌ها قرار گرفت. موش‌های صـحرایی حـدود ۲٤ سـاعت قبل از انجام آزمایش از لحاظ میزان آب مصرفی طی یـک روز تحت نظر قرار گرفتند تا میزان دوز دریافتی عصاره از طریق آب روزانه محاسـبه شـود. میـزان آب مصـرفی هـر موش حدود ۳۵ میلی لیتـر در روز بـود. هـم‌چنـین نتـایج حاصل از آزمایشات انجام شده جهت تعیین سـمیّت حـاد (LD50) نشان داد که دوزهای کمتـر از mg/kg ۸۰ بـه - عنوان دوزهای غیر کشنده محسوب می‌شوند.

حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند و در هر گروه ۸ حیوان قرار داشت:

الف-گروه کنتـرل: ایـن حیوانـات آب آشـامیدنی بـدون عصاره و حلال دریافت کردند.

ب-گروه شم: این حیوانات تنها آب آشامیدنی بـه همـراه حلال دریافت کردند

ج) گروه تجربی(۱) تا (۳): به ترتیب مقـدار mg/kg ۱۰، mg/kg ۵۰ و mg/kg ۸۰ عصـاره بـه‌صـورت خـوراکی و روزانه دریافت کردند و این کار تا ٤۰ روز ادامه یافت.

۲٤ ساعت بعد از آخرین روز تجویز عصاره بـه-وسیله بی‌هوشی با اتر از هر موش حدود ۳ تا ٤ میلی لیتـر خون از ناحیه بطن قلب و در لوله‌های آزمایش تمیـز کـه فاقد ماده ضدانعقادی بـود، جمـع‌آوری شـد. نمونـه‌هـای جمع‌آوری شده به مدت ۱۵ دقیقه بـا سـرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس با استفاده از سمپلر سـرم در هر نمونه از لخته جدا و تا زمان سنجش هورمـونی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گـراد بـرای انـدازه‌گیـری غلظـت سرمی هورمون‌هـای تستوسـترون، FSH و LH نگـه‌داری شدند. اندازه‌گیری هورمونی بر اساس روش‌هـای معمـول آزمایشگاهی یعنی استفاده از روش رادیوایمنواسـی انجـام شد.کیت‌های هورمونی مورد اسـتفاده در ایـن تحقیـق کـه شامل محلول‌های استاندارد، یـد رادیواکتیـو،آنتی بـادی و بافر شستشو بود، همگی از شـرکت کاوشـیار (وابسـته بـه سازمان انرژی اتمی) خریداری و تهیه گردید.

در روش رادیوایمونواسی اساس کار بر این اسـت که ابتدا سرم خون بدون مواد نشان‌دار در ظرفی ریختـه و سپس هورمون نشان دار شده به آن اضافه می‌شد. هـر دو آنتـی ژن بـرای وصـل شـدن بـه آنتـی بـادی نشـان‌دار و استاندارد که به محلول اضافه می‌شود بـا یکـدیگر رقابـت می‌کنند. در این مراحل، ابتدا آنتی‌بادی با آنتی‌ژن غیرنشان-دار متصل شده و اضافی آن به آنتـی ژن نشـان‌دار متصـل می‌گردد. محلول بالایی موجود در ظرف را که حاوی آنتی ژن نشان‌دار آزاد و آنتی‌ژن غیر نشان دار و متصل به آنتی-بادی است، دور ریخته و رسوب آن کـه حـاوی آنتـی ژن نشان دار و متصل به آنتی بادی است، در تـه ظـرف بـاقی می‌ماند. رسوب حاصله در دستگاه گاماکانتر قرار گرفتـه و اعداد حاصله که نشان‌دهنده میزان آنتی ژن متصل به رادیو اکتیو است خوانده می‌شد. این اعداد هر چه بیشـتر باشـد نشان دهنده این است که مقدار هورمون در سرم کم است زیرا باعث شده که مقدار بیشتری از آنتی ژن‌های نشان‌دار به آنتی بادی استاندارد و نشان دار متصل شود (١٤).

جمع‌آوری گیاه: گیـاه آب بشـقابی در خـرداد مـاه سـال ۱۳۸٦ از مناطق مرطوب اطراف مرداب‌هـای بنـدر انزلـی جمع‌آوری شد و توسط متخصص گیاه شناسـی دانشـکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز شناسایی و تأیید گردید. به منظور خشک کـردن گیـاه جمـع‌آوری شـده، گیـاه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در سایه قرار داده شد.

