بررسی اثر عصاره‌ی الکلی دانه‌ی شنبلیله بر محور HPG و اسپرماتوژنز در موش آزمایشگاهی نر نژاد NMRI

عبدالحسین شیروی*، بهناز نجفی و هومن شجیعی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی، دامغان، ایران
مسئول مکاتبات: shiravi738@yahoo.com

چکیده

کنترل جمعیت یکی از مسائل مهم در جوامع می‌باشد که اغلب با استفاده از داروهای شیمیایی پیشگیری از بارداری انجام - میشود. امروزه دستیابی به روش‌های مطمئن‌تر که عوارض جانبی کمتری داشته باشد و همچنین توسط مردان کاربرد داشته باشند مورد توجه قرار گرفته است. این تحقیق سعی در بررسی اثرات دانه‌ی شنبلیله بر روی اسپرماتوژنز دارد. در این مطالعه، از موش آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI ، ۳ ماهه (وزن تقریبی۳ ±۳۰ گرم) استفاده گردید. حیوانات به ۴ گروه تجربی و یک گروه کنترل (هر گروه ۸ موش) تقسیم شوند. چهار گروه تجربی به مدت ۱۶ روز به ترتیب دوزهای ۷۰، ۱۴۰، ۲۸۰ و ۵۶۰ ، میکرولیتر بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره الکلی دانه شنبلیله دریافت کردند. در همین مدت گروه کنترل، سرم فیزیولوژی را به صورت درون صفاقی دریافت کردند. سپس در روز ۱۷ خونگیری به عمل آمد و میزان هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH مورد سنجش قرار گرفت. بعد از خونگیری، حیوانات هر گروه مورد مطالعات مورفومتریک و هیستولوژیک قرار گرفتند. وزن و حجم بیضه، وزن اپیدیدیم و تعداد اسپرم‌های موجود در اپیدیدیم مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی آماری از تست ANOVA استفاده شد و آزمون تکمیلی Tukey انجام شد ($P<0/05$). بین وزن و حجم بیضه و وزن اپیدیدیم گروه‌های تجربی با کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در میزان هورمون تستوسترون و LH بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ولی در میزان FSH بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. همچنین در میزان اسپرم موجود در اپیدیدیم بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی کاهش معنی- دار مشاهده شد. کاهش چشمگیر در میزان اسپرم‌ها در نتیجه کاهش میزان هورمون FSH نشانگر تأثیر دانه گیاه شنبلیله در کاهش فعالیت‌های تولیدمثلی جنس نر می‌باشد.

کلمات کلیدی: شنبلیله، موش آزمایشگاهی، بیضه، تستوسترون، LH، FSH

مقدمه

گیاهان دارویی به گستره‌ی وسیعی از گیاهانی اطلاق می‌شود که در درمان بیماری و یا در پیشگیری از بروز آن مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرزمین ایران به دلیل دارا بودن اقلیم‌های گوناگون و با اختلاف درجه حرارتی بیش از ۵۰ درجه سانتی‌گراد و برخورداری از حداقل ۳۰۰ روز آفتابی در سال در مقایسه با اکثر سرزمین‌های جهان یکی از بزرگترین گنجینه‌های گیاهان دارویی و معطر دنیاست [۶]. یکی از مسائل مهم در جامعه امروز مسئلهٔ کنترل جمعیت می‌باشد در حال حاضر پیشگیری از بارداری توسط زنان بیشتر از مردان انجام می‌شود که استفاده از داروهای شیمیایی برای زنان دارای عوارض جسمی و روحی خاص خود

می‌باشد به همین دلیل دستیابی به روشی مطمئن که عوارض جانبی کمتری داشته باشد و بار این مسئله را از روی زنان بردارد مورد توجه قرار گرفته است [۵]. یکی از همین روش‌ها سعی در پیدا نمودن داروهایی با منشأ گیاهی است که دارای عوارض کمتری می‌باشند. این پژوهش سعی در بررسی اثرات دانه‌ی شنبلیله بر روی اسپرماتوژنز داشته است و امید است که پژوهش در این زمینه بتواند دارویی جدید که در زمینه کنترل جمعیت بوسیله مردان مؤثر باشد را ارائه نماید چرا که در قرن حاضر داشتن جمعیت کمتر در یک جامعه باعث توزیع مناسب تر امکانات می‌شود.

