Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Effect of oral administration of *Blepharis.Persica* extracts on *CATSPER* gene expression and sperm parameters in rats with spinal cord injury

Nahid Askari

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail: n.askari@kgut.ac.ir.

Mehdi Ranjbar

Assistant Professor, Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. E-mail: Mehdi.ranjbar@kum.ac.ir.

Ali Shafieipour

Graduated Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: Mehreganvc@gmail.com

Abstract

Objective

The use of herbal medicines is even more common in East. Besides, more than half of all spinal cord injuries happen in individuals aged 15 to 30, most of whom are males (80 percent). Following spinal cord injuries, male fertility especially sperm parameters such as sperm movement decreases. Male fertility depends on different parameters, such as sperm count, motility, viability and epididymal sperm reserves as well as expression levels of cation channel sperm-associated protein 1, 2 (*CATSPER1, 2*). Additionally, *Blepharis.persica* seed extract traditionally used to promote male infertility. The purpose of the present study was to measure the effect of *Blepharis.persica* aqueous extract on some semen parameters and gene expression in male rats after SCI.

Materials and methods

This experimental study was performed on 30 male Wistar rats which divided into 5 groups: one control, and four experimental groups. SCI rats orally treated with plant extract (100, 200 and 300mg Kg-1) daily for 15 days. Body weights, morphological features of testes (diameters of the seminiferous tubules), sperm parameters (motility, viability and epididymal sperm reserves) and CATSPER1, 2 gene expressions were assayed at 30th and 60th days and compared with control and SCI groups. The data were analyzed using SPSS software by one-way ANOVA test and through Tukey's test ($P<0.05$) was considered statistically significant.

Results

The results of the present study demonstrated that the sperm viability, diameters of the seminiferous tubules increased significantly (4.89%) at 300 mg Kg-1 of *Blepharis.persica* aqueous extract. Expression levels of *CATSPER1, 2* genes were significantly increased in experimental groups ($P<0.05$).

Conclusions

These results indicated that *Blepharis.persica* seed extract can improve the recovery of male fertility. This study could provide insights into consumption of plant extract in treatment of male infertility with SCI.

Keywords: *Blepharis.persica*, Fertility, Gene expression, Wistar male rat.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Askari N, Ranjbar M, Shafieipour A, (2021) Effect of oral administration of *Blepharis.Persica* extracts on *CATSPER* gene expression and sperm parameters in rats with spinal cord injury. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (2), 1-20.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (2), 1-20. DOI: 10.22103/jab.2021.17133.1290

Received: April 17, 2021. Accepted: May 24, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تاثیر مصرف خوراکی عصاره خارسنبل (*Blepharis.persica*) بر بیان ژن *CATSPER* و شاخص‌های اسپرم در موش‌های صحرایی پس از ضایعه نخاعی

ناهید عسکری

*نویسنده مسئول: استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: n.askari@kgut.ac.ir

مهدی رنجبر

استادیار، مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس ، پژوهشکده نوروفارماکولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: Mehdi.ranjbar@kum.ac.ir

علی شفیعی‌پور

فارغ‌التحصیل دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: Mehreganvc@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۳

چکیده

هدف: استفاده از داروهای گیاهی در آسیای شرقی معمول است. به‌علاوه، تقریباً ۶۲٪ از افراد با ضایعه نخاعی جوانان ۳۰-۱۵ ساله هستند که مردان حدود ۸۰٪ از این گروه را تشکیل می‌دهند. به دنبال آسیب‌های نخاعی، قدرت باروری مردان به ویژه شاخص‌های اسپرم مانند حرکت اسپرم کاهش می‌یابد. باروری مردان به پارامترهای مختلفی از جمله تعداد اسپرم، تحرک، زنده‌ماندن و ذخایر اسپرم اپیدیدیم و همچنین میزان بیان ژن کانال‌های پروتئینی یونی در غشای اسپرم ۱، ۲ (*CATSPER 1, 2*) بستگی دارد. علاوه بر این، از عصاره دانه خارسنبل به طور سنتی برای بهبود مشکلات ناباروری مردان استفاده می شود. هدف از مطالعه حاضر

سنجش اثر عصاره آبی خارسنبل بر شاخص‌های اسپرم و بیان ژن *CATSPER* در موش‌های صحرایی نر پس از آسیب نخاعی بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی ویستار در ۵ گروه شامل کنترل و چهار گروه آزمایشی انجام شد. گروه‌های حیوانی بعد از ضایعه نخاعی، به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی با عصاره خارسنبل (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) تحت تیمار قرار گرفتند. وزن بدن، مورفولوژی بیضه (قطر لوله اسپرم‌ساز)، شاخص‌های اسپرم (شامل تحرک، زنده ماندن و ذخایر اسپرم اپیدیدیم) و بیان ژن *CATSPER 1, 2* در روزهای ۳۰ و ۶۰ اندازه‌گیری و با گروه کنترل و گروه ضایعه نخاعی مقایسه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ($P<0.05$) تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد میزان قطر لوله اسپرم‌ساز کاهش، ضخامت اپیتلیوم بیضه و تحرک اسپرم با مصرف ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره آبی خارسنبل به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. سطح بیان ژن *CATSPER 1, 2* در گروه‌هایی که تحت تیمار با عصاره خار سنبل بودند در مقایسه با گروه ضایعه نخاعی به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: عصاره دانه خارسنبل می‌تواند در درمان ناباروری در جنس نر موثر باشد. این مطالعه یک بینش عینی در مورد مصرف عصاره گیاه خارسنبل در درمان ناباروری پس از آسیب نخاعی ارائه می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: خارسنبل، باروری، بیان ژن، موش صحرایی نر

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عسکری ناهید، رنجبر مهدی، شفیعی‌پور علی (۱۴۰۰) تاثیر مصرف خوراکی عصاره خارسنبل (*Blepharis.persica*) بر بیان ژن *CATSPER* و شاخص‌های اسپرم در موش‌های صحرایی پس از ضایعه نخاعی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۲)، ۱-۲۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عوارض جانبی کمتر، دسترسی آسان‌تر (Cao et al. 2018) پذیرش راحت‌تر توسط افراد و مقرون‌به‌صرفه‌بودن، سابقه دیرینه‌ای دارد و در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی هم‌زمان با استفاده از داروهای شیمیایی و یا به‌تنهایی به منظور کاهش اثرات جانبی داروهای شیمیایی مدنظر قرار گرفته‌است. (Bellampalli et al. 2019).