استخراج عصاره: به منظور استخراج عصـاره، ابتـدا گیـاه خشک شده به وسیله آسیاب برقی به پودر تبـدیل شـد و در ظرف مخصوص ریخته شد. سپس در مراحل مختلـف به آن کلروفرم، اتر و متانل اضافه گردید و بعد از گذشـت حدود ۲٤ ساعت، محتویات حاصله با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوبات جدا گردید. بـا

کمک دستگاه حذف حلال در خلأ و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، حلال اضافی تبخیر گردید. عصاره‌های حاصله به پلیت‌های جداگانه و روی بن ماری با حرارت ملایم خشک گردید (۱۵). غلظت‌های مناسب عصاره قبل از تجویز به حیوانات تهیه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به‌دست آمده در بررسی های هورمونی بین گروه های تجربی و کنترل به صورت میانگین و انحراف معیار بررسی شد. از آزمون‌های آنالیز واریانس و توکی در نرم‌افزار SPSS.13 برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج و مقایسه گروه های تجربی و کنترل استفاده شد. ارزش p کمتر از ۵ صدم معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار غلظت تستوسترون در گروه کنترل و شم به ترتیب برابر ۱۶/٤±۲/۱۸ و ۱٤/۱±۰/۰۹ (جدول ۱) و در گروه‌های تجربی که مقدار ۱۰ و، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دریافت کردند به ترتیب برابر با ۱۵±۱/۳۲، ۹/۸±۰/۰۵ و ۸/٤±۰/۳۱ نانومول بر لیتر بود. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که میانگین غلظت تستوسترون در گروه دریافت‌کننده عصاره به میزان ۵۰، به‌طور معناداری نسبت به سایر گروه‌های کنترل (p<۰/۰۰۱)، شاهد (P<۰/۰۰۳) و گروه دریافت‌کننده عصاره به مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلو-گرم کمتر بود (p<۰/۰۰٤).

میانگین غلظت تستوسترون در گروه دریافت‌کننده عصاره به میزان ۸۰ ، به‌طور معناداری نسبت به سایر گروه‌های کنترل (p<۰/۰۰۸)، شاهد (p<۰/۰۰۱) و گروه دریافت‌کننده عصاره به مقدار۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش یافته بود (p<۰/۰۲). هم‌چنین بین دو گروه دریافت‌کننده عصاره به میزان ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم این اختلاف معنادار نبود (p>۰/۰۹).

میانگین و انحراف معیار غلظت هورمون FSH در پنج گروه مورد مطالعه به‌ترتیب برابر۱/۱۱±۲۳/۲، ۳/۲۲±۲٤/٤، ۱/۸۸±۲۲/٦، ۱/۲۰±۲۰/۹ و ۲/۸۱±۲٤/۰٤ واحد در لیتر می‌باشد. اما آزمون‌های آماری انجام شده تفاوت معناداری را در پنج گروه نسبت به همدیگر نشان نداد. میانگین و انحراف معیار غلظت هورمون LH به - ترتیب برابر ۲/۱۱± ۱٦/٤، ۱/۱۰± ۱۷/۷ و ۱/۰٦±۱۹ در سه گروه دریافت‌کننده عصاره به میزان ۱۰، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. هم‌چنین در گروه کنترل و شاهد به‌ترتیب برابر ۰/۰۹±۱۹/٤ و ۱/۸۳±۱۸/۹ واحد در لیتر است. گروه‌های تجربی مورد مطالعه اختلاف معناداری در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد نشان ندادند.

بحث

در مطالعه حاضر که به تأثیر عصاره الکلی بر میزان هورمون‌های مؤثر بر روند اسپرماتوژنز پرداخته است، مشاهده گردید که در صورت تجویز عصاره به میزان ۵۰ mg/kg و ۸۰ mg/kg ترشح هورمون تستوسترون به-طور معناداری کاهش می‌یابد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که این هورمون به‌طور مستقیم بر سلول‌های سرتولی تأثیر می‌گذارد. سلول سرتولی با ترشح مایع لوله‌ای (Tubular Fluid) به تغذیه سلول‌های جنسی در حال تقسیم کمک

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار غلظت هورمون‌های تستوسترون،FSH و LH در موش‌های صحرایی نر مورد مطالعه