مواد و روش کار

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه از موش های آزمایشگاهی (سوری) نر بالغ نژاد NMRI با وزن تقریبی۳ ±۳۰ گرم استفاده شد که از مؤسسهٔ واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه شده بودند. حیوانات در شرایط کنترل شده از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ ٪ نگهداری می‌شدند و در طی این مدت به آب و غذای کافی دسترسی داشتند.

روش عصاره‌گیری: بذر شنبلیله تهیه شده توسط مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی سمنان مورد شناسایی قرار گرفت. بذرها در سایه خشک گردیدند. دانه‌ها به کمک آسیاب برقی به صورت پودر درآمده و ۵۰۰ گرم از پودر داخل یک ارلن بزرگ ریخته شد و ۱۵۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۹۶ درصد از شرکت بیدستان به آن اضافه گردید. عمل خیساندن ۴ روز ادامه یافت و طی این مدت هر چند ساعت یک بار ارلن به خوبی تکان داده شد. بعد از اتمام زمان ذکر شده محتوای ارلن به تدریج بر روی کاغذ صافی قیف بوخنر ریخته شده و به کمک پمپ خلأ صاف گردید. سپس جهت کاهش حجم حلال و تغلیظ عصاره از دستگاه روتاری استفاده گردید. عمل تقطیر در خلأ با دور ۶۰rpm و دمای ۴۰درجه سانتی گراد انجام شد.

روش کار: حیوانات در ۴ گروه تجربی که به آنها دوزهای مختلف از عصاره‌ی بذر شنبلیله [۷۰، ۱۴۰، ۲۸۰ و ۵۶۰ میکرولیتر] به مدت ۱۶ روز تزریق شده بود و یک گروه کنترل که به آنها نرمال سالین در طی این مدت تزریق شد تقسیم شدند و از آنها در روز ۱۷ خونگیری به عمل آمد و میزان هورمون-های FSH، LH و تستوسترون اندازه‌گیری شد. سپس جهت انجام بررسی‌های مورفومتریک شکم حیوانات باز شده و اندام های تناسلی دو طرف شامل بیضه و اپیدیدیم خارج گردید. وزن بیضه و اپیدیدیم توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم سنجیده شد و با کمک کولیس قطر بیضه‌ها اندازه-گیری شد. دم اپیدیدیم نیز برای شمارش اسپرم جدا شد و با استفاده از پیپت ملانژور و لام نئوبار و میکروسکوپ نوری تعداد اسپرم‌ها شمرده شد سپس بیضه‌ها به فیکساتیو بوئن منتقل شدند و مراحل تثبیت و آبگیری انجام شد و از نمونه‌ها برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شده و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد تا نمونه‌ها قابل بررسی با میکروسکوپ گردند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون واریانس یک

طرفه ANOVA و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey بررسی شدند.

نتایج

نتایج بررسی‌های مورفومتریک: در این بررسی تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی در وزن اپیدیدیم، حجم بیضه و وزن بیضه مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین ± انحراف معیار میزان وزن بیضه، حجم بیضه، وزن اپیدیدیم در بین گروه‌های تجربی و گروه کنترل

