فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۶، جلد ۱۰، شماره ۱، زمستان ۹۵، صفحه ۴۱ تا ۵۱

بررسی اثر عصاره اتانولی و هگزانی گیاه خارخاسک(*Tribulus terrestris*) بر روی کیفیت اسپرم و بافت شناسی بیضه های موش نر رت

بیتا بهبودیان[۱]، مجید پورسلطانی[۲]
۱- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کاشمر، خراسان رضوی. ایران. bita_behboodian@yahoo.com
۲- همکار پژوهشی مدرس دانشگاه فرهنگیان شهید بهشتی، مشهد. ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۲۵ تاریخ پذیرش:۹۵/۱۱/۸

چکیده

زمینه و هدف: حدود ۱۰ درصد مردان مشکل جنسی و ناباروری دارند. امروزه تحقیقات زیادی در رابطه با ناباروری و اثرات گیاهان دارویی بر آن صورت گرفته است. عصاره آبی خارخاسک دارای استروئیدهای ساپونین و پرودیوسین است که توانایی افزایش هورمون های جنسی به ویژه هورمون تستوسترون را دارد. هدف از این پژوهش بررسی اثر عصاره اتانولی و هگزانی گیاه خارخاسک(*Tribulusterrestris*) بر روی کیفیت اسپرم و بافت شناسی بیضه های موش نر رت می باشد.

روش کار: در تحقیق حاضر عصاره های هگزانی و اتانولی ۸۰٪ گیاه خارخاسک تهیه و به دو دسته موش و هر دسته مشتمل بر ٤ گروه ۸ تایی عصاره هایی با دوز های ۵، ۱۰و ۲۰ میلی گرم بر وزن بدن خورانده شدند. پس از گذشت ٤۵ روز از تیمار، اسپرم و بافت بیضه سرم خونی موش ها جهت بررسی های بیوشیمیایی و بافت شناسی نمونه برداری گردید.

یافته ها: عصاره های هگزانی به مقدار کمی بر میزان هورمون های جنسی و تعداد اسپرم موثر بود ولی عصاره اتانولی میوه خارخاسک نه تنها باعث افزایش هورمون های جنسی لوتئینی و تستوسترون می شود بلکه باعث افزایش فعالیت اسپرم سازی در لوله-های اسپرم ساز و تغییر بافتی در بیضه ها گردید. تیمار بر وزن بدن و وزن اندام های مختلف از جمله وزن بیضه ها و اپی دیدیم موثر نبود.

نتیجه گیری: عصاره اتانولی خارخاسک موجب افزایش هورمون جنسی و فعالیت اسپرم سازی می گردد.

واژه های کلیدی: خارخاسک، اسپرم، ناباروری، تستوسترون، هورمون لوتئینی.

مقدمه

ناباروری یک مشکل ناخوشایند است و حدود ۱۰ درصد مردان مشکل جنسی و ناباروری دارند و حدود ۵۰ درصد مشکلات ناباروری مربوط به زوج های نابارور، مربوط به مردان است(۳۵، ۳۳). درمان های پزشکی تاکنون نتوانسته مشکلات ناباروری مردان را به طور قطعی درمان کند(۲۵). روش های جدید پزشکی قابل دسترس مانند تکنولوژی لقاح مصنوعی(ART) هزینه زیادی دارد و در عین حال احتمال موفقیت آن کمی داشته است(۳۴) و اثرات جانبی نیز دارد(۲۸). عوامل محیطی یکی از فاکتورهای مهم در ناباروری است(۱). مطالعه ناباروری نشان می دهد فاکتورهای تحت تاثیر عوامل ژنتیکی ناباروری به وسیله عوامل محیطی قابل درمان است(۳۷). مهم ترین فاکتورهای محیطی در مواد غذایی یافت می شوند(۱۸). مطالعات روی حیوانات نشان می دهد فاکتورهای طبیعی تاثیر مثبت روی اسپرماتوژنز دارد(۱۳). بررسی ها نشان داده که گیاهان دارویی، دارای پتانسیل مثبت در افزایش میل جنسی و افزایش زاد و ولد در حیوانات آزمایشگاهی است(۲۹)، بنابر این گیاهان دارویی می توانند نقش بسیار موثری در درمان ناباروری بازی کنند. گیاهان منشا اصلی کشف داروهای ناباروری