غلظت هورمون‌ها / گروه مورد مطالعه	غلظت تستوسترون Nmol/l	غلظت FSH IU/I	غلظت LH IU/I
گروه کنترل	۱۶/٤ ± ۲/۱۸	۲۳/۲ ±۱/۱۱	۱۹/٤±۰/۰۹
گروه شاهد	۱٤/۱ ±۰/۰۹	۲٤/٤ ±۳/۲۲	۱۸/۹±۱/۳۸
	۱۵±۱/۳۲	۲۲/۶±۱/۸۸	۱۶/٤±۲/۱۱
گروه تجربی	۹/۸±۰/۰۵	۲۰/۹±۱/۲۰	۱۷/۷±۱/۱۰
	۸/٤±۰/۳۱	۲٤/۰٤±۲/۸۱	۱۹±۱/۰۶

می‌کند. هم‌چنین پروتئین‌های متعددی همچون فاکتورهای رشد، ترانسفرین و غیره را ترشح می‌نماید که هر کدام از این‌ها در تقسیم سلول‌های جنسی و در نهایت در تولید اسپرم نقش ویژه‌ای دارند. هورمون تستوسترون نقش دیگری هم دارد و آن اثر مستقیم بر سلول‌های جنسی در حال تقسیم است (١٦). با توجه به نقش مهم هورمون تستوسترون در روند اسپرماتوژنز، واضح است که در صورت کاهش ترشح این هورمون تعداد اسپرم‌ها کاهش یابد.

در تأیید کاهش هورمون بعد از تجویز عصاره آب بشقابی، نتایج حاصل از یک مطالعه تجربی نشان داده است که در صورت تجویز عصاره گیاه بشقاب آبی به موش صحرایی اسپرم‌های زنده و متحرک و هم‌چنین تعداد آن‌ها در دم اپی دیدیم به‌طور معناداری کاهش می‌یابند (١٢). هم‌چنین در تحقیقی که توسط دوتا و باسو بر موش‌های نر صورت گرفت نیز اثر ضدناباروری عصاره این گیاه به‌صورت خوراکی را نشان داد (١٧). همچنین در مطالعه دیگری که توسط ماهانم و نورازالی در سال ٢٠٠٤ انجام شد، اثر عصاره این گیاه بر بافت بیضه و کیفیت اسپرم در موش نیز نشان داده شد (١٨).

از نتایج دیگر مطالعه حاضر این است که با خوراندن عصاره به موش‌های صحرایی در میزان ترشح هورمون FSH تغییر معناداری مشاهده نگردید. این هورمون از هیپوفیز قدامی ترشح می‌شود و به طور مستقیم بر سلول‌های سرتولی تأثیر می‌گذارد. مطالعات دیگر نشان داده است که این هورمون در جهت آغاز روند اسپرماتوژنز در موش صحرایی و ادامه آن نقش مهم و اساسی دارد (١٨,١٩). این که عصاره گیاه آب بشقابی میزان سطح سرمی هورمون FSH را تغییر نمی‌دهد، نشان‌دهنده این است که عصاره آب بشقابی بر غده هیپوفیز و محور هیپوفیز – گناد تأثیر نمی‌گذارد. همین موضوع در مورد ترشح هورمون LH نیز صادق است، یعنی این که تجویز عصاره آب بشقابی سطح سرمی هورمون LH را تغییر نمی‌دهد. این هورمون مستقیماً بر سلول‌های بینابینی تأثیر گذاشته و ترشح هورمون تستوسترون را تحریک می‌کند (١٦).

اکنون این سؤال مطرح می‌شود که چگونه است که سطح سرمی هورمون تستوسترون کاهش می‌یابد اما سطح هورمون‌های FSH ، LH در سرم تغییر نمی‌کند؟ علت شاید این باشد که تجویز عصاره برای یک دوره اسپرماتوژنز و حدود ٤٠ روز بود و این امر از نقاط ضعف این مطالعه است. اما چرا بعد از تأثیر عصاره، حرکت اسپرم‌ها کاهش می‌یابد (١٢) شاید بتوان گفت که این عصاره می‌تواند بر اپی دیدیم تأثیر بگذارد. مطالعات نشان داده است که فعالیت نرمال اپی دیدیم برای بلوغ شیمیایی اسپرم‌ها لازم و ضروری است. در اپی‌دیدیم است که پروتئین‌های متعددی ترشح می‌شوند و ترشح این هورمون‌ها به هورمون آندروژن وابسته است(٢٠). پس شاید بتوان نتیجه گرفت که بلوغ شیمیایی و تحرک اسپرم‌ها به هورمون تستوسترون وابسته است و با تغییر در مقدار آن به دلیل اثر عصاره آبی الکلی فعالیت اپی‌دیدیم نیز مختل شده و در نتیجه حرکت اسپرم‌ها کاهش می‌یابد. نگارندان این مقاله پیشنهاد می‌کنند که تأثیر دراز مدت عصاره الکلی آب بشقابی بر هورمون‌های دخیل در روند اسپرماتوژنز مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از سرکار خانم لیدا مرادی کارشناس ارشد علوم تشریحی به دلیل همکاری در عصاره‌گیری اعلام می‌دارند.