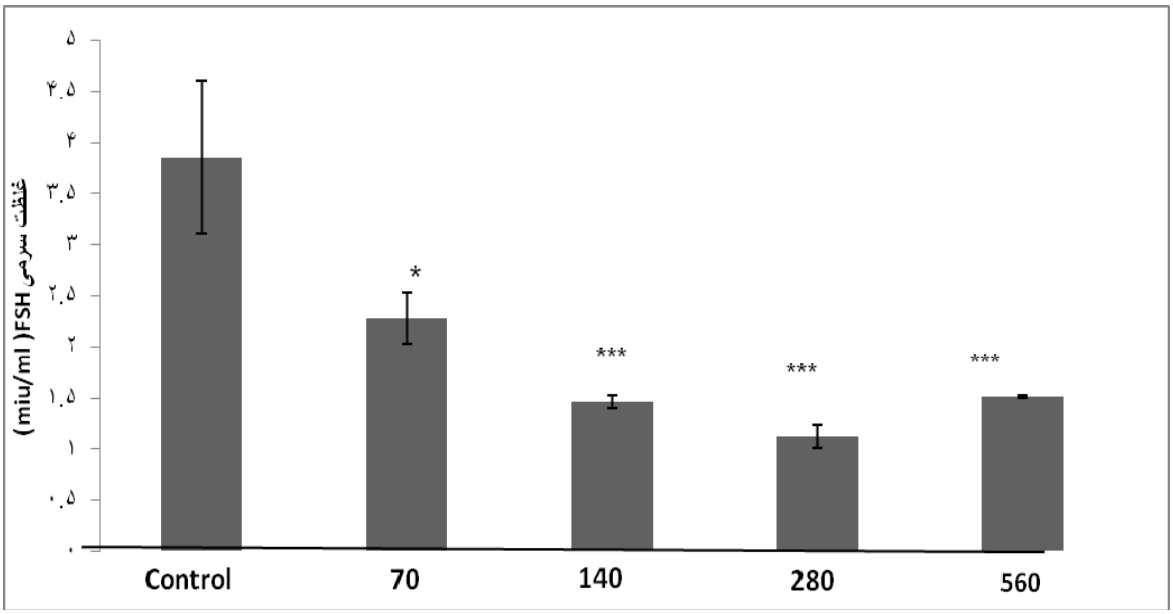
Group	وزن اپیدیدیم mg	وزن بیضه gr	حجم بیضه mm3
control	۰/۷۸۴۵ ± ۰/۰۰۷	۰/۱۲۱۵ ± ۰/۰۰۶	۰/۷۶۶۰ ± ۰/۰۳۱
Exp1 (dosage70) microliter	۰/۷۱۳۶ ± ۰/۰۰۵	۰/۱۱۰۵ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۴۲۱۴ ± ۰/۰۱۷
Exp2 (dosage 140) microliter	۰/۵۸۳۹ ± ۰/۰۰۸	۰/۱۱۲۳ ± ۰/۰۰۶	۰/۴۵۹۰ ± ۰/۱۸۷۴
Exp3 (dosage 280) microliter	۰/۵۳۵۱ ± ۰/۰۰۵	۰/۱۱۰۴ ± ۰/۰۰۵	۰/۲۲۲۹ ± ۰/۰۰۹۱
Exp4 (dosage 560) microliter	۰/۶۱۴۷ ± ۰/۰۰۷	۰/۱۲۰۹ ± ۰/۰۰۵	۰/۲۶۷۴۹ ± ۰/۱۰۹

نتایج سنجش هورمونی: در این بررسی کاهش معنی‌داری در میزان هورمون FSH در تمام دوزهای مختلف تزریق شده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (نمودار۱). در میزان هورمون LH و تستوسترون تفاوت معنی‌داری در هیچ کدام از گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل ایجاد نگردیده است (نمودار ۲ و ۳).

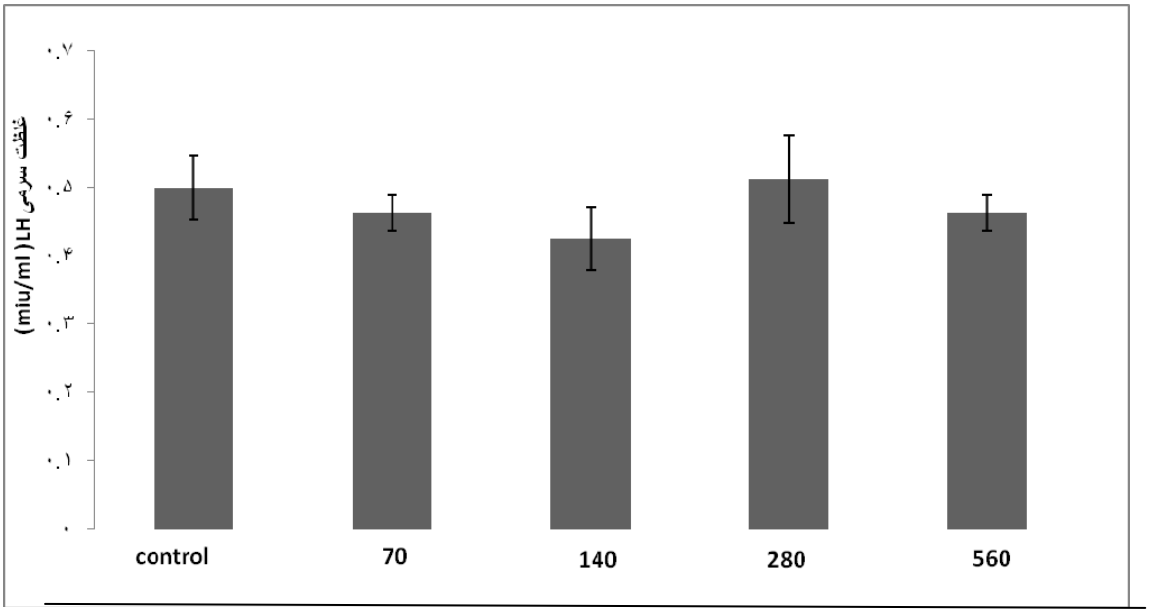
نتایج بررسی‌های هیستولوژیک: نتایج نشان داد در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تفاوت معنی داری در هیچ کدام از گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل ایجاد نگردیده است. در تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت کاهش معنی‌داری در تمام گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل ایجاد گردیده است ولی در تعداد سلول‌های اسپرماتید کاهش معنی‌داری فقط در دوز ۲۸۰ میکرولیتر در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.