به‌علاوه، استفاده از فیتوبیوتیک ها و گیاهان دارویی به عنوان محرک رشد طبیعی ضد میکروبی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها در تغذیه حیوانات قطعاً فواید زیادی برای بهبود پارامترهای عملکردی، سرکوب بیماری‌های خاص، فعالیت‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی، اثرات هیپوکلسترولمیک، تقویت آنزیم‌های گوارشی و بهبود عملکردهای کبدی دارد (Masoudzadeh et al. 2020). محققان نشان داده‌اند که افزودن این گیاهان به رژیم غذایی طیور و سایر حیوانات باعث افزایش مصرف خوراک، ضریب تبدیل غذا و عملکرد لاشه می‌شود (Masoudzadeh et al. 2020). در این پژوهش، با توجه به خواص ارزشمند گیاهان دارویی بومی ایران، گیاه خارسنبل با نام علمی *Blepharis persica* انتخاب شد که در طب سنتی برای بهبود اختلالات باروری استفاده می‌شود (Aghaabbasi et al. 2018).

جنس *Blepharis* دارای ۱۰۰ گونه گیاهی است که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند. گیاه خارسنبل از جنس *Blepharis* با نام علمی *Blepharis persica* شناخته می‌شود (Gutterman 1972) گونه مشابه این گیاه، *Blepharis. edulis* است که در بیابان‌های خاورمیانه و آفریقا رشد می‌کند (Pande and Pathak 2009) . گیاه خار سنبل دارای اسم‌های علمی مشابهی است که کمتر کاربرد دارند و به نام *Blepharis edulis*، *Ruellia ciliaris* و *Ruellia persica* نیز شناخته شده‌است. در مناطق گرم و خشک هندوستان، پاکستان، عربستان، مصر و ایران دیده می شود. در ایران در جنوب کرمان، فارس، بندرعباس، سیستان و بلوچستان می‌روید. از ترکیبات شیمیایی این گیاه می‌توان آلانتوان، کاتچول، تانن، ساپونین و گلوکز را نام برد. گیاهی چند ساله و کوتاه قد، دارای برگ‌های بیضی شکل و میوه کپسولی است. از ریشه آن به عنوان مدر استفاده می شود و برگ آن در بندآوردن خون‌ریزی موثر است. تحقیقات زیادی بر روی این گیاه انجام نشده است و اطلاعات کمی از خواص و فواید دارویی این گیاه وجود دارد (Khare 2007). در هند از دانه آن به عنوان مدر و افزایش‌دهنده قوای جنسی استفاده می شود. از پودر گیاه در هندوستان برای عفونت دستگاه تناسلی استفاده می شود. گلوکوزید بنزواکسین به عنوان متابولیت ثانویه و آنتی‌اکسیدان از بذر گیاه *blepharis edulis* جداسازی شده است (Harraz 1996).

از سوی دیگر، از مهمترین مشکلاتی که سبب ایجاد ناباروری می‌شود، ضایعه نخاعی است. از جمله دستگاه‌هایی که تحت تأثیر ضایعه نخاعی قرار می‌گیرد، دستگاه تولیدمثل است که می‌تواند مشکل ناباروری و یا کاهش باروری را در افراد جوان ایجاد نماید. ضایعه نخاعی آسیبی است، همراه با عواقب متعدد که مهمترین عوامل ایجاد آن آسیب به نخاع بر اثر تصادفات، اصابت تیر، تومور، اختلالات مادرزادی بیماری‌های دژنراتیو نخاع و اعمال جراحی نادرست می‌باشد. حدود ۶۲ درصداز افرادی که از ضایعه نخاعی رنج می‌برند، جوانانی با سن کمتر از ۳۰ سال هستند که جنس مذکر حدود۸۰ درصد از

گروه مبتلا را تشکیل می‌دهد (Kafetsoulis et al. 2006). اخیراً تحقیقات وسیعی در زمینه تأثیر کوتاه و یا درازمدت ضایعه نخاعی بر پتانسیل باروری اسپرم و دیگر سلول‌های دوره اسپرماتوژنز در حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است (Sinha et al. 2017). درایـن‌راستا، محققان میزان اسپرماتوژنز در کوتاه مدت (۲ هفته) و درازمدت (۲۰ هفته) بعد از ایجاد ضایعه نخاعی در موش صحرایی بالغ را بررسی کردند (Hirsch et al. 1999). نشان داده است که اختلالات اسپرماتوژنز حتی در دوره کوتاه‌مدت بعد از ضایعه نخاعی نیز وجود دارد و مشخص شده است که میزان تغییرات در اسپرماتوژنز در موش صحرایی بالغ بعد از ضایعه نخاعی هم در درازمدت (بیش از ۴هفته) و هم در کوتاه‌مدت (پس از دو هفته) اتفاق می‌افتد اگر چه میزان هورمون‌های جنسی در سرم موش صحرایی بعد از ضایعه نخاعی در طی یک ماه بهبود می‌یابد ولی دوره اسپرماتوژنز تحلیل رفته و میزان اسپرماتوژنز در موش صحرایی بعد از آسیب نخاعی کاهش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که ضایعه نخاعی موجب تحلیل قابل برگشت اسپرماتوژنز می‌شود (Huang et al. 1998).

از سوی‌دیگر، فاکتورهای غیرهورمونی در تأثیر ضایعه نخاعی بر دوره اسپرماتوژنز اثر دارند و میزان بیان ژنهای خانواده ژنی *CATSPER 1-4* که کانالهای کلسیمی را در اسپرم کد می‌کنند، تغییر می‌کند. این ژنها تنها در بیضه بیان می‌شوند و حضور آنها برای تحرک و قدرت باروری اسپرم ضروری می‌باشد (Quill et al. 2003).

در موش صحرایی، تحلیل اسپرماتوژنز در مراحل مزمن ضایعه نخاعی در حضور عملکرد طبیعی محور هورمونی هیپوفیز-بیضه نیز رخ می‌دهد (Von et al. 2018). بنابراین، حدس زده می شود که مکانیسمهای غیرهورمونی ممکن است در پسرفت اسپرماتوژنز دخالت داشته باشند (Khalili et al. 2003).