References

1. World Health Organization. Monographs on selected medicinal plants. World Health Organization Geneve. 1998.

2. Taghizadeh M, Ahvazi M, Naghinezhad A. Determination of growth and distribution of centella asiatica in the anzali lagoon. Iranian J Pharm Res. 2004; 3(Supplement 2):66-66.
3. Jalili A, Jamzed Z. Red data book data of Iran, a preliminary survey of endemic, rare and endangered plant species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Publication, 1999; 215:pp.748

٤- تقی نژاد ع،تقی زاده م،اهوازی م.وضعیت گیاهان هیگروفیت و دارویی آب بشقابی (تیره چتریان)در ایران. دهمین کنفرانس سراسری زیست شناسی ایران. دانشگاه بوعلی سینا همدان.۱۳۸۳.

5. Gruenwald J, Brendler and Jaenicke C, editors. PDR for Herbal medicine. Second edition. Montvale (New Jersey): Medical economics Co; 2000.pp:729-31.
6. Fetrow CW, Avila JR. Professional Hand Book of complementary &Alternative therapies. Pnnsylvania: Spring House; 2001, pp: 239-40.
7. Kuhn MA, Winston D, DerMarderosian A. Herbal Therapy & Supplements: A Scientific & Traditional Approach: Lippincott; 2000; pp. 163-66.
8. Sastravaha G, Yotnuengnit P, BoonCong P, Sangherapitikul P. Adjunctive periodontal treatment with centella asiatica and punica granatum extracts. A preliminary study. J Int Acad Periodontal. 2003; 5:106-15.
9. Carpenter D. Professional guide to complementary and alternative therapies .Springhouse. Pensylvania.2002; pp: 239-240.
10. Corpoter DO. Nursing herbal medicine handbook. Pennsylvania: Sprinhouse; 2001; pp. 213-14.
11. Schultz V, Hansel R, Tyler V.Rational physiotherapy: a physician's guide to herbal medicine. Fourth edition.Springer.Germany.2000; pp: 337-8.

۱۲- حیدری م، جمشیدی ا، آخوندزاده ش، غفاری نوین م، صادقی م ر. اثر گیاه آب بشقابی بر اسپرماتوژنز رت. فصلنامه باروری و ناباروری.سال ۱۳۸۵ .صفحات ۳۷٤-۳٦۸.

13. Shetty J, Marathe GK, Ramaswamy S, Dighe RR. Pituitary gonadotropins regulate spermatogonial differentiation and proliferation in the rat.J.Biosci. 1996; 21: 81-92.
14. Bingel AS, Farnsworth NR. Botanical source of fertility regulation agents:, Chimistry and pharmacology. In: Briggs M & Corbin A, editors. Progress in hormone biochemistry and pharmacology. Lancaster: MTP Press; 1981; 1: PP.149-225

۱۵- فارماکوبه گیاهی ایران- کمیته تدوین فارماکوپه گیاهان ایران (مجری طرح دکتر نصرا... قاسمی دهکردی) ناشر: وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - معاونت غذا و دارو ۱۳۸۱: صفحات ۱۰۷- ۹۹

16. Carlson BM. Human embryology and developmental biology. 3rd edition. Philadelphia: Elsevier;.2004; pp:21-22.
17. Duta T, Basu UP. Crude extract of centella asiatica and products derived from its glycosides as oral antifertility agents. Ind J Exp Biol. 1968; 6: 181.
18. Mahanem MN, Norazalia MA. In Vivo Effects of Centella asiatica Leaf Extract on the Histology of Testis and Sperm Quality in Mice. Sains Malaysiana , 2004; 33 (2): 97-103. ISSN 01266039
19. Mclachlan RI. O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Krester DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys and man. Recent Prog Horm Res. 2002; 57:149-179.
20. O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. The endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neill JD, (ed), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (3rd ed). r, San Diego CA: Elsevie. 2006; pp. 1017-1069.