نتایج شمارش اسپرم و مشاهدات کیفی اسلایدهای میکروسکوپی: نتایج نشان می‌دهد در تعداد اسپرم-های موجود در اپیدیدیم کاهش معنی‌داری بین گروه‌های تجربی و کنترل ایجاد گردیده است (نمودار ۴). همچنین در مشاهدات میکروسکوپی یک بی‌نظمی عمومی در قسمت‌های مختلف بافت

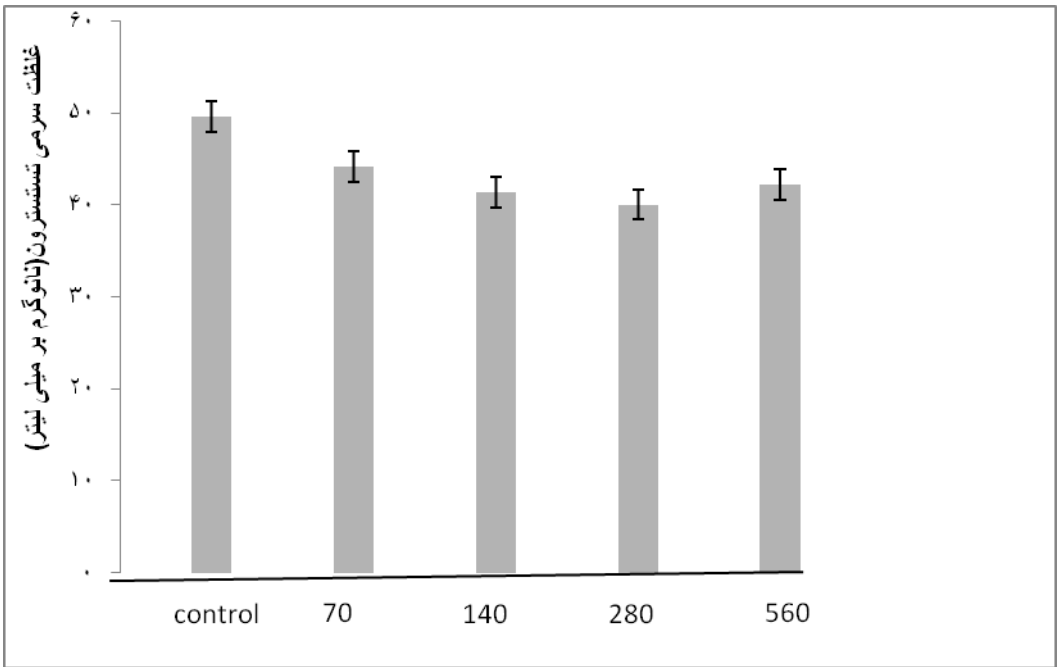
زاینده و لوله‌های اسپرم‌ساز به خصوص در دوزهای ۲۸۰ و ۵۶۰ میکرولیتر مشاهده گردید.