مطالعات دیگر نشان داده است که قطع رشته‌های عصبی مرتبط با بیضه در روند پسرفت اسپرماتوژنز نقش دارد و چهار هفته بعد از قطع عصب، وزن بیضه ها ۲۵ درصد کمتر از بیضه‌های موش صحرایی گروه شم خواهد بود (Chow et al. 2000). به‌علاوه، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور هم‌زمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Tohidi nezhad et al. 2015). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند (Mohammadabadi 2020). ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد (Ahsani et al. 2019a). بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد (Mohammadabadi et al. 2018). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است (Ahsani et al. 2019b). همچنین مقدار

محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi 2021). یکی از اقدامات اساسی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). لذا، هدف از مطالعه حاضر سنجش اثر عصاره آبی خارسنبل بر برخی شاخص‌های اسپرم و بیان ژن *CATSPER* در موش‌های صحرایی نر پس از آسیب نخاعی (SCI) بود.

مواد و روش ها

تهیه گیاه و عصاره گیاهی: گیاه خارسنبل از مناطق جنوبی و گرمسیر استان کرمان در فصل بهار از منطقه کهنوج با طول جغرافیایی ۵۷ درجه، عرض جغرافیایی ۲۷ درجه و ارتفاع از سطح دریا ۵۰۸ متر جمع‌آوری و توسط گیاه شناس تایید شد. گیاه در سایه و دمای محیط خشک شد و بذرهای گیاه جدا شدند و تا زمان عصاره‌گیری در دمایی اتاق نگهداری شدند.

روش فراصوت یا التراسونیک برای تهیه عصاره آبی: برای تهیه عصاره آبی روش فراصوت (التراسونیک) استفاده گردید. ابتدا ۴۰ گرم از بذر به کمک دستگاه آسیاب کاملاً پودر شد. پودر حاصل در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به مدت ۳۰ دقیقه و هر دو دقیقه یک توقف ۱۰ ثانیه‌ای با فرکانس ۲۰۰ کیلو هرتز، در دستگاه اولتراسونیک شرکت Hielschor ساخت آمریکا قرار گرفت. در مرحله بعدی، با کمک کاغذ صافی واتمن۱ عصاره صاف و در یخچال نگهداری شد. حدود دو ساعت بعد، برای جداسازی حلال ازدستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. در نهایت برای جداسازی کامل حلال از عصاره در داخل اون به مدت ۴۸ ساعت در دمایی ۴۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. عصاره آبی بصورت خشک و پودر شده در آمد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

گروه‌های حیوانی: در این تحقیق از ۳۰ راس موش صحرایی نر نژاد ویستار با حدود وزنی ۳۰±۲۵۰ گرم، با سن تقریبی ۳ ماه استفاده شد که از بخش حیوانات دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری شدند. تا زمان انجام آزمایش حیوانات در شرایط نوری استاندارد روزانه و درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

پس از بیهوش نمودن حیوان و تراشیدن موهای ناحیه پشت و ضدعفونی نمودن محل، یک برش در خط وسط ایجاد گردید، عضلات و تیغه مهره T9 برداشته شد، سپس مدل کوفتگی ضایعه نخاعی با انداختن وزنه ده گرمی از ارتفاع ۲۵ میلی‌متر بر روی قطعه T10 نخاع ایجاد گردید پس از ایجاد ضایعه عضلات و پوست بخیه شد، تخلیه مثانه روزانه دوبار انجام وحیوانات تا دو ماه مورد بررسی قرار گرفتند.

گروه‌های مورد بررسی عبارت بودند از: گروه کنترل بدون ایجاد ضایعه نخاعی (۱)، گروه ضایعه نخاعی (۲) و گروه‌های تیمار با عصاره گیاهی بعد از ایجاد ضایعه نخاعی (۳) که به مدت ۱۵ روز (دو هفته بعد از ایجاد ضایعه نخاعی) روزانه به مقدار ۱۰۰، ۲۰۰

و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی گیاه خار سنبل از طریق دهان، به صورت گاواژ، یک بار در روز دریافت کردند. در روزهای ۳۰ و ۶۰ نمونه‌گیری انجام شد.

این مطالعه با کد اخلاق IR.UK.VETMED.REC.1400.003 به تصویب کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان و با رعایت اصول اخلاقی مورد تایید کمیته نظارت بر حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

استخراج RNA: استخراج RNA از نمونه‌های بافت بیضه حیوانات، با استفاده از محلول RNX-plus™ (شرکت سیناکلون) انجام شد. پس از استخراج RNA به منظور تعیین کمیت و کیفیت آن، از طیف‌سنجی و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. میزان جذب RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد که برای نمونه خالص RNA این نسبت ۲-۱/۸ است. در مرحله بعد ۱µg از RNA کُل برای ساخت cDNA استفاده گردید واکنش ساخت cDNA مطابق دستورالعمل کیت شرکت یکتا تجهیزآزما انجام شد. به این صورت که، برای حذف DNA ژنومیک احتمالی، ۱ میکرولیتر DNaseI، ۱ میکرولیتر بافر DNaseI درون لوله عاری از RNase ریخته شد و با آب حاوی DEPC به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. لوله‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس برای غیر فعال شدن DNaseI، ۱ میکرولیتر EDTA اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

پس از آن، به هر کدام از لوله‌ها ۲ میکروگرم پرایمر هگزامر تصادفی اضافه و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه و پس از ۵ دقیقه سریعا به یخ منتقل شدند. سپس واکنش ساخت cDNA به صورت زیر انجام شد:

- ۴ میکرولیتر بافر همراه آنزیم M-MuLV RT
- ۲ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی‌مولار نوکلئوتیدها (dNTP)
- ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV RT (۲۰۰ واحد)
- آب استریل تا جایی که حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسید

سپس نمونه‌ها با برنامه دمایی زیر وارد دستگاه ترموسایکلر شدند:

- دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه
- دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه
- دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه

پس از این مرحله، cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در فرایند ساخت cDNA، یک لوله به عنوان کنترل منفی وجود داشت که حاوی تمام اجزای واکنش به جز RNA بود که برای تست آلودگی مواد به‌کار رفته انجام شد.

واکنش RT-qPCR در ۴۵ ســیکل و حجم ۱۵ میکرولیتر با حضــور ۱ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای نشــان داده شــده در جدول-۱ و ۷/۵ میکرولیتر محلول کیت SYBR-Green یکتا تجهیز آزما و ۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل در دستگاه ROTOR GENE 3000 (Corbett- Real time) اجرا شد.

از ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (جدول-۲).