هستند(۱۰). حدود ۴۰ درصد داروهای ناباروری منشا گیاهی دارند(۲۷) با این حال بسیاری از صنایع داروسازی مطالعه روی گیاهان دارویی را کاهش داده اند. به طوری که در مقایسه داروهای شیمیایی با داروهای گیاهی، این داروها اثرات بسیار قوی ندارند. مطالعه و تحقیقات روی گیاهان دارویی در مقایسه با تهیه داروهای متداول شیمیایی سخت تر و زمان بر هستند(۱۸). باور بر این است که در آینده بسیاری از داروها به صورت صنعتی تولید خواهند شد(۳۹)، اگر چه خود داروهای صنعتی دارای چندین شاخه و گروه متفاوت هستند که باید مورد بررسی قرار گیرند(۱۶). گیاهان همانند یک کارخانه شیمیایی در حدود ۴۰۰ میلیون سال تحت تکامل مداوم ساخت مواد شیمیایی بوده و در طول تکامل گیاهان همانند یک شبکه پیچیده تولید مواد شیمیایی که فراتر از تخیل متخصصان است را بر عهده داشته اند. عقیده بر این است که تکامل و تولید ترکیبات شیمیایی در گیاهان همراه با ایجاد بیماری در طول تکامل بوده است، بنابر این داروهای شیمیایی برای درمان بیماری های طبیعی انسانی نمی تواند به خوبی داروهای گیاهی باشند(۳۹، ۸). درمان بیماری های جنسی توسط گیاهان در طول تاریخ به اثبات رسیده است(۴۱). همان طور که گزارشات نشان می دهند گیاهان می توانند ناباروری را درمان و رفتارهای جنسی را تقویت نمایند، اگرچه بیشتر این گزارشات جنبه سنتی و بومی داشته است ولی برخی از آن ها از نظر علمی به اثبات رسیده است(۲۰). کشف داروهای جدید براساس استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و چگونگی تاثیر آن بر متابولیسم ترکیبات شیمیایی بافت ها مورد بررسی قرار می گیرد(۱۴). آزمایشات روی مدل های حیوانی انجام می شوند، چرا که در شروع این داروها را نمی توان به طور مستقیم برای انسان به کار برد(۳۶). برای این کار معمولاً از جوندگان به عنوان مدل های حیوانی در آزمایشات اولیه بالینی استفاده می‌شود(۲۱). نتایج به دست آمده به عنوان رفرنس در تولید و تحول داروهای آینده و تست های پاراکلینیکی استفاده می گردد(۲۳). گیاه خارخاسک یکی از گیاهانی است که برای درمان ناباروری به کار می رود. مطالعات نشان داده که عصاره آبی خارخاسک دارای استروئیدهای ساپونین و پرودیوسین است که توانایی افزایش هورمون های جنسی از جمله هورمون تستوسترون را دارا می باشند. گاتمن و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که عصاره آبی گیاه خارخاسک باعث افزایش میل جنسی و افزایش وزن پروستات می شود(۲۲). احمد و همکاران نشان دادند که عصاره اتانولی ۷۰٪ خارخاسک نه تنها خاصیت آنتی باکتریال دارد بلکه هورمون تستوسترون را در حیوان آزمایشگاهی افزایش می دهد(۴). در مقابل آنتونیو و همکاران این موضوع را در دوزهای انتخابی شان تائید نکردند(۷). آزمایشات انجام شده نشان می دهد که نه تنها نوع و چگونگی تهیه عصاره مهم است بلکه دوز و زمان تیمار نیز بسیار اهمیت دارد. چرا که حلال ها و چگونگی استحصال ترکیبات موثره می تواند بر میزان و کیفیت عصاره تاثیر داشته باشد. در تحقیق حاضر از حلال هایی استفاده شده است که بتوانند بیشترین ترکیبات غیر قطبی و قطبی را در خود حل کنند و از طرفی تهیه عصاره در دمای محیط صورت گرفت تا ترکیبات موثره آن بدون تغییر حفظ شود. برای این منظورجهت تهیه عصاره از محلول های هگزان و اتانول ۸٪ در دمای محیط استفاده شد تا حداکثر ترکیبات موثره آن استخراج گردد. اگر چه ساپونین و پرودیوسین محلول در آب هستند ولی ترکیبات موثره زیادی توسط حلال هگزانی استخراج خواهد شد(۱۱). تهیه عصاره در دمای محیط می تواند احتمال آسیب به ترکیبات شیمیایی را کم و حداکثر ترکیبات موثره عصاره آن حفظ گردد(۲). هدف از این آزمایش مقایسه و بررسی اثر مواد موثره موجود در حلال هگزان(مواد موثره غیر قطبی) و

مواد موثره موجود در حلال الکلی ۸۰٪(مواد موثره قطبی) بر روی تولید اسپرم و بیضه ها می باشد.

موادو روش ها

حدود ۲ کیلو میوه گیاه خارخاسک(*T.terrestris*) تهیه و توسط دانشکده علوم، بخش گیاه شناسی دانشگاه فردوسی مورد بررسی و پس از بررسی دقیق و تائید میوه ها، مورد آزمایش قرار گرفت. حیوانات به کار رفته در این آزمایش ۶۴ موش رت(*Sprague – Dawley*) ۸ هفته ای خریداری شده از انستیتو رازی مشهد بودند. برای تهیه عصاره ها ابتدا پودر میوه گیاه خارخارسک در هگزان و اتانول مخلوط و پس از ۴۸ ساعت تکان دادن(شیک شدن) صاف و پودر صاف شده خشک و در اتانول ۸۰٪ مخلوط گردید. مخلوط صاف و حلال ها به وسیله دستگاه تبخیرکننده جدا و عصاره هاکاملاً خشک گردیدند(۲) و تا هنگام مصرف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. عصاره های هگزانی و اتانولی به نسبت دوزهای ۵ و ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش ها هر هفته تهیه و برای خوراندن ساده تر به ترتیب در روغن ذرت و آب حل یک سی سی به هر حیوان در ساعت معین برای ۴۵ روز به حیوان خورانده شد(۴). گروه های شاهد نیز به همان حجم روغن ذرت خالص و آب خورانده شدند(۵). در روز چهل و ششم ابتدا قبل از بی هوشی، موش ها وزن و سپس به وسیله کلروفرم بی هوش و جراحی شدند. قبل از مرگ موش ها حدود ۴ میلی لیتر جهت اندازه گیری هورمون ها خون گرفته و بلافاصله سرم از آن جدا گردید. اپی دیدیم بیضه های جدا شده، قطعه قطعه و در ۱۵ میلی لیتر محلولBWW قرار گرفتند(۱۷). پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ۵٪ اسپرم ها شمارش شد. شمارش اسپرم ها مطابق روش کوییست و بورندا انجام گرفت(۲۶). اندازه گیری میزان تحرک اسپرم ها براساس استاندارد بیان شده توسط WHO, صورت پذیرفت(۴۲).

اپی دیدم و بیضه ها جدا شده و جداگانه وزن و بیضه ها در محلول بوین برای مطالعه بافتی قرار گرفت. پس از چند روز که بیضه ها در محلول بوین قرار داده شدند مراحل بافت شناسی با روش هاماسن انجام شد(۲۴). اندازه گیری هورمونی با استفاده از کیت های هورمونی تستوسترون، LH و FSH مطابق دستورالعمل انجام گرفت. تحلیل آماری با استفاده از روش آنالیزی تجزیه واریانس ANOVA انجام و همه داده ها براساس مقایسه میانگین به دست آمده(LSD) بررسی و در سطوح ۰/۰۵ ≥P، ۰/۰۰۱ >P مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

