

## تاثیر عصاره آبی الکی ویتانیا کواگولانس بر فاکتورهای آنتی اکسیدانی و پارامترهای اسپرم به دنبال تجویز تستوسترون در رت

مریم سریشگی<sup>۱</sup>، عذرا خواجهی<sup>۱\*</sup>

(۱) گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۵

### چکیده

**مقدمه:** افزایش سطح تستوسترون و یا استفاده ناصحیح و خودسرانه از تستوسترون می تواند باعث ایجاد اختلال در باروری گردد. امروزه استفاده از گیاهان دارویی برای درمان اختلالات هورمونی و نازایی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر اثرات عصاره آبی الکی ویتانیا کواگولانس بر تعداد و قابلیت حیات اسپرم، شاخص گونادوسوماتیک، سطح مالون دی آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC)، در بیضه رت به دنبال تجویز تزریق تستوسترون بررسی شده است.

**مواد و روش ها:** در مطالعه تجربی حاضر تعداد ۴۸ سر رت از نژاد ویستار به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند: کنترل، شاهد، تستوسترون و سه گروه دریافت کننده تستوسترون همراه با عصاره آبی الکی ویتانیا کواگولانس با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. تستوسترون پروپیونات ۳ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه به صورت زیرجلدی به مدت ۴ هفته تزریق گردید. گاوآز دهانی عصاره آبی الکی ویتانیا کواگولانس یا آب مقطر به طور هم زمان با تزریق تستوسترون انجام شد. در پایان شاخص گونادوسوماتیک، تعداد و قابلیت حیات اسپرم، MDA و TAC در بیضه مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته های پژوهش:** نتایج نشان دهنده کاهش شاخص گونادوسوماتیک، تعداد قابلیت حیات اسپرم و سطح آنتی اکسیدانی کل و افزایش MDA در گروه دریافت کننده تستوسترون بود ( $P < 0.001$ ). عصاره ویتانیا کواگولانس به صورت وابسته به دوز باعث افزایش شاخص گونادوسوماتیک و پارامترهای اسپرم، کاهش MDA و افزایش TAC در بیضه در مقایسه با گروه تستوسترون گردید ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** به نظر می رسد عصاره ویتانیا کواگولانس می تواند باعث بهبود وضعیت پارامترهای باروری گردد و ممکن است در درمان مشکلات ناباروری مفید واقع شود اگر چه تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

**واژه های کلیدی:** ویتانیا کواگولانس، تستوسترون، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، مالون دی آلدئید، رت

\* نویسنده مسئول: گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

Email: ozrahajavi@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

دارای خواص آنتی اکسیدانی، کاهنده قند و چربی خون می باشد (۴).

تحقیقات انجام شده نشان داده است که عصاره گیاه ویتانیا می تواند باعث درمان الیگواسپرمی در مردان شود و هم چنین با تحریک فولیکول زایی باعث افزایش قدرت باروری در زنان گردد (۵۶). مطالعه Kiasalari و همکاران نشان داد عصاره ویتانیا باعث تنظیم و بهبود اختلالات هورمون های جنسی ناشی از دیابت القاء شده در رت های نر می شود (۷). بنا بر این هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات عصاره آبی الکلی ویتانیا کواگولانس بر شاخص گونادوسوماتیک، تعداد و قابلیت حیات اسپرم وضعیت آنتی اکسیدانی و سطح پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه رت به دنبال تزریق تستوسترون می باشد.

## مواد و روش ها

روش تهیه عصاره: گیاه ویتانیا از نواحی اطراف شهرستان سراوان (سیستان و بلوچستان) توسط مرکز پژوهشی گیاهان دارویی و زینتی دانشگاه سیستان و بلوچستان شناسایی و جمع آوری شد و به صورت انبوه در گلخانه این مرکز کشت داده می شود. نمونه های گیاه پس از دریافت با آب بدون یون شسته و در دمای ۲۵ درجه در محیط آزمایشگاه خشک گردید. هر یک گرم نمونه پودر خشک شده گیاه با استفاده از ۱۰ میلی لیتر حلال متانول: آب (۲۵:۷۵) به صورت هموژنیزه در آمده و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت. در ادامه مخلوط از کاغذ صافی عبور داده شد و پس از آن مایع جمع آوری شده توسط دستگاه تبخیر کننده چرخشی تغلیظ و خشک گردید. پودر جمع آوری شده وزن و تا هنگام استفاده در فریزر نگهداری شد (۸).

در مطالعه حاضر از ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ به وزن تقریبی ۲۸۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد و با دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی) نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی

آندروژن ها برای رشد و فعالیت طبیعی غدد جنسی ضروری اند. مطالعات نشان دهنده ارتباط مستقیم بین سطح تستوسترون خون و وزن بیضه ها، اپیدیدیم، کیسه های سمینال و پروستات می باشد. تستوسترون هورمون اصلی مترشحه از بیضه ها است که توسط سلول های لیدیگ بافت بیضه ساخته و ترشح می شود. این هورمون توسط آنزیم ۵ آلفا ردوکتاز تبدیل به دی هیدروتستوسترون می شود. هم چنین صفات ثانویه جنسی مردان در دوران بلوغ تحت تاثیر تستوسترون پیشرفت می کند (۱).