جدول۱. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Primers used in this study

ژن Gene	آغازگر رفت Sense Primer	آغازگر برگشت Antisense Primer	منبع Reference	دمای ذوب (درجه سانتیگراد) Tm (°C)	طول قطعه تکثیر شده (جفت باز) Amplicon size (bp)
CATSPER1	5'-TCT TGG AGC GAT GAG GAC-3'	5'- GAC GAT TGT GTT CAG GCA-3'	Soleimani et al. 2018	68	204
CATSPER2	5'-TGG TTG TTG CTT GGT TCC-3'	5'-TTC CTT GAC TGG TTC CTC T-3'	Soleimani et al. 2018	67	193
GAPDH	5’. GAA CAT CAT CCC TGC ATC CA -3’	5’. CCA GTG AGC TTC CCG TTC A -3’	Harrison et al. 2001	61	68

جدول ۲. ترکیبات واکنش RT qPCR

Table 2. Compounds of the RT-qPCR reaction

نوع ماده Component	مقدار Volume/Reaction	غلظت نهایی Final Concentration
RealQ Plus 2x Master Mix	7.5 µL	1X
Forward primer (10 µM)	0.25 µL	0.1 µM
Reverse primer (10 µM)	0.25 µL	0.1 µM
Cdna	1 µL	50 ng Ml^{-1}
Deionized H2O	6 µL	

در بررسی بیان ژن برای هر نمونه سه تکرار گذاشته شد و نتایج حاصل از بیان ژن برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از روش $\Delta\Delta$ ct برای نمونه‌های شاهد و تیمار، نسبت ژن هدف به ژن مرجع *GAPDH* از طریق $۲^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه گردید (Livak and Schmittgen. 2001).

بررسی مورفولوژی بیضه: بیضه حیوانات وزن شد، نمونه‌های بیضه در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. جهت مطالعه مورفولوژی، مقاطعی با ضخامت پنج میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم تهیه، با استفاده از هماتوکسیلین- ائوزین، رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری و نرم افزار آنالیز تصاویر میکروسکپی موتیک بررسی شدند. در هر مقطع، تعداد بیست لوله به صورت تصادفی انتخاب، قطر بزرگ و کوچک به صورت عمود بر هم اندازه‌گیری و میانگین قطر لوله محاسبه شد. ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال نیز به صورت غیرمستقیم و با کسر قطر مجرای داخلی لوله از قطر لوله اسپرم‌ساز محاسبه گردید

آزمایشات اسپرم: در روزهای ۳۰و۶۰ موش‌های صحرایی از طریق قطع نخاع گردنی کشته شدند و پس از خارج کردن دم اپیدیدیم راست، این ناحیه به وسیله قیچی تحت شرایط استریل قطعه قطعه و داخل محیط کشت T6 حاوی‌آلبومین سرم گاو (BSA) به مدت یک ساعت در انکوباتور (۳۷ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. آنالیز اسپرم بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی انجام شد. درصد تحرک اسپرم، تعیین درصد اسپرم‌های زنده، میزان ذخیره اسپرم اپیدیدیم بررسی شد (Chapin et al. 1992). به این صورت که: برای تعیین درصد تحرک اسپرم ۱۰۰ اسپرم شمارش و نوع حرکت (حرکت پیش رونده سریع، حرکت پیش رونده آهسته، حرکت غیرپیش‌رونده و غیر متحرک) آنها ثبت شد. به منظور تعیین قدرت زنده‌مانی اسپرم، ۱۰ میکرولیتر نمونه اسپرم با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو مخلوط شد و مقدار سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط مذکور برای روی لام قرار گرفت و بعد از ۲۰ ثانیه اسپرم‌ها بررسی شدند. اسپرم‌های زنده به‌صورت بی رنگ و اسپرم مرده به رنگ آبی دیده شدند و در نهایت درصد اسپرم‌های زنده محاسبه شد.

آنالیز داده‌ها: برای انجام آنالیز آماری اطلاعات گروه‌های آزمایشی از نرم افزار (نسخه ۲۶) SPSS استفاده گردید. نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه میانگین گروه‌های آزمایشی از آزمون توکی استفاده شد و سطح معنی‌دار بودن اختلافات ۵ درصد در نظر گرفته‌شد.

نتایج و بحث

آزمایشات اسپرم: نتایج حاصل از بررسی میزان تحرک اسپرماتوزئیدها نشان داد که در روز ۳۰ و۶۰ میزان تحرک اسپرم در گروه‌های چهارم و پنجم (۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره) بالاتر از گروه‌های دیگر بود و این میزان از نظر آماری ($P<0.05$) معنی‌دار بود. در این بررسی، تحرک پیش رونده مدنظر بود و اسپرم‌هایی که در یک جای ثابت تحرک کمی داشتند محاسبه نگردید. میزان زنده ماندن اسپرم در گروه پنجم در مقایسه با گروه‌های دیگر درروزهای ۳۰ و ۶۰ تغییر کرده بود. در روز ۶۰ هرچند مقدار زنده ماندن اسپرم در گروه پنجم بیشتر بود ولی این مقدار از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>0.05$). علاوه بر این،

مشخص‌شد که میزان ذخیره اسپرم اپیدیدیم (ESR) و وزن بدن حیوانات در گروه‌های آزمایشی تحت تیمار درمقایسه با گروه کنترل و ضایعه نخاعی تغییر معنی‌داری نداشت (جدول۳).

اثرات تیمارهای مختلف بر مورفولوژی بیضه: وزن بیضه در گروه های مختلف تفاوت معنی داری نداشت ($P>0.05$) ولی قطر لومن و لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه دوم دارای افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل و گروه پنجم بود.

از سوی دیگر، کاهش معنی‌داری در ضخامت اپیتلیوم ژرمینال برای گروه دوم و سوم در مقایسه با سطوح ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و کنترل مشاهده شد ($P<0.05$) (جدول ۴). مورفولوژی بیضه در حیوانات در روزهای ۳۰ و ۶۰ در شکل ۱ نشان داده شده است. علاوه‌براین، سرعت تشکیل اسپرماتوگونیا در روز ۶۰ در گروه پنجم مقدار کمی بهبود یافت که این مقدار از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>0.05$).