شمارش اسپرم

بررسی عصاره هگزانی افزایش تعداد اسپرم ها در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تغییرات معنی داری($p<0/05$) را نشان داد. به طوری که تعداد اسپرم ها در دوز ۱۰ میلی گرم $x10^6$ (۹/۴۱ ±۱۴۱/۲۶) افزایشی برابر با ۳۱/۲٪ نسبت به گروه شاهد[$x10^6$(۱۰/۹۵± ۱۱۳/۶۸)] نشان داد. مطالعه تعداد اسپرم در دوز ۵ میلی گرم نیز افزایش اسپرم را نشان داد که افزایش معنی داری نسبت به تعداد اسپرم ها در گروه کنترل نداشت. هم چنین دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره هگزانی میوه گیاه خارخاسک افزایش اسپرم معنی داری($p<0/05$) را نشان داد، به طوری که تعداد اسپرم در این دوز $x10^6$(۱۲/۸۹ ± ۱۳۸/۶۶) افزایش ۲۴/۴ ٪ نسبت به گروه کنترل را نشان داد که این در مقایسه با دوز ۱۰ میلی گرم کمتربود(جدول ۱). لازم به ذکر است که تمام گروه های آزمایشی کیفیت اسپرم درجه "a" را نشان می دهد. در گروه های آزمایشی با عصاره اتانولی نیز در روز ۴۶ ام حیوانات بیهوش و بعد از جراحی اپی-دیدیم و بیضه ها خارج و آزمایشات لازم صورت گرفت. شمارش اسپرم در این گروه ها نشان داد که تعداد اسپرم در همه گروه های آزمایشی با عصاره اتانولی در

مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری داشته است(جدول۱). در دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ۳۴/۷۶٪ افزایش مشاهده شد. بدین معنی که تعداد $x10^{6}$ (۷/۸ ± ۱۰۷/۷۸) اسپرم در گروه کنترل به $x10^{6}$(۱۴/۹۶ ±۱۴۵/۲۵) در گروه آزمایشی با دوز ۵ میلی گرم بر وزن بدن افزایش یافت که تغییر معنی داری را نشان می دهد($p<۰/۰۰۱$). هم چنین تعداد اسپرم در گروه های تیماری ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش به ترتیب ۳۸٪ و ۴۰/۵٪ افزایش اسپرم نشان داد. بدین ترتیب تعداد اسپرم به ترتیب $x10^{6}$(۲۲/۹۳ ±۱۴۹/۴۸) و $x10^{6}$(۱۶/۱۷ ±۱۵۱/۵) افزایش معنی داری ($p<۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه کنترل[$x10^{6}$ ۸۷± ۱۰۷/۷۸] داشت. هم چنین این آزمایش نشان داد با افزایش دوز عصاره اتانولی گیاه خارخاسک از ۵ به ۲۰ میلی گرم تعداد اسپرم ها نیز افزایش داشته و بهترین دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بوده است. کیفیت اسپرم ها در تمام گروه های آزمایشی و شاهد درجه "a" بود.

جدول ۱-میانگین تعداد اسپرم($x10^{6}$) در موش های رت آزمایشی با عصاره های آلی گیاه خارخاسک(ETT)

	۲۰	۱۰	۵	شاهد
عصاره هگزانی	۱۳۸/۶۶±۱۰/۹۵ *	۱۴۱/۲۶±۹/۴۱ *	۱۲۵/۲±۱۳/۸۵	۱۱۳/۶۸± ۱۰/۹۵
عصاره اتانولی ۸۰٪	۱۵۱/۵± ۱۶/۱۷**	۱۴۹/۴۸±۲۲/۹۳**	۱۴۵/۲۵± ۱۴/۹۶	۱۰۷/۷۸ ± ۸۷

(**) افزایش معنی دار با ($p<۰/۰۰۱$)

محاسبه LH و FSH

آزمایشات انجام شده نشان می دهد که در گروه آزمایشی با عصاره هگزانی گیاه خارخاسک میزان هورمون های LH و FSH تغییر معنی داری نشان نمی-دهد(P> ۰/۰۵). ولی این هورمون ها در گروه آزمایشی با عصاره اتانولی گیاه خارخاسک افزایش معنی داری در دوز های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن موش نشان می دهد به طوری که میزان هورمون LH از ۰/۱۸± ۰/۹۶ نانوگرم بر میلی لیتر در گروه کنترل به ۰/۰۲± ۱/۲ نانوگرم بر میلی لیتر در دوز ۱۰ و ۰/۰۲۳ ±۱/۳۲ نانوگرم بر میلی لیتر در دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت معنی داری($p< ۰/۰۵$) افزایش پیدا کرده است. تحقیقات انجام شده افزایش معنی داری نیز برای هورمون FSH مشابه هورمون LH نشان می دهد به طوری که میزان این هورمون در گروه کنترل ۷/۹۷ نانوگرم بر میلی لیتر و در گروه آزمایشی ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره اتانولی ۹/۱۶ و در گروه ۲۰ میلی گرم عصاره اتانولی ۱۰/۰۲ نانوگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۲۱/۲٪ و ۲۵/۷ ٪افزایش نشان می دهد(جدول ۲).