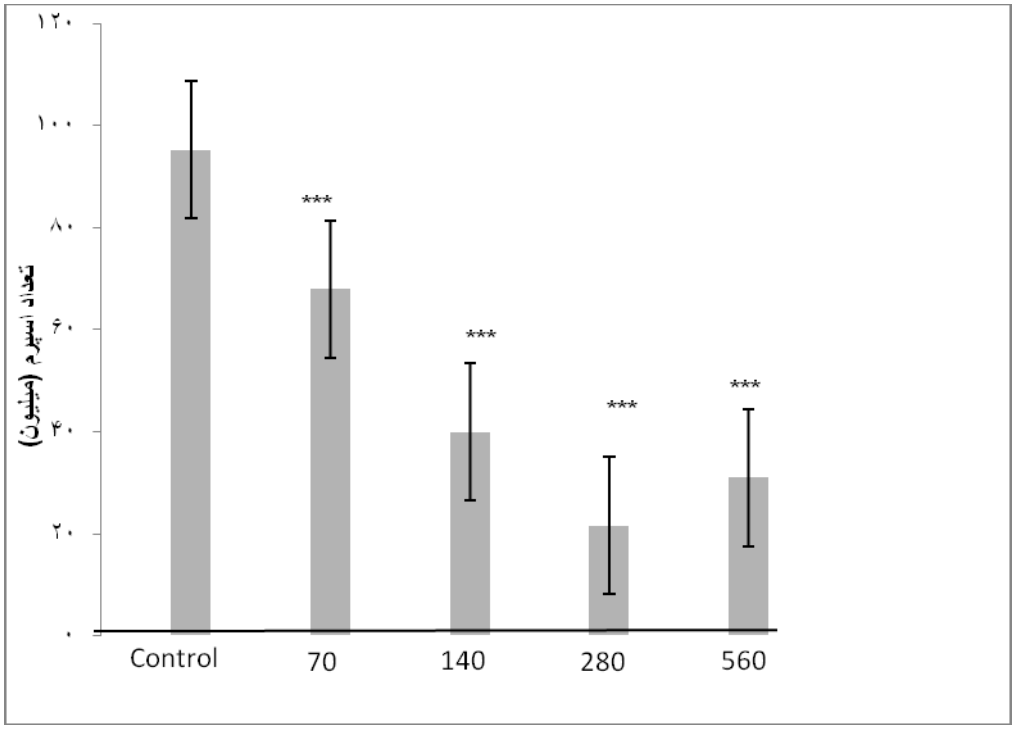
نمودار ۱ـ مقایسه میانگین± انحراف معیار غلظت هورمون FSH سرم خون بین گروه‌های مختلف (علامت *،**و*** به ترتیب نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه‌های تجربی در سطح $P\leq0.05$ و $P\leq0.01$ و $P\leq0.001$ می‌باشد)



نمودار ۲ـ مقایسه میانگین ± انحراف معیار غلظت هورمون LH سرم خون بین گروه‌های مختلف (علامت * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه‌های تجربی در سطح $P\leq0.05$ می‌باشد)



نمودار ۳ـ مقایسه میانگین ± انحراف معیار غلظت هورمون تستوسترون سرم خون بین گروه‌های مختلف (علامت * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه‌های تجربی در سطح $P\leq0.05$ می باشد)



نمودار ۴ـ مقایسه میانگین ± انحراف معیار تعداد اسپرم بین گروه‌های مختلف (علامت *** نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه تجربی در سطح $P\leq0.001$ می‌باشد)