نتایج RT-qPCR: خلوص و کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک در صد (شکل ۲، الف) و اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت و نسبت جذب نوری A260 / A280 برای RNA در شرایط بهینه تقریباً برابر با ۲ بود. تصویر باندهای تکثیر شده و نیز منحنی ذوب در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج RT-qPCR نشان داد که حیوانات تحت تیمار با عصاره در گروه پنجم تغییر بیان *CATSPER1* در روز ۳۰ در مقایسه با گروه ضایعه نخاعی (گروه ۲) از نظر آماری معنی‌دار بود. در روز ۶۰ مقدار تغییر بیان ژن *CATSPER1* در گروه های چهارم و پنجم در مقایسه با گروه ضایعه نخاعی (گروه ۲) از نظر آماری معنی‌دار بود. در روزهای ۳۰ و ۶۰ ژن *CATSPER2* در مقایسه با گروه دوم در گروه های چهارم و پنجم افزایش بیان نشان داد که از نظر آماری این مقدار معنی‌دار بود ($P<0.05$) (شکل ۳).

این نکته حائز اهمیت است که، در بهبود وضعیت بارداری افراد باضایعه نخاعی، باید در ابتدا سعی شود روش‌های ساده را قبل از مراجعه به روش‌های جراحی پیشرفته‌تر و تهاجمی‌تر انجام و مدنظر قرار داد. تعداد زیادی از داروهای گیاهی در طبیعت وجود دارند که می‌تواند قدرت باروری مردان را بهبود بخشند. در این میان، گیاه خارسنبل درطب سنتی برای بهبود باروری مردان در ایران استفاده می‌شود. نتایج اولیه این مطالعه نیز در *in vivo* نشان داد که این گیاه به افزایش تعداد و فعالیت اسپرم کمک کرده و باعث افزایش بیان ژن‌های *CATSPER1* و *CATSPER2* می‌شود. این اثر ممکن است به دلیل وجود اسیدلینولئیک و همچنین آنتی‌اکسیدان‌های آن باشد. عصاره بذر گیاه خارسنبل شامل درصد زیادی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی همچون ایمیدازول است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. (Aghaabbasi et al. 2020). مطالعه بر روی اسیدهای چرب ضروری و اثر آن بر رشد و بلوغ جنسی خرگوش‌های آزمایشگاهی نشان داده است که اسید لینولئیک محرک رشد و بلوغ جنسی است (Hirsch et al. 1999). علاوه بر این، اسید لینولئیک بعنوان اسیدچرب ضروری (که به میزان قابل توجهی در عصاره خارسنبل نیز وجود دارد) نقش مهمی در سنتز پروستاگلندین‌ها دارد و بسیاری از اعمال بیولوژیکی تولید مثلی حیوانات تغذیه شده باترکیبات حاوی اسید لینولئیک تحت تأثیر پروستاگلندین قرار دارد (Ahluwalia et al. 1967).

جدول ٣. تأثیر تیمارهای مختلف بر وزن بدن و شاخص‌های اسپرم

Table 3. Effect of different treatments on body weight, and sperm parameters (*: P <0.05)

صفت Trait		وزن بدن (گرم) Body Weight (gr)	تحرک اسپرم (درصد) Motility (%)	زنده‌مانی اسپرم (درصد) Viability (%)	ذخیره اسپرم اپیدیدیم ×١٠٦ epididymal sperm reserves×10^6
کنترل Control	روز ٣٠ Day 30	247.02± 1.95	37.84±2.58	47.56±2.36	172.03±2.91
	روز ٦٠ Day 60	248.09±1.97	38.02±0.46	48.32±1.25	170.98±3.68
گروه ٢ Group 2	روز ٣٠ Day 30	249.23±1.54	37.57±1.01	46.25±0.94	167.83±2.71
	روز ٦٠ Day 60	244.28±2.04	38.12±0.97	47.51±1.05	169.15±2.91
گروه ٣ Group 3	روز ٣٠ Day 30	248.01±1.07	37.18±1.80	47.14±1.89	167.34±1.80
	روز ٦٠ Day 60	248.12±1.36	38.06±1.34	48.86±0.98	169.85±1.98
گروه ٤ Group 4	روز ٣٠ Day 30	247.08±1.08	38.87±1.28	49.28±1.89	170.04±1.05
	روز ٦٠ Day 60	249.91±1.47	40.38±1.08*	49.96±1.85	171.01±1.78
گروه ٥ Group 5	روز ٣٠ Day 30	248.21±1.27	41.08±1.58*	49.04±0.89	171.34±1.85
	روز ٦٠ Day 60	249.91±1.06	42.91±1.43*	49.86±1.48	171.81±2.38

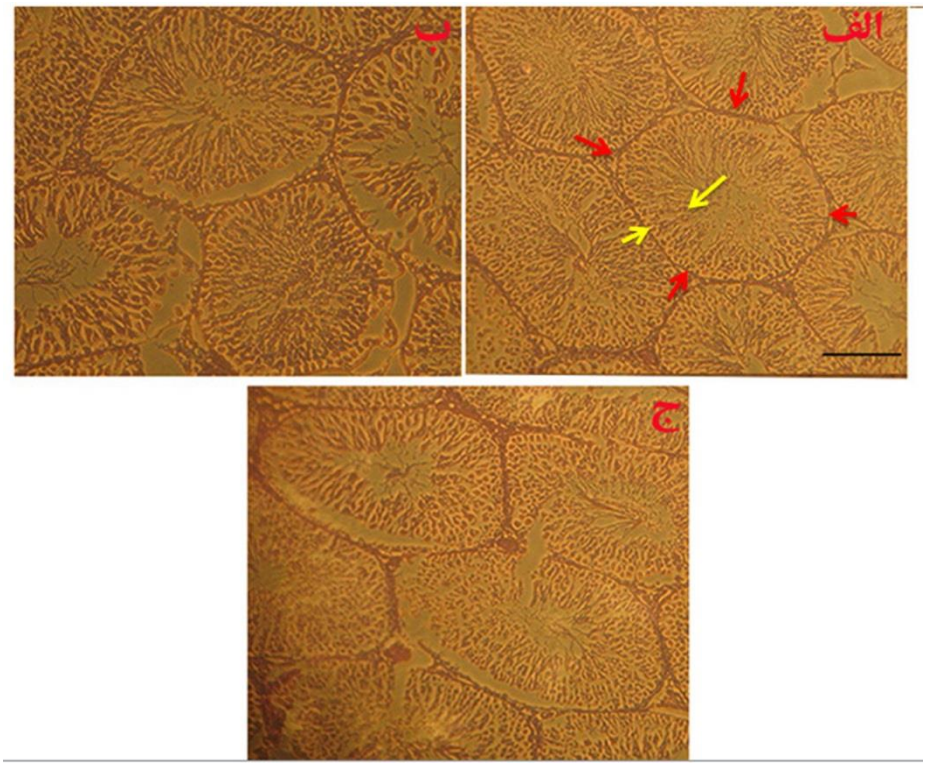
در روز ٣٠ و٦٠ میزان تحرک اسپرم در گروههای چهارم و پنجم از نظر آماری معنی‌دار بود (P<0.05). تغییر در میزان زنده ماندن اسپرم میزان ذخیره اسپرم اپیدیدیم (ESR) و وزن بدن رتها از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>0.05).