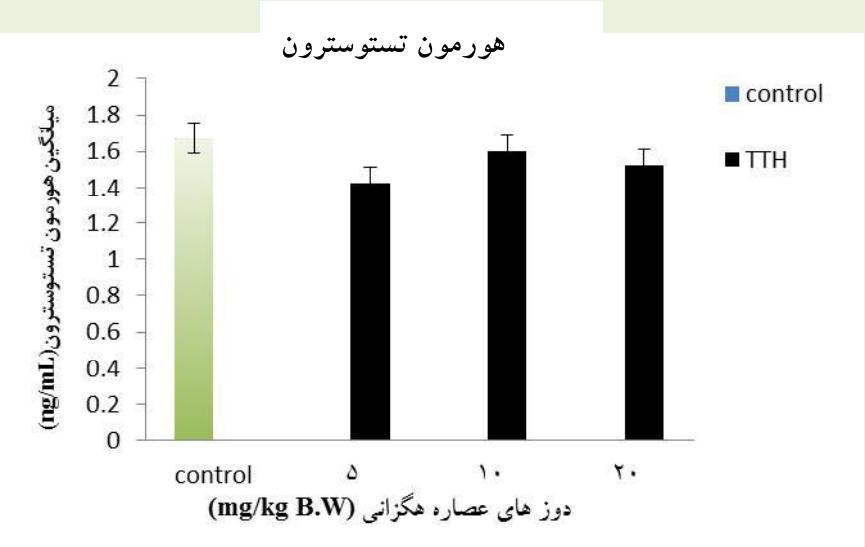
محاسبه مقدار تستوسترون

مطالعه حاضر نشان داد که میزان تستوسترون خون در گروه آزمایشی با عصاره هگزانی گیاه خارخاسک در مقایسه با گروه کنترل تغییرات معنی داری رانشان نمی-دهد(نمودار۱). آزمایش حاضر در گروه های آزمایشی با عصاره اتانولی گیاه خارخاسک افزایش هورمون تستوسترون را نشان می دهد. تیمار با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره اتانولی خارخاسک میزان هورمون تستوسترون را به ۰/۱۵ ± ۲/۱۷۲ نانوگرم(۲۹/۸٪ افزایش) و دوز ۲۰ میلی گرم عصاره اتانولی به ۰/۱۸ ± ۲/۵ نانوگرم(۴۹/۲ ٪افزایش) تغییر می دهد که تغییر معنی داری را در($p< ۰/۰۵$) و ($p< ۰/۰۰۱$) به ترتیب نشان می‌دهد، این افزایش هورمون با افزایش اسپرم در این گروه ها هماهنگی دارد(نمودار۲).

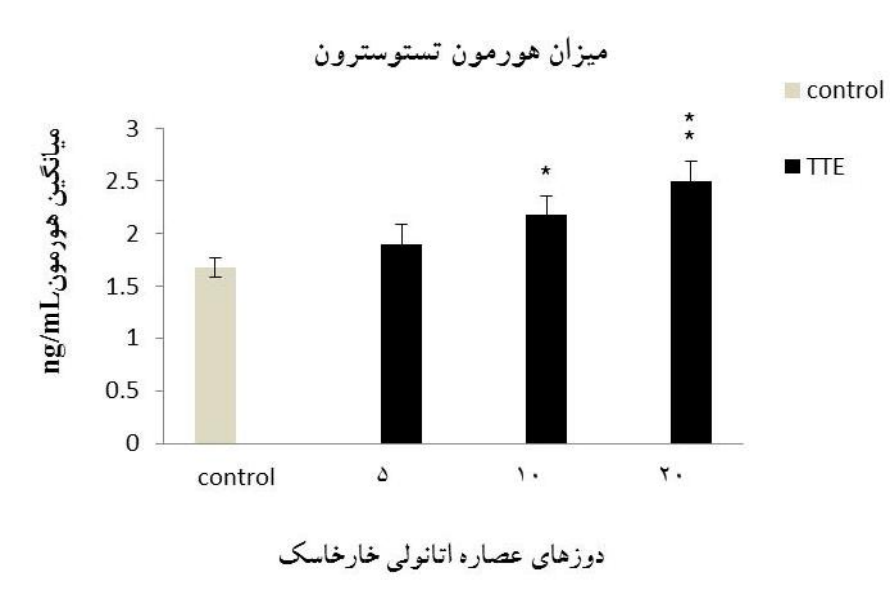
جدول ۲-میانگین هورمون FSH در موش های رت آزمایشی با عصاره اتانولی گیاه خارخاسک(ETT)

	شاهد	۵	۱۰	۲۰
LH	۰/۹۶±۰/۰۹	۱/۰۱±۰/۱۲	۱/۲±۰/۱۴*	۱/۳۲±۰/۱۵*
FSH	۷/۹۷±۰/۹۸	۸/۰۷±۱/۰۵	۹/۱۶±۱/۳۴*	۱۰/۰۲±۱/۶۴*

(*) افزایش معنی دار با (P<۰/۰۵)



نمودار۱-میانگین هورمون تستوسترون در موش های رت آزمایشی با عصاره هگزانی گیاه خارخاسک (HTT)



نمودار۲- میانگین هورمون تستوسترون در موش های رت آزمایشی با عصاره اتانولی گیاه خارخاسک (ETT)

(*) افزایش معنی دار با (p<۰/۰۵) و (**) افزایش معنی دار با (p<۰/۰۰۱)

تغییرات وزن بدن و اندام های جنسی

آزمایشات با دوز های مختلف عصاره هگزانی و اتانولی میوه گیاه خارخاسک تغییرات معنی داری را بر روی وزن بدن و وزن اندام های جنسی(اپی دیدیم و بیضه ها) در موش های رت نر در مقایسه با گروه های کنترل نشان ندادند(جدول ۳ و ۴). در آزمایش انجام شده گروه های آزمایشی با عصاره هگزانی گیاه خارخاسک افزایش وزنی مشاهده شد که در مقایسه با گروه شاهد تغییر

معنی‌داری را دارا نبود. هم چنین وزن اندام های اپی دیدیم و بیضه ها و کبد و کلیه ها در همه گروه های آزمایشی با عصاره هگزانی همراه با افزایش دوز افزایش وزن را نشان دادند ولی این تغییر وزن در مقایسه با گروه شاهد معنی دار(۰/۰۵ >p) نبود(جدول ۳). آزمایشات با عصاره اتانولی نیز تغییرات معنی داری را در رابطه با افزایش وزن بدن و اندام های مختلف نشان نداد هر چند همانند عصاره هگزانی افزایش وزن را نشان می دادند ولی در مقایسه با گروه کنترل تغییرات معنی دار(۰/۰۵ >p) نبود(جدول ۴).

بافت شناسی

بافت شناسی بیضه ها به وسیله رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت. نتایج بافت شناسی گروه های تیمار شده با عصاره هگزانی میوه گیاه خارخاسک تغییرات بافت شناسی مشخصی را نسبت به گروه شاهد نشان نمی داد(شکل ۱). هم چنین مطالعات دوزهای مختلف در سطوح بافت شناسی از اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه و اسپرماتید و اسپرم در گروه های تیمار با عصاره هگزانی و گروه شاهد تفاوت بارزی را نشان ندادند. در مطالعه بافت شناسی عصاره اتانولی خارخاسک لایه های زاینده در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد. بافت شناسی گروه آزمایشی ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اتانولی گیاه خارخاسک افزایشی را در تمام سطوح سلول های اسپرماتوژنیک مانند اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت ها و اسپرماتید ها و اسپرم را نشان داد (شکل ۱).