در صورت تزریق این هورمون به صورت برونزاد، به دلیل افزایش سطح تستوسترون سرم، محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-بیضه ای مهار گردیده و به دنبال آن سطح هورمون های FSH و LH و در نهایت سطح تستوسترون سرم و بیضه کاهش یافته و همین امر باعث کاهش وزن بیضه ها و تعداد اسپرم می شود (۲).

در بعضی از کشورها از تستوسترون به عنوان یک داروی ضد باروری در مردان استفاده می شود از طرفی دیگر در بسیاری از موارد از این هورمون برای افزایش حجم عضلات در باشگاه های بدن سازی استفاده می گردد. مطالعات نشان داده است تستوسترون برونزاد (Exogenous) می تواند باعث ناباروری گردد (۳).

امروزه استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان انواع بیماری ها مورد توجه می باشد. ویتانیا کواگولانس (Withania coagulans) از خانواده سولاناسه، از جمله گیاهان دارویی و چند منظوره است که در ایران، منحصراً در برخی از رویشگاه های جنوب شرقی استان سیستان و بلوچستان پراکنش دارد. عمده ویژگی دارویی این گیاه مربوط به حضور گروهی از لاکتون های استروئیدی به نام ویتانولوئیدها می باشد. در بین ویتانولیدهای موجود، ترکیب ویتافرین A به دلیل ویژگی بازدارندگی رشد سلول ها و تومورهای سرطانی، دارا بودن ویژگی آنتی آنژیوژنز و القاء مرگ برنامه ریزی شده سلول در صنایع دارویی از ارزش بالایی برخوردار می باشد، هم چنین عصاره این گیاه

به ۶ گروه به شرح ذیل تقسیم شدند ( $n=8$ ):

گروه کنترل: هیچ دارویی دریافت نکردند.

گروه شاهد: روغن ذرت (حلال تستوسترون) را (زیرجلدی در ناحیه پوست پشت گردن) دریافت کردند

و هم زمان گاوژ آب مقطر (حلال عصاره) انجام شد.

گروه تستوسترون: ۳ mg/kg تستوسترون پروپیونات (زیرجلدی در ناحیه پوست پشت گردن) دریافت کردند و هم زمان گاوژ آب مقطر انجام شد. دوز تستوسترون بر اساس مطالعات قبلی انتخاب گردید (۹).

گروه تستوسترون+ویتانیا ۲۵۰: ۳ mg/kg تستوسترون و ۲۵۰ mg/kg عصاره ویتانیا کواگولانس دریافت کردند.

گروه تستوسترون+ویتانیا ۵۰۰: ۳ mg/kg تستوسترون و ۵۰۰ mg/kg عصاره ویتانیا کواگولانس دریافت کردند.

گروه تستوسترون+ویتانیا ۱۰۰۰: ۳ mg/kg تستوسترون و ۱۰۰۰ mg/kg عصاره ویتانیا کواگولانس دریافت کردند.

دوز انتخابی عصاره و مدت زمان مصرف بر اساس مطالعات قبلی تعیین گردید (۱۰). گاوژ و تزریقات هر روز حدود ساعت ۱۰-۹ صبح به مدت ۴ هفته انجام گردید. یک روز پس از اتمام گاوژ و تزریق، همه حیوانات وزن و پس از بیهوشی عمیق با کلروفورم، نخاعی و کشته شدند. پس از ایجاد شکاف در قسمت تحتانی شکم، بیضه و اپیدیدیم هر دو سمت خارج گردیدند. بیضه ها با ترازوی سارتوریوس (MSE224S-000-DU ساخت شرکت سارتوریوس آلمان) با دقت  $0.001$  گرم وزن شدند و بیضه راست جهت انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  - درجه سانتی گراد منجمد گردید.

کلیه اقدامات انجام شده بر روی حیوانات بر اساس چک لیست قوانین حمایت و کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مصوب وزارت بهداشت و آموزش پزشکی انجام گردید. کلیات طرح انجام شده به تأیید کمیته اخلاق (IR.ZAUMS.REC.1394.194) دانشگاه علوم پزشکی زاهدان رسید.

محاسبه شاخص گونادوسوماتیک: با تقسیم کردن وزن بیضه ها بر وزن بدن برای هر موش و ضرب عدد بدست آمده در ۱۰۰، شاخص گونادوسوماتیک محاسبه گردید (۱۱).

شمارش اسپرم ها: جهت شمارش تعداد اسپرم ها یک سانتی متر از انتهای اپی دیدیم برش داده شد و در ۲ سی سی محلول فسفات بافر سالین با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ۱۰ میکرولیتر (یک قطره) از سوسپانسیون اسپرمی به دست آمده بر روی لام هموسیتومتر (Darmstadt, Germany, LABART) قرار داده شد و با استفاده میکروسکوپ نوری و بزرگ نمایی  $40\times$  تعداد سر اسپرم ها در پنج خانه مخصوص شمارش گلبول های قرمز شمارش و سپس تعداد اسپرم در ۱ میلی لیتر نمونه محاسبه گردید (۱۲).