جدول ٤. تأثیر تیمارهای مختلف بر وزن بیضه ضخامت اپیتلیوم بیضه و قطر لوله اسپرم‌ساز

Table 4. Effect of different treatments on testis weight testes epithelium thickness and seminiferous tubules Diameter (*: P <0.05)

صفت Trait		قطر لوله اسپرم‌ساز (میکرومتر) seminiferous tubules Diameter (μm)	ضخامت اپیتلیوم بیضه (میکرومتر) testes epithelium thickness (μm)	وزن بیضه (گرم) Testis Weight (gr)
کنترل Control	روز ۳۰ Day 30	187.92±.083	51.23±1.26	1.43±2.01
	روز ٦۰ Day 60	190.36±1.63	49.21±2.01	1.47±1.02
گروه ۲ Group 2	روز ۳۰ Day 30	209.91±2.53	45.35±1.56	1.49±0.89
	روز ٦۰ Day 60	211.36±0.86	43.09±3.24	1.45±1.09
گروه ۳ Group 3	روز ۳۰ Day 30	201.54±1.27	44.09±3.21	1.44±0.95
	روز ٦۰ Day 60	203.59±1.35	44.96±.092	1.49±1.36
گروه ٤ Group 4	روز ۳۰ Day 30	201.31±2.09	45.68±1.38	1.48±3.10
	روز ٦۰ Day 60	197.86±1.56	46.09±2.56	1.43±0.91
گروه ٥ Group 5	روز ۳۰ Day 30	196.96±0.94	47.09±2.61	1.46±2.61
	روز ٦۰ Day 60	194.61±1.06*	48.75±3.01*	1.42±1.91

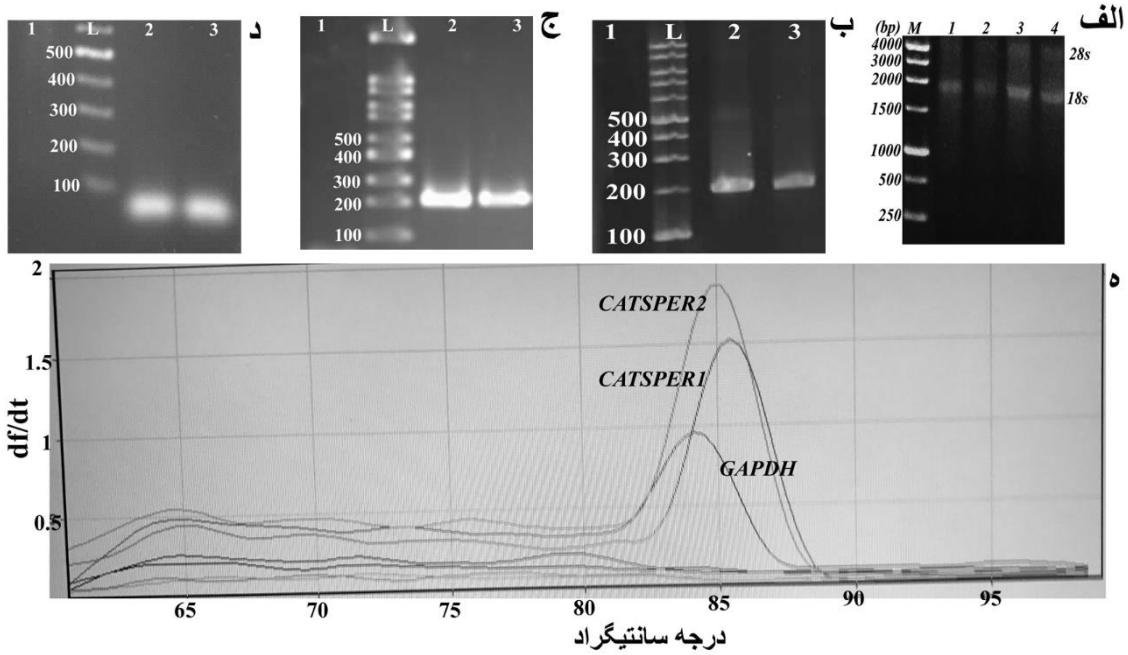
در روز ۶۰ میزان ضخامت اپیتلیوم بیضه و قطر لوله اسپرم‌ساز از نظر آماری معنی‌دار بود (P<0.05). تغییر در میزان وزن بیضه از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>0.05).



شکل ١. مورفولوژی بیضه موشهای صحرایی بزرگسال نژاد ویستار تحت تیمار با تیمار خارسنبل. قطر لوله اسپرم ساز (فاصله بین پیکانهای قرمز)، ضخامت اپیتلیوم ژرمینال (فاصله بین دو پیکان زرد). الف، ب، ج مورفولوژی بیضه موش صحرایی در روز ٦٠ بعد از تیمار به ترتیب در گروههای اول، دوم، پنجم. بزرگنمایی ×٤٠٠ . نوار مقیاس ٥٠ میکرومتر

Figure 1. Testicular morphology of adult Wistar rats treated with *Blepharis persica*. A, B, C Testicular morphology of rat (Seminiferous tubule diameter (the distance between the white arrows), the thickness of germinal epithelium (the distance between the two yellow arrows).) on day 60 after treatment in the first, second and fifth groups, respectively. (Magnification = 400×, Scale bar = 50 µm)