بحث

شنبلیله از جمله گیاهان دارویی است که در منابع طب سنتی خواص درمانی مختلفی برای آن ذکر شده است. نتایج تحقیق حاضر نشانگر تأثیر عصاره الکلی بذر شنبلیله بر میزان تغییرات هورمون‌های گنادوتروپین و تستوسترون و بررسی اثرات آن بر اسپرماتوژنز در موش سوری نژاد NMRI می‌باشد. به علّت موقعیت حساس نورون های هیپوتالاموس و کنترل آن‌ها روی هیپوفیز و در نتیجه بسیاری از عملکردهای بدن، بیشتر محرک‌های خارجی که روی مغز اثر می‌گذارند، روی عملکرد هیپوفیز و در نتیجه بسیاری از بافت‌ها و اعضای بدن نیز اثر می گذارند [۲ و ۱۰] . در این تحقیق مشخص شد که تزریق عصارهٔ الکلی شنبلیله به موش ها به مدت ۱۶ روز باعث کاهش هورمون هیپوفیزیFSH می‌شود، ولی در میزان هورمون LH و تستوسترون بین گروههای تجربی و کنترل تغییر معنی‌داری مشاهده نشد و این هورمون‌ها تقریباً ثابت ماندند. ترکیبات شنبلیله شامل۴۰/۷۲ ٪ مواد نشاسته ای ،۲۸/۹۱ ٪ قند و ۷ ٪ مواد چربی و مقدار زیادی مواد فسفر دار، کولین و آلکالوئیدی به نام تری گونلین با ترکیبی مشابه به اسیدنیکوتینیک می‌باشد. در ضمن مقداری کومارین، ساپونین، تانن و یک ماده زرد رنگ در آن یافت می-شود [۱۲]. آلکالوئیدها به علت دارا بودن عامل آمین اغلب دارای خاصیت بازی هستند و این خاصیت مربوط به وجود جفت الکترون آزاد روی نیتروژن می‌باشد [۲۰] .تری گونلین موجود در شنبلیله جزء آلکالوئید های هتروسیکلیک بوده و جزء مشتقات پیریدین محسوب می‌شود. بیوسنتز آلکالوئیدها بر پایه تشکیل اسیدهای آمینه استوار است هماهنگی خاصی بین تشکیل آلکالوئیدها و اسیدهای آمینه‌ی اورنیتین و لیزین وجود دارد که از اسیدآمینه‌ی اورنیتین، آلکالوئیدهای پیرولیزیدین مثل تری‌گونلین ساخته می‌شود ساپونین و تری‌گونلین جزء آلکالوئیدها هستند و از سدّ خونی – مغزی عبور کرده و به نظر می‌رسد که روی سیستم اعصاب مرکزی اثر گذاشته و توسط عامل آمین خود روی قسمت غیر قندی هورمون FSH اثرگذار باشند [۱۷و۲۱] . همچنین این گیاه دارای ساپونین است که فعالیت هیپوکلسترلیکی را به عهده دارد [۱۸] .کومارین جزء فنولوئیدها است که در ساختمان آنها فنول وجود دارد و فرآورده های اصلی آنها اسیدهای آمینه معطر فنیل آلانین ، تیروزین و تریپتوفان است واکنش های متعدد کومارین احتمالاً به علّت کربن غیر اشباع شماره ۳ آن می‌باشد. کومارین و تانن موجود در شنبلیله دارای اثرات استروژنیک می‌باشند می‌توان احتمال داد که اثرات استروژنیک می‌باشند و بنابرین می توان احتمال داد که اثرات استروژنیک موجب گسستگی فرآیند اسپرماتوژنز و کاهش تراکم اسپرم می گردد[۸] . از آنجا که انسولین و FSH از جنس پروتئین می باشند و اثر شنبلیله بر روی انسولین مشخص شده است احتمال می رود که میزان کاهش FSH بستگی زیاد به ساختمان پروتئینی این هورمون داشته باشد که شنبلیله بر روی آن مؤثر واقع می‌شود. هورمون‌های LH و FSH از جنس گلیکوپروتئین می‌باشند. اما باید دانست که مقدار کربو هیدرات ترکیب شده با پروتئین در ملکول آنها به طور قابل ملاحظه ای در شرایط متفاوت تغییر می کند و می تواند قدرت فعالیت آنها را تغییر دهد [۹] . به نظر می رسد احتمالاً شنبلیله به علت وجود تری گونلین و دارا بودن هیدراتهای کربن زیاد در و همچنین عامل آمین خود بر روی هورمون FSH که جنس پروتئینی دارد مؤثر بوده