قابلیت حیات اسپرم: جهت بررسی قابلیت حیات اسپرم از رنگ اتوزین استفاده شد بدین صورت که ۷ ماکرولیتر رنگ اتوزین (۰/۰۵ درصد در سالین) به ۲۰ ماکرولیتر نمونه اسپرم روی لام نتوبار اضافه شد و زیر میکروسکوپ با بزرگ نمایی  $40\times$  اسپرم های بدون رنگ شمارش گردید حداقل ۱۰۰ اسپرم در پنج میدان دید برای هر نمونه شمارش و نتیجه به صورت میانگین اسپرم های زنده گزارش گردید (۱۱).

اندازه گیری سطح MDA در بافت بیضه: به طور خلاصه ۰/۵ سی سی از محلول رویی حاصل از سوسپانسیون بافتی به ۳ سی سی اسیدفسفوریک ۱ درصد و ۱ سی سی محلول تیوباربتوریک اسید ۶ درصد (شرکت مرک آلمان) افزوده شد. محلول فوق در بن ماری  $95^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد. پس از سرد شدن ۴ سی سی آن-بوتانول اضافه شد و به شدت تکان داده شد و مجدداً سانتریفیوژ گردید تا لایه آن-بوتانول جدا گردد. جذب محصول صورتی رنگ در طول موج  $535$  نانومتر خوانده شد. از تترامتوکسی پروپان جهت استاندارد استفاده شد. سطح MDA بر اساس نانومول/میلی گرم پروتئین گزارش گردید (۱۳).

اندازه گیری سطح TAC در بافت بیضه: سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در بیضه با استفاده از روش

FRAP انجام شد. اساس این روش به صورت است که کمپلکس فریک تری پایریدیل تریازین (TPTZ)، ساخت شرکت سیگمای آمریکا) توسط آنتی اکسیدان های نمونه احیاء شده و به فرم فرس در می آید که به رنگ آبی تیره است و شدت آن در دستگاه اسپکتروفومتر با طول موج ۵۹۳ قابل اندازه گیری است. محلول کار توسط مخلوط کردن ۱۰ حجم از بافر فسفات (۰/۳ مولار) با ۱ حجم از TPTZ ۱۰ میلی مولار در اسید کلریدریک (۴۰ میلی مولار) تهیه گردید. سپس ۱ سی سی محلول کلرید آهن III (۲۰ میلی مولار بر لیتر) به آن اضافه شد. ۵۰ میکرولیتر از محلول هموزن بیضه به ۱/۵ سی سی از محلول فوق اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. میزان جذب رنگ آبی در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد. از سولفات آهن (Feso4) به عنوان معرف استاندارد استفاده گردید (۱۴).

*آنالیز آماری:* جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد. اختلاف بین گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی مقایسه شدند. داده ها به شکل Mean±SEM نشان داده شدند. اختلاف میانگین ها در سطح P<0.05 معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته های پژوهش

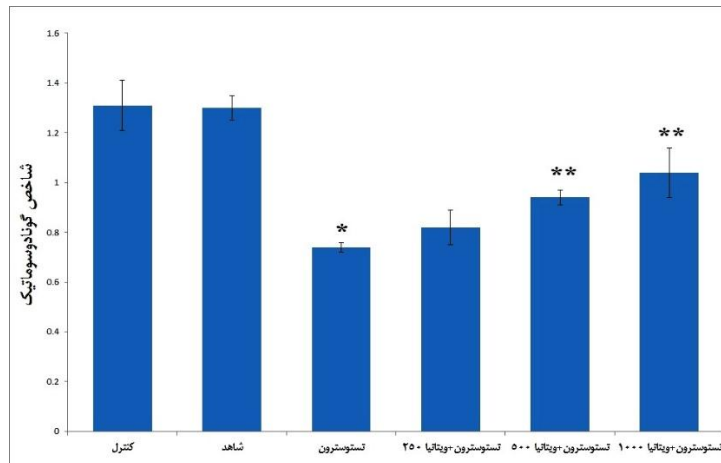
*تأثیر عصاره ویتانیا بر شاخص گونادوسوماتیک:* میانگین شاخص گونادوسوماتیک در گروه تستوسترون (۰/۷۴±۰/۲) نسبت به کنترل (۱/۳۱±۰/۱) به طور معنی داری کاهش نشان داد (P<0.001). این میانگین در دوزهای ۵۰۰ (۰/۹۴±۰/۰۳) و ۱۰۰۰ میلی گرم (۱/۰۴±۰/۱) از عصاره افزایش معنی داری نسبت به گروه تستوسترون داشت (P<0.01) در حالی که میانگین شاخص گونادوسوماتیک بین گروه تستوسترون و تیمار با دوز ۲۵۰ mg/kg (۰/۸۲±۰/۰۷) از عصاره از نظر آماری معنی دار نبود (P>0.05، نمودار شماره ۱).