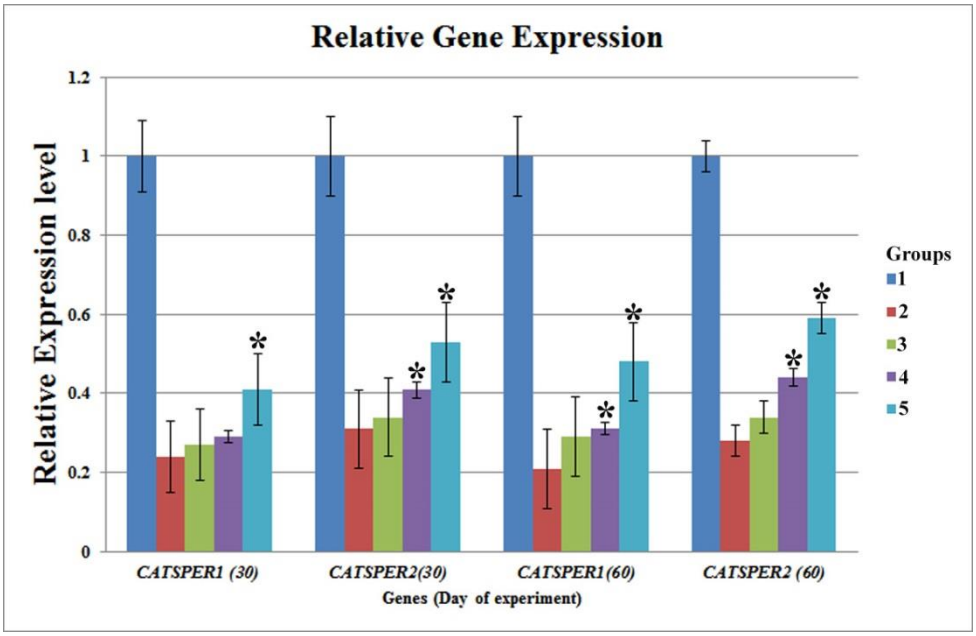
در پژوهشی Feng et al. (2015) نشان دادند که اسیدهای چرب غیراشباع با افزایش ترشح و بهبود عملکرد هورمون‌های جنسی، باعث افزایش عملکرد تولید مثلی جوندگان می‌شود. اسیدهای چرب غیراشباع از طریق اثر برسطح سلول و رسپتورهای داخل سلولی عمل می‌کنندکه سیگنالهای سلولی و الگوهای بیان ژن را کنترل می‌کنند. بعضی از اثرات اسیدهای چرب غیراشباع با تغییرات ترکیبات اسید چرب غشاهای سلولی و تاثیر بر GnRHR، FSHR و LHR که نقش مهمی در تنظیم تولید مثل جنس نر دارند، مرتبط می‌باشد (Millar et al. 2004).



شکل ۲. الف: الکتروفورز ژل آگارز RNA کامل استخراج شده از بافت بیضه. ستون ۱ مارکر اندازه bp ۱۰۰، ستون‌های ۲ تا ٤ به‌ترتیب نمونه RNA استخراج شده از گروه‌های کنترل، ضایعه نخاعی، ب، ج و د: به ترتیب الکتروفورز ژل آگارز بیان ژن‌های *CATSPER1*، *CATSPER2* و *GAPDH* با اندازه های ۲۰٤، ۱۹۳ و ٦٨ جفت باز (ستون ۱ مربوط به نمونه کنترل منفی بدون cDNA)، ه: منحنی ذوب اختصاصی پرایمرهای مربوط به ژن‌های *CATSPER1*، *CATSPER2* و *GAPDH*

Figure 2. Representative plots of RT-qPCRs using specific primers for Rat. A: Agarose gel electrophoresis of total RNAs from the testes. B, C and D: Real-time PCRs using *CATSPER1*, *CATSPER2*, and *GAPDH* primer pairs cDNAs templates using extracted RNAs (D) resulted in products with single melting peaks (E) and in discrete bands in the agarose gel at 204, 193, and 68 bp, respectively. No template (cDNA) controls were used to monitor genomic *DNA* contamination

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اگرچه استفاده از عصاره خارسنبل تاثیری بر روی وزن و میزان ذخیره اسپرم اپیدیدیم ندارد ولی سبب بهبود برخی خصوصیات اسپرم شد، به‌طوریکه میزان بهبود در میزان زنده ماندن اسپرم و مقدار تحرک آنها کاملا مشخص بود. علاوه بر این، استفاده از آن باعث افزایش بیان ژن‌های *CATSPER1* و *CATSPER2* می‌شود که به‌علت تغییر در سطح mRNA بوده و از انجاکه این ژن‌ها نقش مهمی در اسپرماتوژنز پستانداران دارند، استفاده از این ترکیب می‌تواند به‌عنوان راهکاری دربهبود خصوصیات تولیدمثلی درنظرگرفته شود.



شکل ٣. تجزیه و تحلیل بیان رونوشت‌های *CATSPER1,2*، توسط RT-qPCR. در حیوانات تحت تیمار با عصاره گیاه خارسنبل و گروه ضایعه نخاعی در مقایسه با گروه کنترل (١، ٢، ٣، ٤ و ٥ به ترتیب گروه‌های: کنترل، ضایعه نخاعی و استفاده از عصاره گیاهی در غلظت‌های ١٠٠، ٢٠٠ و ٣٠٠ میلی‌گرم‌برکیلوگرم وزن بدن).

Figure 2. Expression analysis of *CATSPER1, 2* transcripts by RT-qPCR. Quantification was performed in *B.P* treated animals and SCI group in comparison to the control group after normalization to *GAPDH* 1, 2, 3, 4 and 5: control, SCI and plant extract treated (100, 200 and 300 mg / kg body weight).

زیرا ژن *CATSPER1* نقش مهمی در کنترل تحرک اسپرم دارد، بررسی موش ناک اوت برای ژن *CATSPER1* نشان داد که ح ضور این ژن برای باروری موش نر، تحرک ا سپرم و نفوذ به داخل تخمک ضروری ا ست وموش‌های صحرایی فوق کاملا عقیم بودند (Ren et al. 2001). ژن *CATSPER2* نیز در اسپرماتوژنز نقش اساسی دارد و در تحرک اسپرم و لقاح موفق نقش اساسی دارد و حذف این ژن نیز سبب عقیمی کامل حیوان می‌شود (Smith et al. 2013). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد که استفاده از ٣٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی گیاه خارسنبل باعث افزایش بیان ژن‌های *CATSPER1* و *CATSPER2* و ا افزایش میزان تحرک اسپرم می‌شود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه از داروی گیاهی خارسنبل در درمان ناباروری بعد از ضایعه نخاعی استفاده شده است؛ هرچند که مشخص نشد که چه ترکیبی از اجزای این گیاه در این روش درمانی موثرتر است. با این وجود، درمان ترکیبی در عمل بالینی