احتمالاً از طریق تغییر در متابولیسم فسفواینول پیرووات و پیرووات و تبدیل آن به آروماتیک آمینواسید وآلفاتیک آمینواسید نهایتاً ساختار پروتئین را دچار مشکل می‌کند. البته ممکن است که عصاره گیری الکلی و توانایی آن در آزاد کردن برخی از فاکتورهای موثر موجود در شنبلیله با عصاره‌گیری آبی آن و تأثیراتش متفاوت باشد [۱، ۱۴ و ۱۵]. تستوسترون توسط سلول‌های میان بافتی لایدیگ در بیضه‌ها ترشح می‌شود اما ترشح آن فقط هنگامی انجام می‌شود که این سلول‌ها توسط هورمون لوتئینی از غده هیپوفیز قدامی تحریک شوند. علاوه بر آن میزان ترشح تستوسترون دارای اثرات فیدبک منفی در ترشح LH دارد [۲] که می‌تواند یکی از دلایل ثابت بودن میزانLH و تستوسترون در این تحقیق باشد. البته مشخص نشده که آیا ترشح دو هورمون FSH و LH توسط دو گروه سلولی متفاوت صورت می‌گیرد و یا یک سلول است که در فازهای مختلف این هورمون‌ها را ترشح می‌کند. احتمال دارد عصاره‌ی دانه شنبلیله بر روی فاز ترشح FSH از طریق قسمت هیدروکربنی و تغییر ساختمان آن اشکال ایجاد کرده باشد. همچنین در این تحقیق مشخص شد که در سلول‌های اسپرماتوگونی کاهش معنی‌داری بین دوزهای مختلف گروه‌های تجربی با گروه کنترل دیده نمی‌شود و احتمال دارد که عصاره دانه شنبلیله روند تبدیل این سلول‌ها به اسپرماتوسیت را مهار کرده باشد [۳ و۲]. میزان اسپرماتید در دوز ۲۸۰ میکرولیتر کاهش پیدا نموده است و در بقیه گروه‌های تجربی کاهش معنی دار مشاهده نشده که می تواند به علت این باشد که تبدیل اسپرماتوسیت ثانویه به اسپرماتید نیز مهار شده باشد. میزان اسپرماتوسیت و اسپرم در اثر تزریق عصاره الکلی شنبلیله در گروه‌های مختلف تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار پیدا نموده است. همان طوری که قبلاً بیان شد چنانچه عصاره گیاه توانسته باشد روند تبدیل اسپرماتوسیت‌ها را مهار کرده باشد به نظر می‌رسد که انتظار کاهش در سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرم دور از انتظار نباشد [۲۰]. FSH موجب تحریک آنزیم آروماتاز و باعث تولید استرادیول از پیش‌سازهای آندروژنی در سلول‌های سرتولی می‌شود. FSH نقش بسیار کلیدی در تکامل سلول های سرتولی بلافاصله قبل از شروع اولین موج اسپرماتوژنز در آغاز بلوغ را ایفا می‌کند [۱۱و۴] .برای شروع اسپرماتوژنز عمل FSH و تستوسترون هر دو ضروری است و عمل آن می‌تواند این روند را تسهیل کند. حال شنبلیله با اثر بر رویFSH و کاهش آن باعث تأخیر در شروع اسپرماتوژنز می شود [۷] . FSH باعث سهولت دسترسی سلول‌های جنسی به آهن، مس، ویتامین A و اسفنگولیپیدهای مهم می‌شود و این عمل را از طریق سنتز پروتئین های متصل شونده به این مواد انجام می‌دهد [۱۳]. این پروتئین‌ها لیگاندهای مربوطه را از پلاسما جمع-آوری کرده و به سلول‌های جنسی منتقل می‌کنند. همچنین FSH باعث افزایش متابولیسم گلوکز در سلول‌های سرتولی می‌گردد و در نتیجه سوبسترای انرژتیک کافی نظیر پیرووات و لاکتات برای سلول-های جنسی فراهم می‌شود. نهایتاً اینکه پروتئازهای تحریک شده توسط FSH و فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن، احتمالاً در روند اسپرم‌گذاری نقش ایفا می کنند. سلول‌های سرتولی به طریق مکانیکی و یا به واسطه‌ی مواد شیمیایی مسئول به جلو راندن اسپرماتوزوئیدها به داخل مجرای لوله‌های منی‌ساز هستند. اجسام باقی‌مانده و دیگر قطعات توسط سلول‌های سرتولی فاگوسیته شده و از بین می‌رود

که به نظر می‌رسد عصاره‌ی الکلی شنبلیله مانع این عمل می‌شود [۱۶]. احتمالاً ثابت بودن میزان ترشح LH و تستوسترون می‌تواند به علت اثر فیزیکی هم باشد و غدد اندوکرین خود نیز اعضای هدف هستند و بدن قادر خواهد بود که ترشح هورمون‌ها را از طریق مکانیسم فیدبک کنترل کند. در این بررسی تفاوت معنی‌داری در وزن بدن، حجم و بیضه مشاهده نشد. نتایج شمارش اسپرمی کاهش معنی‌دار اسپرم را در دوزهای مختلف تزریق شده نسبت به گروه کنترل نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، عصاره بذر شنبلیله باعث کاهش میزان ترشح هورمون FSH می‌گردد ولی تغییری در سطح هورمون LH و تستوسترون به وجود نیاورده است. همچنین به نظر می‌رسد که این عصاره بیشتر روی هورمون گنادوتروپین اثر داشته و تأثیری مستقیمی بر بافت بیضه ندارد. احتمال دارد افزایش دوز تزریقی منجر به کاهش باروری در جنس نر گردد. هر چند به منظور روشن شدن مکانیسم عمل این ترکیبات بر سیستم تولیدمثلی انسان نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه می‌باشد.