*تأثیر عصاره ویتانیا بر تعداد و قابلیت حیات اسپرم:* بررسی میانگین شمارش اسپرم ها در گروه دریافت کننده تستوسترون (۳/۲±۰/۳) نسبت به گروه کنترل

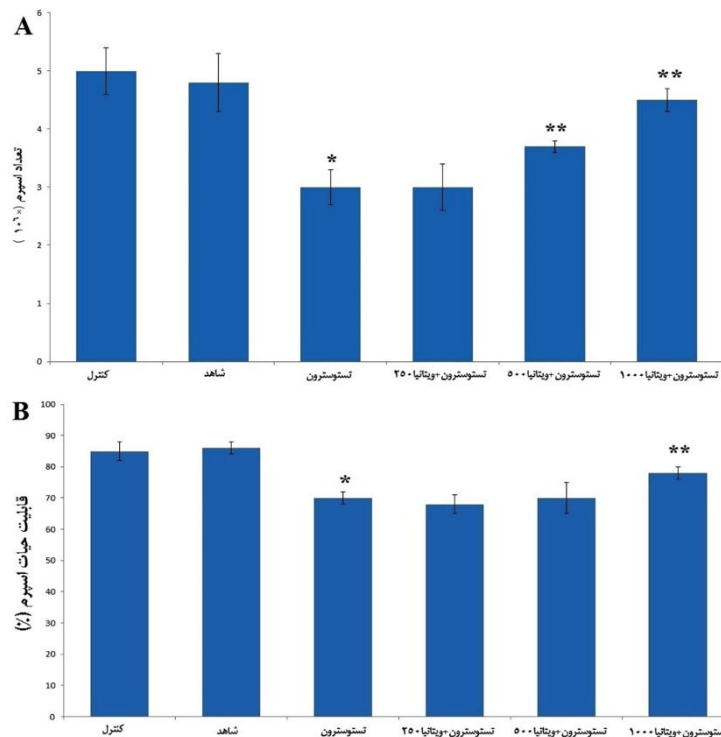
(۵/۰۴±۰/۳) و شاهد (۵±۰/۳۷) کاهش داشت (P<0.001). میانگین تعداد اسپرم فقط در گروه دریافت کننده دوز ۵۰۰ (۳/۹±۰/۱) و ۱۰۰۰ میلی گرم (۴/۴±۰/۲) از عصاره نسبت به گروه تستوسترون افزایش معنی داری را نشان داد (P<0.05، نمودار شماره ۲-A). کاهش درصد قابلیت حیات اسپرم در گروه تستوسترون (۷۰/۵±۲) نسبت به گروه کنترل (۸۵/۱±۲/۸) و شاهد (۸۶/۵±۱/۸) از نظر آماری معنی دار بود (P<0.05) اما در گروه دریافت کننده دوزهای ۲۵۰ (۶۹/۳±۳/۲) و ۵۰۰ (۷۱/۳±۴/۳) میلی گرم تفاوت معنی داری از نظر آماری نسبت به گروه تستوسترون مشاهده نشد (P>0.05، نمودار شماره ۲-A). تیمار با عصاره ویتانیا به میزان ۱۰۰۰ mg/kg (۷۸±۲) باعث افزایش معنی دار (P<0.05) درصد قابلیت حیات اسپرم نسبت به گروه تستوسترون گردید (نمودار شماره ۲-B).

*تأثیر عصاره ویتانیا بر سطح MDA بافت بیضه:* نتایج نشان دهنده افزایش معنی دار (P<0.001) سطح مالون دی آلدئید در گروه تستوسترون (۸/۵±۰/۳) نسبت به گروه کنترل (۵/۵±۰/۶) و شاهد (۵/۶±۰/۷) می باشد. سطح مالون دی آلدئید در گروه های تیمار شده با دوزهای ۵۰۰ (۷±۰/۵) و ۱۰۰۰ گرم (۶±۰/۳) از عصاره کاهش معنی داری را نسبت به گروه تستوسترون نشان داد (P<0.01، نمودار شماره ۳-A).

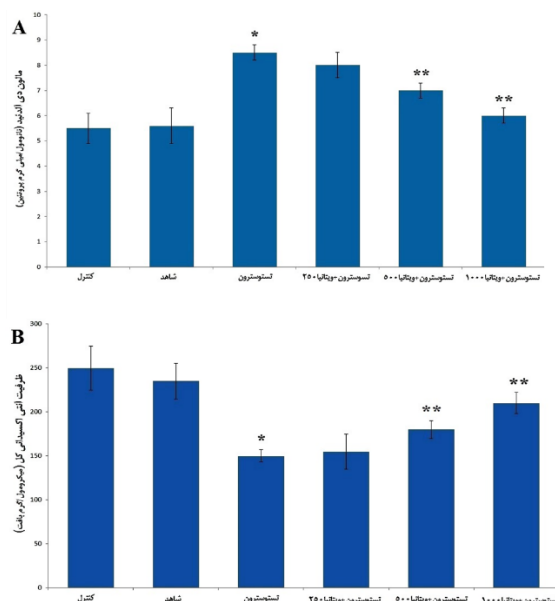
*تأثیر عصاره ویتانیا بر سطح TAC بافت بیضه:* نتایج حاصل از تأثیر عصاره ویتانیا کواگولانس بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نشان دهنده کاهش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در گروه تستوسترون (۱۵۰±۷) نسبت به گروه کنترل (۲۵۰±۲۵) و شاهد (۲۳۵±۲۰) می باشد (P<0.001). گاوآذ عصاره به مدت ۴ هفته باعث افزایش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در بیضه گروه های دریافت کننده دوزهای ۵۰۰ (۱۸۰±۱۰) و ۱۰۰۰ میلی گرم (۲۱۰±۱۲) گردید (P<0.01)، اما در گروه های تیمار شده با دوز ۲۵۰ میلی گرم (۱۵۵±۲۰) از عصاره تغییر آماری معنی داری نسبت به گروه تستوسترون مشاهده نگردید (P>0.05، نمودار شماره ۳-B).