جدول۳- اثر عصاره هگزانی گیاه خارخاسک بر روی وزن اندام های مختلف (بر حسب گرم)

افزایش وزن بدن (گرم)	گروه کنترل	TTE20	TTE10	TTE5
اندام ها	۷۵/۱۳±۵/۶۶	۸۱/۵۶±۵/۱۲	۷۸/۵۴±۷/۸۴	۷۴/۷۰±۴/۹۲
اپی دیدیم	۰/۳۸۱±۰/۰۸۶	۰/۴۳۱±۰/۰۶۴	۰/۴۱۶±۰/۰۷۹	۰/۳۹۶±۰/۰۱۶
بیضه	۳/۱۴۹±۰/۲۶۱	۳/۲۶۰±۰/۲۰۱	۳/۱۸۹±۰/۵۶۱	۳/۱۶۴±۰/۱۹۸
کلیه	۲/۲۵±۰/۲۴	۲/۸۶±۰/۱۲	۲/۷۲±۰/۲۳	۲/۵۲±۰/۲۵
کبد	۱۲/۲۴±۱/۸	۱۳/۳۶±۱/۷۳	۱۳/۱±۰/۹۵	۱۲/۸۶±۱/۵۴

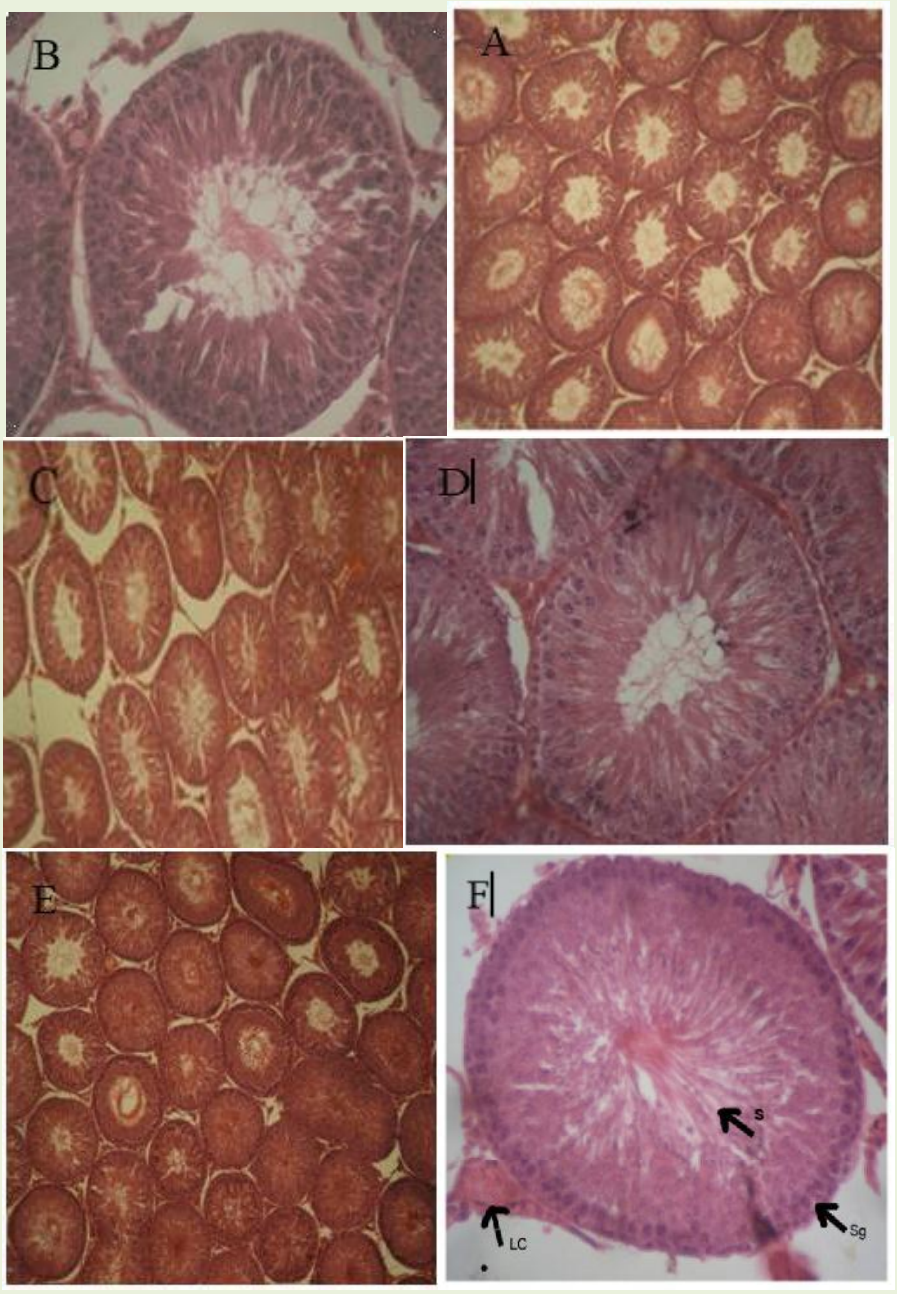
جدول ٤-اثرعصاره اتانولی میوه گیاه خارخاسک برروی وزن اندام های مختلف موش رت نر (برحسب گرم)

فاکتورهای		گروه ها		
اندازه گیری شده	گروه کنترل	TTH20	TTH10	**TTH5**
افزایش وزن بدن (گرم)	۶/۷۶±۷۷/۳۸	۴/۷۹±۸۰/۱۸	۵/۷۱±۷۹/۸۸	۵/۳۲±۷۷/۵۰
اپی دیدیم	۰/۳۵۹±۰/۰۸۶	۰/۳۶۱±۰/۰۵۴	۰/۳۷۲±۰/۰۹۷	۰/۳۶۸±۰/۰۴۶
بیضه	۳/۱۸۳±۰/۲۵۱	۳/۲۸±۰/۱۸۱	۳/۱۹۴±۰/۲۷۵	۳/۱۳۰±۰/۱۹۸
کبد	۱۳/۸۲±۱/۲۶	۱۳/۷۹±۱/۴۷	۱۳/۹±۱/۰۲	۱۲/۸۶±۱/۵۴
کلیه	۲/۵۶±۰/۱۵	۲/۷۲±۰/۱۶	۲/۷۶±۰/۱۸	۲/۶۸±۰/۲