منابع

۱ـ امیدبیگی ر. ۱۳۷۴. رهیافت‌های تولید و فراوری گیاهان دارویی، انتشارات فکر روز، چاپ بنیاد جانبازان، چاپ چهارم، صفحه ۳۴.

۲ـ ژان کوئیرا، مینایی، ب. ۱۳۸۲. بافت شناسی پایه، انتشارات میر، چاپ چهارم، صفحات ۴۵۴-۴۴۱، ۴۲۲-۴۱۴.

۳ـ دزفولیان، ع، شریعت زاده، م.۱۳۸۶. بافت شناسی پایه، ناشر آییژ، چاپ اول، صفحات ۷۰۳-۶۸۹، ۶۸۷-۶۵۱.

۴ـ شریفی، ا، مقدم نیا، د. ۱۳۸۵. تأثیر عصاره‌ی الکلی چمچمه خرما بر تغیرات بافتی بیضه و میزان هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در موش صحرایی نر، مجله علوم پزشکی، جلد ۹ ، شماره ی ۴.

۵ـ عارف، م. ۱۳۷۰. پایان نامه دکترا، اثرات جانبی قرص‌های ضدبارداری، دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه‌ی ۲۰.

۶ـ فکوک، هانس.، صداقت م د.، توکلی م د. ۱۳۶۸. گیاهان دارویی، چاپ سوم، انتشارات روز بهان، صفحه‌ی ۳۱.

۷ـ گایتون، آرتور.، ل، جان.، شادان، ف.، ۱۳۷۸. فیزیولوژی پزشکی، انتشارات نشر، چاپ چهارم، صفحات ۱۴۹۳-۱۵۰۵ .

۸ـ مختاری، م.، شریعتی، م.، قهرمانی، ر. ۱۳۸۶. تأثیر عصاره‌ی آبی دانه شنبلیله بر تغیرات هورمون تستوسترون و اسپرماتوژنز در موش صحرایی، فصلنامه گیاهان دارویی، شماره‌ی ۲۵، صفحات ۲۰-۱۲.

9- AIfans T. and L. van Lommc (2003), From cells to organs, A histology text book and atlas.

10- Bloomf F. (1998), Text book of histology, 12th ed, Chapman and Hal co., New York.

11- Browder, L.W., Erickson, C.A., Jeffery, W.R. (1996), Developmental biology, third edition, Sun Undress college pub

12- George., R.W., Edmund, K.N. (1998), Alkaloid biology and metabolism in plants, New York, London, Plenum Press, pp: 143 – 146, 157 – 158.

13- Khouri N.A (2005), Anti and rogenic activity of Ruta gravolenslin male albino rats with emphasis on sexual and aggressive behavior Neuroendocrinol let., pp : 823 – 829 .

14- sapogenins from amber fenugreek by capillary gas chromatography and spectrometry , food chemistry cited by in Scopus , pp : 53 – 59.

15- Madar, Z. and Arad, J., (1989), Effect of extracted fenugreek on postprandial glucose levels in human diabetic subjects, Natrition research, pp: 691 – 692.

16- Rejegou B. (1993), The sertoligerm cell communication in mammals, pp: 25-26.

17- Shani, J., Golds Chimed, A., Joseph, B. (1994), Hypoglycemic effect of *Trigonella foenum graecum* and *Lupinas termis* seeds and the ir major alkaloids in alloxan diabetic and normal rats , Archives in ternationals de pharma cody manic etde Therapie, pp:27-37.

18- Sokar, Z., A. Chait, M. Bennis, S. Ahamed, L. Khalki (2010), Evaluation of the developmental toxicity of the aqueo usextrac from *Trigonella foenum gruecum* in mice.

19- Taylor, W.G., Zaman, Z. Mir, P.S. Mir., S.N.A Chary and G.Y Taylor (2003), Analysis of steroridal, 4th ed., London, Mac raw – Hill book co., pp: 40 – 56.

20- Williams, D.H., Fleming, L. (1987), Spectroscopic method in organic chemistry14 – Madar, Z., Abel, R., Samish, S. and Arad, J. (1988), Glucose lowing effect of fenugreek in non – in sulin dependent dia betics , european journal of clinical nutrition , pp : 42 , 51 –54.

21- Ya Feez B., R. Haque, S. Parvez (2004), Immuno modulatory effects of fenugreek extract in mice , Department of medical Element logy and toxicology, Jamia Hamdard , Hamdyrd university, New Delhi, India.