نمودار شماره ۱. اثر عصاره ویتانیا کوآگولانس با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم، بر شاخص گونادوسوماتیک در رت به دنبال تزریق تستوسترون در گروه های مورد مطالعه. تجویز عصاره به صورت وابسته به دوز باعث افزایش شاخص گونادوسوماتیک گردید. نتایج به صورت  $Mean \pm SEM$  گزارش شده است ( $n=8$ ).  $P < 0.001$  \*  
 اختلاف معنی دار با گروه کنترل،  $P < 0.01$  \*\* اختلاف معنی دار با گروه تستوسترون.



نمودار شماره ۲. اثر عصاره ویتانیا کوآگولانس با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم، بر تعداد اسپرم (A) و قابلیت حیات اسپرم (B) در رت به دنبال تزریق تستوسترون در گروه های مورد مطالعه. عصاره ویتانیا در بالاترین دوز باعث افزایش تعداد و قابلیت درصد حیات اسپرم گردید. نتایج به صورت  $Mean \pm SEM$  گزارش شده است ( $n=8$ ).  $P < 0.001$  \*  
 اختلاف معنی دار با گروه کنترل،  $P < 0.05$  \*\* اختلاف معنی دار با گروه تستوسترون.



نمودار شماره ۳. اثر عصاره ویتانیا کوآگولانس با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم، بر سطح مالون دی آلدئید (A) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (B) در بافت بیضه رت به دنبال تزریق تستوسترون در گروه های مورد مطالعه. عصاره ویتانیا به صورت وابسته به دوز باعث کاهش سطح MDA و افزایش سطح TAC گردید. نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش شده است ( $n=8$ ).  $P < 0.001$ \* اختلاف معنی دار با گروه کنترل،  $P < 0.01$ \*\* اختلاف معنی دار با گروه تستوسترون.

### بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد درمان با عصاره آبی الکی ویتانیا در رت های دریافت کننده تستوسترون به صورت وابسته به دوز از کاهش وزن بیضه و تعداد اسپرم جلوگیری کرد هم چنین باعث بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی بافت بیضه در دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم گردید.

تستوسترون برونزاد با مهار ترشح LH، FSH و GnRH در هیپوتالاموس باعث کاهش سطح تستوسترون و کاهش اسپرم زایی و وزن بیضه می شود (۲). در پژوهش انجام شده توسط Hijazi و همکاران تزریق تستوسترون باعث تغییرات چشمگیر در بافت بیضه، مانند آتروفی و کاهش ارتفاع اپیتلیوم لوله های اسپرم ساز و کاهش سلول های لایدیگ شد (۱۵). هم چنین سطح تولید روزانه اسپرم (DSP) تعداد سلول های سرتولی، حجم و وزن بیضه در موش کاهش قابل توجهی را نشان داد (۱۶).

نتایج تحقیق حاضر نیز نشان دهنده کاهش شاخص گونادوسوماتیک (نشانگر وزن بیضه) به دنبال تزریق

تستوسترون می باشد که احتمالاً این کاهش را می توان ناشی از کاهش سلول های سرتولی و لایدیگ و هم چنین کاهش ضخامت اپیتلیوم لوله های منی ساز دانست (۱۷).

از طرفی در مطالعه حاضر گاوژ عصاره ویتانیا کوآگولانس به مدت ۴ هفته به صورت وابسته به دوز مانع کاهش وزن بیضه ها گردید. نتیجه تحقیق Kumar و همکاران نشان داد عصاره ویتانیا باعث جلوگیری از تخریب لوله های اسپرم ساز و ترمیم اپیتلیوم لوله ها در بیضه موش هایی که در معرض اندوسولفان قرار گرفته بودند می شود (۱۸).

یکی از ترکیبات اصلی گیاه ویتانیا، ویتانولیدها می باشند. این ترکیبات به عنوان هورمون های گیاهی قادرند با اشغال کردن گیرنده های سطح سلول از اتصال هورمون های حیوانی به رسپتورهای سلولی جلوگیری و در نتیجه مانع تاثیر هورمون ها و عملکرد آن ها شوند (۴).

در مطالعه حاضر احتمالاً ویتانولیدهای موجود در عصاره ویتانیا کوآگولانس با ممانعت از باند شدن

تستوسترون به گیرنده های سطح سلول مانع از اتصال هورمون به این گیرنده ها و ورود آن به داخل سلول شده و در نتیجه مانع از اثر آن و ایجاد فیدبک منفی و کاهش وزن بیضه ها گردیده است.