بحث ونتیجه گیری

عصاره هگزانی گیاه خارخاسک تعداد اسپرم را افزایش می دهد اما سطح هورمون تستوسترون در خون را به صورت معنی داری افزایش نمی دهد. احمد و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که عصاره هگزانی گیاه خارخاسک به صورت فعال و بیولوژیک نمی توانند باعث افزایش هورمون تستوسترون خون شود(۴). در مطالعه حاضر نشان داده شد که عصاره اتانولی میوه خارخاسک میزان تستوسترون خون را در حیوانات آزمایشی افزایش می دهد و بهترین دوز عصاره اتانولی برای گیاه خارخاسک ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن

بدن است به طوری که باعث افزایش معنی دار(۰/۰۰۱ >p) اسپرم و میزان هورمون های LH، FSH و تستوسترون نیز در مقایسه با گروه کنترل شد. مطالعه بافت شناسی بیضه ها نشان داد عصاره میوه گیاه خارخاسک باعث تغییر در تمام سطوح لایه های اسپرماتوژنز شده به طوری که لوله لومن مملو از سلول های زاینده و اسپرم گردید. گیاه خارخاسک گیاهی دارویی مهم و شناخته شده ای در لیست گیاهان دارویی چینی است و در درمان بیماری های دستگاه ادراری و در افزایش قدرت و حجم عضلات موثر است(۶). ترکیبات اصلی در عصاره گیاه خارخاسک ترکیبات استرادیول ساپونین و پرودیوسین هستند. این ترکیبات ثانویه مهم بر فعالیت جنسی موثر هستند. دلیل این امر تاثیر پروتودیوسین بر هورمون DHEA (دهیدرواپی آندروسترون) است. هر دو ماده موثره گیاهی نشان می دهند که بر بیضه ها و فعالیت جنسی موثر بوده و آن را تحریک می کند(۱۱،۲۲). ساپونین یک ماده طبیعی تحول یافته و فعال شده گلیکوزیدی است و ترکیبات مهمی از آن در گیاهان و به مقدار کمتر در حیوانات دریایی و بعضی باکتری ها یافت می شود(۴۳، ۳۸). ساپونین ها نام خود را از توانایشان در تشکیل مشتقات پایدار صابونی در محلول های آبی به دست آورده اند. این ویژگی که به راحتی قابل تشخیص است از قدیم مورد توجه انسان ها بوده است. ساپونین شامل یک بخش میانی است که شامل گلوکز، گلوکورونیک اسید،گالاکتوز،گزیلوز یا رامنوز یا متیل پنتوز بخش قندی است که به یک بخش آبدوست(ساپوژنیک) که ممکن است تری ترپنوئید یا استروئید باشد در حالت طبیعی متصل می شود. مطالعات در رابطه با اثرات جنسی و یا ورزشی این گیاه به صورت ترکیبی با عصاره ها و یا گیاهان دیگر مطالعه شده است که نمی تواند اثر میوه این گیاه را به تنهایی نشان دهد(۷،۱۹). در آزمایشات علمی خاص باید ماده مورد آزمایش به صورت خالص مورد توجه قرار گیرد ولی در مورد گیاه خارخاسک بسیاری از جمله مطالعه حاضر نشان داده که عصاره اتانولی میوه خارخاسک در فعالیت-های جنسی و افزایش تستوسترون و هورمون های LH و FSHخون و هم چنین افزایش اسپرم در موش نر رت موثر بوده است. همان طور که نشان داده شده خارخاسک باعث افزایش تستوسترون، DHT (دهیدروتستوسترون) و DHEAS (د هیدرو اپی آندوتسترون سولفات) در پریمات ها می شود(۵). خارخاسک یک محرک طبیعی هورمون LH و ترشح تستوسترون و تولید سیگنال های بیشتری برای تولید تستوسترون می باشد(۳۲). ساپونین های خارخاسک به گیرنده های هورمون جنسی در هیپوتالاموس متصل شده و باعث می شود، که هیپوتالاموس برداشت غلطی از سطح هورمون های جنسی داشته و مقدار آن را کمتر از حد طبیعی در نظر بگیرد و این باعث ترشح سیگنال های ترشحی LH و هورمون های محرک جنسی کند(۳۱). با افزایش میزان ترشح LH مقدار هورمون های جنسی تستوسترون نیز افزایش می یابد. گیاهان دارویی از سال ها پیش برای درمان سریع اختلالات جنسی و نعوظ بکار می رفته است(۳). مطالعات انجام شده روی مردان با بیماری-های اولیگواسپرمیای ایدوپاتیک متوسط نشان داد که پرودیوسین می تواند باعث افزایش سطح تستوسترون و درمان آن ها شود(۹). مارشال در سال ۱۹۸۴ نشان داد که مواد محرکه خارجی هورمون تستوسترون و اسپرماتوژنز را تحریک می کند (۳۰). در یک آزمایش غیر انسانی تکامل سطوح متفاوت اسپرماتوژنز در بیضه میمون های تحت درمان با تستوسترون مشاهده شد. در این آزمایش اسپرم ها در انزال میمون های نابالغ یافت شد. بیماران مبتلا به تاخیر بلوغ پس از درمان با تستوسترون به بلوغ جنسی رسیدند.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ نوری از بیضه ها و لوله های اسپرم ساز

شکل های (A) و (B) تصویرهای گروه شاهد با بزرگنمایی ۱۰۰ x و ۴۰۰ x نشان می‌دهد و شکل های (C) و (D) گروه تیمار شده با عصاره هگزانی و شکل های (F) و (E) گروه تیمار شده با عصاره اتانولی را نشان می دهد. نمونه های هگزانی تفاوت معنی داری با گروه شاهد نشان نمی دهد ولی نمونه های اتانولی این تفاوت را در تمام سطوح اسپرماتوژنز نشان می دهد. لوله اسپرم ساز در گروه اتانولی مملو از اسپرم و اسپرماتید است. (CL: سلول های لایدیک) و (Sg: اسپرماتوگونی) و (S: اسپرم) رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین

نیچیو ومیتئو گزارش کردند که گیاه خارخاسک نمی‌تواند باعث افزایش در میزان تستوسترون یا هورمون LH در مردان جوان و بالغ شود(۳۲). براون دریافت که ماده معمول آندواستاتین و یک عصاره گیاهی از خارخاسک نمی تواند میزان تستوسترون آزاد و یا تستوسترون کل خون را افزایش دهد(۱۵). در سال ۱۹۹۴ ویکتوروف گزارش کرده که عصاره گیاه خارخاسک تعداد اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت ها و اسپرماتیدها را

در بیضه موش نر افزایش می دهد. او یک محرک سنتز DNA را تحت اثر پرودیوسین گزارش کرد(۴۰). چک و همکاران نشان دادند اسپرماتوژنز در طول درمان با خارخاسک نسبت به گروه کنترل شتاب می گیرد و بافت‌شناسی بیضه در گروه تیمار با خارخاسک افزایش تعداد سیکل اسپرماتوژنیک و سطوح اسپرماتوژنتیک را نشان داد(۱۷). بشیر در سال ۲۰۰۹ نشان داد که عصاره آبی گیاه خارخاسک با دوز ۷۰ میلی گرم بر وزن بدن می تواند وزن بیضه ها، وزن بدن و هم چنین قطر لوله های اسپرم ساز را پس از دو هفته در موش توله (rats PUP) مسن افزایش می دهد (۱۲). این پژوهش نشان داد که میوه گیاه خارخاسک در درمان ناباروری موثر است و تاثیر عصاره اتانولی این گیاه اثر بخشی بیشتری نسبت به عصاره هگزانی آن دارد، چرا که ترکیبات موثره آن در عصاره اتانولی–آبی بیشتر است. این تحقیق هم چنین نشان داد عصاره اتانولی با دوز ۲۰ میلی گرم بر وزن بدن تعداد اسپرم را بیش از ۴۰ درصد و هورمون های LH و FSH به ترتیب بیش از ۲۱ و ۲۵ درصد و هورمون تستوسترون را بیش از ۴۹ درصد افزایش می دهد و این نشان می دهد که بهترین عصاره و دوز عصاره اتانولی و دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن است.

منابع

۱–گایتون، ه. ۲۰۰۶. کتاب فیزیولوژی پزشکی چاپ یازدهم پنسیلوانیا.

2.Adaikan Pg, G.K., Prasad Rnv, Ng Sc.(2000). Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* extract on the rabbit corpus cavernosal smooth muscle in vitro. Annals Academy of Medicine, Singapore, 29(1); 22-26.

3.Adimoelja, A. (2000). Phytochimicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions. Int J Androl, 23(2); 82-84.

4.Ahmed, A., Hussain, A. a. M., Heba, H. I., Amir, H. A. (2009). Study the biological activities of *Tribulus terrestris* extracts. World Academy of Science, Engineering and Technology, 57; 433-435.

5.Akram, M., Asif, H. M., Akhtar, N., Shah, P. A., Uzair,M., Shaheen, G. (2011). *Tribulus terrestris* Linn. A Review Article. Journal of Medicinal Plants Research, 5(16); 3601-3605.

6.Anand, R., Patnaik, G.K., Kulshreshtha, D.K., Dhawan, B.N. (1994). Activity of certain fractions of *Tribulus terrestris* fruits against experimentally induced urolithiasis in rats. Indian Journal of Experimental Biology, 32(8); 548-552.

7.Antonio, J. (2000). The effects of *Tribulus terrestris* on body composition and exercise performance in resistance-trained males. Int. J. Sp. Nut. Exerc. Met., 10; 208-215.

8.Apers, S. (2000). Structure elucidation and biological evaluation of active constituents isolated from three medicinal plants: maesa lanceolata, aleurites moluccana and quassia africana. Tesis Ph.D Faculteit Medische en farmaceutische Wetenschappen, Universitteit Antwerpen.

9.Arsyad, K. M. (1996). Effect of protodioscin on the quantity and quality of sperms from males with moderate idiopathic oligozoospermia. Medika, 22(8); 56-60.

10. Balandrin, M. F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science, 228; 1154-1160.

11. Bart, J.C.J. (2005). Additives in polymers, industrial analysis and applications. UK. John wley & Sons, Ltd. P; 66-68.

12. Bashir, A., Tahir, M., Samee,W., Munir, B. (2009). Effect of Tribulus terrestris on teaticular development of immature albino rats. Biomedica, 25; 63 – 68.

13. Biggers, J. D., Whitten, W.K., Whittingham, D. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. San Francisco, CA: Freeman,

14. Briggs, G.B., Oehme, F.W. (1980). Toxicology. New York: Academic Press.

15. Brown, Ga., Reifenrath, V.M., Ta, Uhl Nl., Parsons, Ka., Sharp, Rl. (2000). Effects of anabolic precursors on serum testosterone concentrations and adaptations to resistance training in young men. . *Int* J Sport Nutr Exerc Metab, 10(3); 340-359

16. Butler, M.S. (2004). The role of ntural product chemistry in drug discovery. J.Nat.Prod, 67; 2141-2151.

17.Çek, S., Turan, F., Atik, E. (2007). Masculinization of convict cichlid (cichlasoma nigofasciatum) by immersion in Tribulus terrestris extract. Aquacult Int, 15(2); 109-119.