در این مطالعه تزریق تستوسترون باعث کاهش ۴۰ درصدی میانگین تعداد اسپرم و هم چنین قابلیت حیات اسپرم ها گردید و تیمار با عصاره ویتانیا کواگولانس به صورت وابسته به دوز از کاهش تعداد اسپرم جلوگیری کرد به طوری که در گروه دریافت کننده دوز بالای عصاره (۱۰۰۰ mg/kg) افزایش ۳۰ درصدی تعداد اسپرم زنده نسبت به گروه تستوسترون مشاهده گردید، این نتایج می تواند احتمالاً به دلیل اثرات محافظتی آنتی اکسیدانی عصاره در مقابل آسیب رادیکال های ایجاد شده به اسپرم ها باشد که با نتیجه مطالعه Ahmad و همکاران هم خوانی دارد (۱۹).

Mahdi و همکاران با مطالعه اثر عصاره ویتانیا بر کیفیت و تعداد اسپرم مردان نابارور گزارش نمودند عصاره ویتانیا قادر به درمان الیگو اسپرمی و بهبود کیفیت اسپرم در این مردان می باشد (۲۰). هم چنین نشان داده شده است عصاره ویتانیا با افزایش میزان ترشح گونادو تروپین ها باعث افزایش تعداد اسپرم می شود (۲۱). توانایی حیات و تحرک اسپرم وابسته به میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی در پلاسما منی می باشد و گیاهان دارویی با خاصیت آنتی اکسیدانی قادر به ایجاد این اثر می باشند و احتمالاً عصاره ویتانیا با داشتن ترکیبات آنتی اکسیدانی قوی به خصوص ویتافرین A باعث بهبود کیفیت و کمیته اسپرم می گردد. از طرفی تحقیق دیگری نشان داد تجویز ۵۰ میلی گرم عصاره الکلی ویتانیا به مدت ۶۰ روز باعث کاهش تعداد و حرکت اسپرم هم چنین کاهش ضخامت اپیتلیوم لوله های اسپرم ساز در موش می گردد (۲۲). اما در مطالعه حاضر تجویز عصاره آبی الکلی ویتانیا به میزان ۱۰۰۰ میلی گرم به مدت ۴ هفته باعث افزایش تعداد و توانایی حیات اسپرم گردید، این اختلاف در نتایج را می توان احتمالاً به دلیل تفاوت در روش آماده سازی، نوع عصاره هم چنین دوز و مدت زمان تجویز عصاره دانست. ویتانیا کواگولانس با داشتن ترکیبات فلاونوئیدی و ویتانولیدی دارای اثرات

آنتی اکسیدانی است و باعث کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی می شود (۲۳). پراکسیداسیون لیپیدها یکی از صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو می باشد. ثابت شده است که سطح فیزیولوژیکی گونه های فعال اکسیژن (ROS) جهت عملکرد طبیعی اسپرم ضروری می باشد، اما افزایش بیش از اندازه ROS می تواند باعث افزایش میزان استرس اکسیداتیو شود که خود باعث صدمه به ماکرومولکول های غشاء مانند چربی ها، کربوهیدرات ها و پروتئین ها و DNA هسته سلول گردد. غشای پلاسمایی اسپرم به دلیل دارا بودن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع مستعد پراکسیداسیون لیپیدی می باشد بنا بر این افزایش سطح ROS می تواند منجر به آسیب غشای اسپرم، کاهش تولید، حرکت و قابلیت حیات اسپرم شود، آزمایشات انجام شده کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی و افزایش استرس اکسیداتیو را در مایع سمینال مردان عقیم نشان داده اند. از آن جایی که تستوسترون باعث افزایش سرعت متابولیک می شود می توان انتظار داشت که افزایش سطح تستوسترون باعث ایجاد عدم تعادل بین تولید ROS و سیستم آنتی اکسیدانی شده و همین امر باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می گردد. از طرفی تزریق تستوسترون باعث کاهش سطح سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بیضه می گردد که به دنبال آن افزایش سطح  $O_2^-$  به وجود می آید. این عوامل باعث غیرفعال شدن کاتالاز (CAT) شده و نهایتاً میزان پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) در سلول افزایش می یابد. بنا بر این افزایش سطح تستوسترون با القای استرس اکسیداتیو باعث کاهش سطح آنتی اکسیدان ها در سلول می گردد (۲۴).

نتیجه مطالعه Choobineh و همکاران نشان داد تزریق تستوسترون به رت های ضایعه نخاعی باعث کاهش سطح MDA در نخاع این حیوانات می گردد (۲۴) اما نتیجه مطالعه حاضر نشان داد تزریق تستوسترون باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه رت ها می گردد این اختلاف در یافته ها به دلیل مکانیسم اثر متفاوت تستوسترون در بافت های مختلف می باشد به طوری که تستوسترون در مغز خاصیت

می تواند مانع کاهش تعداد اسپرم، آتروفی بیضه و افزایش MDA و هم چنین مانع کاهش سطح TAC در بافت بیضه موش ها گردد و این عوامل می تواند دلیل بر تاثیر این عصاره بر بهبود پارامترهای باروری در موش باشد.

با جمع بندی از نتایج تحقیقات فوق می توان به این نتیجه رسید که ترکیبات موجود در عصاره ویتانیا کوآگولانس با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی باعث کاهش عوارض استرس اکسیداتیو و صدمات ناشی از آن بر پارامترهای باروری در موش می گردد و شاید بتوان از این گیاه در درمان ناباروری و هم چنین عوارض ناشی از تزریق تستوسترون استفاده کرد.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه (۷۴۴۶) خانم عذرا فواجوی دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی زاهدان می باشد که بودجه آن توسط معاونت پژوهش دانشگاه علوم پزشکی زاهدان تامین شد. هم چنین بدین وسیله از پرسنل مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان قدردانی می شود.

### References

- 1.Purushottamachar P, Njar VC. A new simple and high yield synthesis of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone a potent androgen receptor agonist. *Steroids* 2012;77:1530-4. Doi:10.1016/j.steroids.2012.09.003.
- 2.Zhang XW, Zhang C, Zhang W, Yang D, Meng S, Wang P, et al. Suppression of spermatogenesis by testosterone undecanoate-loaded injectable in situ forming implants in adult male rats. *Asian J Androl* 2016;18:791-7. Doi: 10.4103/1008-682X.160886.
- 3.Wang C, Swerdloff RS. Hormonal approaches to male contraception. *Curr Opin Urol* 2010;20:520-4. Doi: 10.1097/MOU.0b013e32833f1b4a.
- 4.Khodaei M, Jafari M, Noori M. Remedial use of withanolides from *Withania coagulans* stocks dunal. *Adv Life Sci* 2012;2:6-19. Doi:10.5923/j.als.20120201.02.
- 5.Ambiye VR, Langade D, Dongre S, Aptikar P, Kulkarni M, Dongre A. Clinical

آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهد که احتمالاً به دلیل اثر متقابل کربن های غیراشباع تستوسترون و گروه های OH- با رادیکال های آزاد می باشد اما در بیضه و پروستات خاصیت پرواکسیدانی دارد(۲۵). در مطالعه حاضر تزریق تستوسترون باعث کاهش TAC به میزان ۴۰ درصد نسبت به گروه کنترل در بافت بیضه موش ها گردید. در مطالعه Tothova و همکاران نیز بیان شد تستوسترون برونزاد باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و هم چنین کاهش سطح TAC در بیضه موش می شود که همسو با نتایج حاصل از مطالعه حاضر می باشد(۲۶).

در مطالعه ای دیگر نشان داده شد عصاره آبی الکلی ویتانیا کوآگولانس با جلوگیری از تکثیر سلولی و القاء آپوپتوز در سلول های پروستات و هم چنین کاهش سطح MDA باعث بهبود بزرگی خوش خیم پروستات در رت می شود(۱۰). هم چنین Ahmad و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند عصاره ویتانیا باعث بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی مایع منی و افزایش تعداد اسپرم در مردان نابارور می شود(۱۹). نتیجه مطالعه حاضر نیز تأیید نمود عصاره آبی الکلی ویتانیا کوآگولانس

evaluation of the spermatogenic activity of the Root extract of *Ashwagandha Withania somnifera* in oligospermic males a pilot study. *Evid Bas Comple Alte Med* 2013;2:22-8. Doi:10.1155/2013/571420.

6.Qarawi A, Abdelrahman H, Badry A, Harraz F, Razig N, Abdelmagied E. The effect of extracts of *Cynomorium coccineum* and *Withania somnifera* on Gonadotrophins and ovarian follicles of immature wistar Rats. *Phytother Res* 2000;14:288-90.

7.Kiasalari Z, Khalili M, Aghaei M. Effect of *withania somnifera* on levels of sex hormones in the diabetic male rats. *Iran J Reprod Med* 2009;7: 163-8.

8.Sarbishegi M, Heidari Z, Mahmoudzadehsagheb H, Valizadeh M, Doostkami M. Neuroprotective effects of *Withania coagulans* Root extract on CA1 hippocampus following cerebral ischemia in Rats. *Avicenna J Phytomed* 2016;6:399-409.