18. Cordell, G.A., Colvard, M.A. (2005). Some thoughts on the future of ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology, 100; 5-14.
19. Ebisch,I.M.W., Pierik, F.H.P., De Jong, F.H., Thomas, C.M.G., Steegers-Theunissen, R.P.M. (2006). Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in man. Int. J. andr., 29(2); 339-345.
20. Elferink, J.G.R. (2000). Aphrodisiac use in pre-columbian aztec and inca culture. Jounal of the History of Sexuality. 9(1); 25-36.
21. Farnsworth, N.R. (1992). Preclinical assesment of medicinal plant dlm baba, s. (Pnyt). Natural Resourcer and Human Health-Plants of Medicinal andNutritionalValue, 89; Elsevier. Amsterdam.
22. Gauthaman, K., Adaikan, P.G., Prasad, R.N. (2002). Aphrodisiac properties of Tribulus terrestris extract (protodioscin) in normal and castrated rats. Life Sci., 71; 1385-1396.
23. Greaves, P. (1990). Histopathology of preclinical toxicity studies: Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation.
24. Humason, G. L. (1979). Animal Tissue Techniques. San Fransisco: Freeman.
25. Kohn, F. M. (2001). Nonmedical and Naturopathic Approaches to Treatment of Male Fertility Dlm Proceedings of the 7th Andrology Symposium. treatment of male infertility-viewpoints, controversies, perspectives. Anjuran giessen, Gremany,
26. Kvist, V., Bjorndahl, L. (2002). Manual on basic semen analysis. Oxford: Oxford University Press.
27. LaFrance, J., Lauterbach, E.C., Coffey, C.E., Salloway, S.P., Kaufer, D.I., Reeve, A. (2000). The use of herbal alternative medicines in neuropsychiatry. J. Neuropsychiatry Clin Neurosci, 12; 177-192.
28. Lefie'vre, L., Bedu-Addo, K., Conner, S.J., Machado-Oliveira, G. S. M., Chen, Y., Kirkman-Brown, J.C. (2007). Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? Reproduction, 133:675-684.
29. MacKay, D. (2004). Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence. Alter. Med. Rev, 9(1); 4-16.
30. Marshall, G. R.,Wickings, E.J., Nieschlag, E. (1984). Testosterone can initiate spermatogenesis in an immature nonhuman primate, macaca fascicularis. Endocrinology, 114(6); 2228-2233.
31. Milanov, S., Maleeva, E., Taskov, M. (1985). Tribestan effect on the concentration of some hormones in the serum of healthy volunteers. Med-Biol Inf., 4; 27-29.
32. Neychev, V. K., Mitev, V.I. (2005). The aphrodisiac herb tribulus terrestris does not influence the androgen production in young men, J. Ethnopharmacol, 101; 319–323.
33. Niederberger, C., Joyce, G.F., Wise, M., Meacham, R.B. (2004). Male Infertility Washington DC: U.S. department of Health and Human Services.
34. Orgebin-Crist, M. (1998). The epididymis across 24 century. Journal of Reproduction and Fertility, 53; 285-292.
35. Pei, J., Strehler, E., Noss, U., Abt, M., Piomboni, P., Baccetti, B., Sterzik, K. (2005). Quantitative evaluation of spermatozoa ultrastructure after acupuncture treatment for idiopathic male infertility. Fertility and Sterility, 84(1); 141-147.
36. Plant, T.M., Marshall, G.R. (2001). The in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates.functional significance of FSH. Endocrine Reviews, 22(6); 784-786.
37. Quallich, S. (2006). Examining male infertility. Urologic Nursing, 26(4); 277-288
38. Riguera, R. (1997). Isolating bioactive compounds from marine organisms. Journal of Marine Biotechnology, 5; 187-193.
39. Simmonds, M.S.J., Grayer, R.J. (1999). Plant drug discovery and development chemical from plants perspectives on plant secondary product. Anjuran Imperial College press & World Scientific Publishing. London.
40. Viktorov, I., Bozadjieva, E., Protich, M. (1994). Pharmacological, pharmacokinetic, toxicological and clinical studies on protodioscin.
41. Waddell, T.G., Jones, H., Keith, A.L. (1980). Legendary chemical aphrodisiacs. Jounal of Chemical Education, 57(5); 341-342.
42-WHO. (1999). laboratory manual for the examination of human semen and semennncervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press.
43. Yoshiki, Y., Kudou, S., Okubo, K. (1998). Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean (Review). Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 62; 2291–2299.

Effect of Ethanol and Hexane Extract of *Tribulus terrestris* on Quality of Sperm and Histology of Male's Rats

B.Behbodian[1], M. Poursoltani[2]

1. Kashmar Branch, Islamic Azad University, Khorasan Razavi. Iran.. **bita_behboodian@yahoo.com**

2. Pharhngian University, Mashhad. Iran.

Received:2016.16. 10 **Accepted: 2017. 28. 1**

Abstract

Inroduction & Objective: Infertility is a serious problem. About 10% of males are estimated facing the problem of fertility. Rapid growth and development of sciences within the pharmaceutical span and focus and rely on production of herbal medicines and the production of plant-based infertility drugs is growing . Today, a lot of research regarding infertility and the effects of herbs on it and finding the best method for plant extraction takes place. Plant is the main source in discovery of novel medicine. Nearly 40% of modern medicines are originated from plants.*Tribulusterrestris* is also an important herb that used for infertility. Water extract of *T.terrestris* contains steroidal saponins and protodioscin that increased sexualhormones and testosterone. Water extract of *T.terrestris* increased sexual desire and weight of prostate.

Material and Methods: In the present study, 80% hexane and ethanol extracts of *Tribulusterrestris* prepared and force feed to two groups of mice. Each group was consist of 4subgroups with 8 mice and extract with doses of 5, 10 and 20 mg per body weight was applied on them. After 45 days of treatment the mice were anesthetized and killed.

Results: The present study showed that in comparison between ethanol and hexane extract of fruit of *T. terrestis,* in dosages 5, 10, 20 mg per weight of body, hexane extract, increased sperm count, but didn't show any significant effecton control group. Instead,ethanol extract of fruit of *T. terrestis* not only increased sexualhormones as LH and testosterone but also increased spermatogenesis in lumen of seminiferous and changed histological of testis.This extract didn't changethe weight of testis and epididymis.

Conclusion: According to the results, ethanol extraction of aloe vera as an antioxidant compound is able to reduce the levels of cardiovascular damage in mice treated with titanium dioxide nanoparticles.

Keywords: *Tribulusterrestris*, Sperm, Infertility, Testosterone, LH