- 9.Nahata A, Dixit V. Ameliorative effects of stinging nettle *Urtica dioica* on testosterone-induced prostatic hyperplasia in Rats. *Andrologia* 2012;44:396-409. Doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01197.x.
- 10.Sarbishegi M, Khani M, Salimi S, Valizadeh M, Aval FS. Antiproliferative and Antioxidant Effects of *Withania coagulans* Extract on Benign Prostatic Hyperplasia in Rats. *Nephrourol Mon* 2016;8:33180. Doi: 10.5812/numonthly.33180.
- 11.Amini M, Roghani M, Shirinbayan P, Joghataei MT, Farhoudian A, Roshanpajouh M, et al. [Effects of Kerack used in addict Iranian people on fertility of adult mice]. *Tehran Uni Med J* 2013; 71: 293-302.(Persian)
- 12.Parhizkar S, Zulkifli SB, Dollah MA. Testicular morphology of male rats exposed to *Phaleria macrocarpa* Mahkota dewa aqueous extract. *Iran J Bas Med Sci* 2014;17:384-90.
- 13.Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8. Doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- 14.Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros L, Byrne DH. Comparison of ABTS and DPPH and FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal* 2006;19:669-75. Doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003.
15. Hijazi MM, Azmi MA, Hussain A, Naqvi S, Perveen R, Hijazi S. Androgenic anabolic steroidal-based effects on the morphology of testicular structures of albino rats. *Pakistan J Zool* 2012;44:1529-37.
- 16.Khalilzadeh B, Tabrizi AD, Safavi E. Comparative survey of testosterone enanthate and nandrolonedecanoate administration on the number and function of sperms in Rat. *Bull Env Pharmacol Life Sci* 2013;3:42-5.
- 17.Morovvati H, Najafzadehvarzi H, Rashidi K. [Effect of *urtica dioica* extract on histological and histometrical changes of testis of Hamster after testosterone administration]. *Zahedan J Res Med Sci* 2013;15:4-8. (Persian)
- 8.Kumar R, Das S, Nanda I, Kumar A, Ali M, Nath A, et al. To study bioremedial effect of *Withania somnifera* on sperm count and seminiferous tubules of endosulfan exposed Mice. *Global J Trad Med Sys* 2012;1:16-20.
- 19.Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Rajender S, Madhukar D, et al. *Withania somnifera* improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. *Fertil Steril* 2010;94:989-96. Doi:10.1016/j.fertnstert.2009.04.046.
- 20.Mahdi AA, Shukla KK, Ahmad MK, Rajender S, Shankhwar SN, Singh V, et al. *Withania somnifera* improves semen quality in stress-related male fertility. *Evid Bas Comple Alte Med* 2011;2011. Doi:10.1093/ecam/nep138.
- 21.Kataria H, Gupta M, Lakhman S, Kaur G. *Withania somnifera* aqueous extract facilitates the expression and release of GnRH: in vitro and in vivo study. *Neurochem Int* 2015;89:111-9. Doi:10.1016/j.neuint.2015.08.001.
- 22.Singh AR, Singh K, Shekhawat PS. Spermicidal activity and antifertility activity of ethanolic extract of *Withania somnifera* in male albino rats. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2013;21:227-32.
- 23.Shukla K, Dikshit P, Shukla R, Gambhir JK. The aqueous extract of *Withania coagulans* fruit partially reverses nicotinamide/streptozotocin induced diabetes mellitus in Rats. *J Med Food* 2012;15:718-25. oi:10.1089/jmf.2011.1829.
- 24.Choobineh H, Gilani MAS, Pasalar P, Jahanzad I, Ghorbani R, Hassanzadeh G. The effects of testosterone on oxidative stress markers in Mice with spinal cord injuries. *Int J Fertil Steril* 2016;10:87-93. Doi: 10.22074/ijfs.2016.4773.
- 25.Guzman DC, Mejía GB, Vazquez IE, Garcia EH, del Angel DS, Olguin HJ. Effect of testosterone and steroids homologues on indolamines and lipid peroxidation in Rat brain. *J Steroid Biochem* 2005;94:369-73. Doi:10.1016/j.jsbmb.2004.11.006.
- 26 .Tothova L, Celec P, Ostatnikova D, Okuliarova M, Zeman M, Hodosy J. Effect of exogenous testosterone on oxidative status of the testes in adult male rats. *Andrologia* 2013;45:417-23. Doi:10.1111/and.12032.

## The Effects of Hydro-Alcoholic Extract of *Withania coagulans* on Antioxidant Status and Sperm Parameters Following Testosterone Administration in Rat

Sarbishegi M<sup>1</sup>, Khajavi O<sup>1\*</sup>

(Received: December 12, 2017

Accepted: February 24, 2018)

### Abstract

**Introduction:** Enhancement of testosterone levels or using improperly and arbitrarily of testosterone can disrupt fertility. Today, the use of medicinal herbs for the treatment of hormonal disorders and infertility has been considered. In the present study, the effects of hydro-alcoholic extract of *Withania coagulans* (WCE) on sperm count and viability, gonadosomatic index, malondialdehyde(MDA) level and total antioxidant capacity(TAC) were investigated in testis of rats following testosterone injection.

**Materials and methods:** In the current experimental study, 48 male Wistar rats were divided into 6 groups (n = 8). Control, Sham, Testosterone propionate (TP), and 3 TP treated with WCE (250, 500, and 1000 mg/kg/day). TP 3 mg/kg/body weight was injected subcutaneously and vehicle or WCE was administrated by oral gavage for 4 weeks. At the end of the gonadosomatic

index, sperm count and viability, MDA and TAC level were measured.

**Finding:** The results showed a significant decrease in gonadosomatic index, sperm count, sperm viability and TAC level and increase in MDA level in TP group compared to control group (p<0.001). WCE significantly improved the sperm qualitative parameters and TAC, and decreased MDA level in the treated groups as dose dependently (P < 0.05).

**Discussion & Conclusion:** It seems *Withania coagulans* extract could improve the fertility parameters, and might be useful to treat infertility problems although more research is required.

**Keywords:** *Withania coagulans*, Testosterone, Total antioxidant capacity, Malondialdehyde, Rat.

1. Dept of Anatomy, Faculty of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

\*Corresponding author E mail: ozrakhajavi@gmail.com