استفاده می‌شود (Sanchez et al. 2012) و می‌توان همراه با استفاده از داروهای شیمیایی از داروهای گیاهی با اثرات جانبی کمتر نیز استفاده کرد. علاوه براین، نتایج تجزیه و تحلیل اسپرم می‌تواند در استفاده از تکنیک‌های مختلف برروی ارزیابی تأثیر بگذارد. اگر چه روش ارزیابی ا سپرم در این آزمایش کاملا کنترل شده بود ولی حتی نمونه‌هایی که تحت شرایط م شابه ا ستخراج می شوند، در آزمایشات مختلف، نتایج متفاوتی می‌دهند. به همین دلیل، سازمان بهدا شت جهانی تو صیه می‌کند که دو مرتبه نمونه گیری انجام شود (Zheng 1997) با وجود این محدودیت‌ها، این مطالعه ارزشمند است و به عنوان اولین مورد گزارش بهبود خصوصیات اسپرم تحت درمان باگیاه خارسنبل می‌باشد. نتایج این مطالعه توان بالینی درمان با داروهای گیاهی در مردان با ضایعه نخاعی را تایید می‌کند، به ویژه برای بهبود میزان زنده ماندن و تحرک اسپرم. برای بررسی اثرات بالینی درمان باگیاه خارسنبل، آزمایشات کنترل شده تصادفی با طرح‌های دقیق انجام شد و بطورکلی، یافته‌های این مطالعه نشان می دهد که مصرف ۱۵ روزه عصاره آبی گیاه خارسنبل به مقدار ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بعد از ایجاد ضایعه نخاعی تاثیر مثبت بر برخی پارامترهای ا سپرم و میزان بیان ژنهای *CATSPER1,2*، در مدل حیوانی ضایعه نخاعی دارد و می‌تواند در درمان ناباروری موثر با شد. علاوه براین، استفاده از این روش درمانی در درمان ترکیبی با استفاده همزمان از داروهای شیمیایی و گیاهی می‌تواند با عوارض جانبی کمتری موثر باشد، ولیکن به منظور تایید نهایی انجام آزمایش در مدت طولانی‌تر و انجام تست‌های تکمیلی ضروری است.

سپا سگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته به خاطر حمایت مالی و تخصیص اعتبار با شماره قراردارد ۹۷/۲۷۰۵/ص/۷ در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

احسنی محمدرضا ، محمدآبادی محمدرضا ، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)، ۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

References

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Aghaabbasi K, Hassani Kumleh H, Askari N et al. (2018) A. Anticancer activity of blepharis persica seed hydroalcoholic extract on (MCF-7) human breast cancer and (LNCaP) prostate cancer cell lines and its synergistic effect with doxorubicin. J Cell Tissue 9, 206-21 (In Persian).

Aghaabbasi K, Askari N, Kumleh, H. H. et al. (2020). The Blepharis persica seed hydroalcoholic extract synergistically enhances the apoptotic effect of doxorubicin in human colon cancer and gastric cancer cells. Mol Biol Rep 2, 843-853.

Ahluwalia B, Pincus G, Holman RT (1967). Essential fatty acid deficiency and its effects upon reproductive organs of male rabbits. J Nutr 2, 205-214.

Bellampalli SS, Ji Y, Moutal A et al. (2019). Betulinic acid, derived from the desert lavender Hyptis emoryi, attenuates paclitaxel-, HIV-, and nerve injury-associated peripheral sensory neuropathy via block of N-and T-type calcium channels. Pain 1, 117.

Cao HH, Zhang ZF, Wang XF et al. (2018). Nutrition versus defense: Why Myzus persicae (green peach aphid) prefers and performs better on young leaves of cabbage. PloS One 4, 196219.

Chapin, R. E., Filler, R. S., Gulati, D et al. (1992). Methods for assessing rat sperm motility. Reprod. Toxicol 3, 267-273.

Chow, S. H., Giglio, W., Anesetti, R et al. (2000). The effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat. Neuroendocrinology, 1, 37-45.

Feng, Y., Ding, Y., Liu, J et al. (2015). Effects of dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in the young breeder rooster. BMC vet res, 1, 73.

Gutterman, Y (1972). Delayed seed dispersal and rapid germination as survival mechanisms of the desert plant Blepharis persica (Burm.) Kuntze . Oecologia 10, 145-149.

Harraz FM, Pedersen AT, Andersen OM et al. (1996) Acylated flavonoids from Blepharis ciliaris. Phytochem 43, 521-525.

Hirsch IH, Huang B, Chancellor MB et al. (1999). Spermatogenesis in early and chronic phases of experimental spinal cord injury in the rodent model. J Androl 1, 63-71.

Huang HFS, Linsenmeyer TA, Anesetti R et al. (1998). Suppression and recovery of spermatogenesis following spinal cord injury in the rat. J Androl 1, 72-80.

Kafetsoulis A, Brackett NL, Ibrahim E et al. (2006). Current trends in the treatment of infertility in men with spinal cord injury. Fertil Steril 4, 781-789.

Khalili MA, Rabchevsky GA (2003). Restoration of Spermatogenesis by Adenoviral Gene Transfer into Injured Spinal Cords of Rats. Int J Rep BioMed 1, 7-10.

Khare CP (2007) Indian Medicinal Plants, Library of Congress Control Number Springer-VerlagBerlin/Heidelberg J Puri New 1, 93-94.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. Method 4, 402-408.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. Small Rumin Res 193, 106276.

Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ et al. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocrinol Rev 2, 235-275.

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 4, 167-181 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 1, 177-192 (In Persian).

Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 4, 167-181 (In Persian).

Pande M, Pathak A (2009) Investigation of aphrodisiac potential of Blepharis edulis Linn. (Utangan) claimed by Tribals of Malwa region of Madhya Pradesh. Inter J Chem Tech Res 3, 769-776.

Quill TA, Sugden SA, Rossi KL et al. (2003) Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. Proc Natl Acad Sci 25, 14869-14874.

Ren D, Navarro B, Perez G et al. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 413, 603.

Sinha V, Elliott S, Ibrahim E et al. (2017). Reproductive health of men with spinal cord injury. Top Spinal Cord Inj 1, 31-41.

Smith JF, Syritsyna O, Fellous M et al. (2013) Disruption of the principal, progesterone-activated sperm Ca2+ channel in a CatSper2-deficient infertile patient. Proc Natl Acad Sci 17, 6823-6828.

Soleimani MZ, Mashayekhi FJ, Hasanzade MM et al. (2018) Alteration in CatSper1 and 2 genes expression, sperm parameters and testis histology in varicocelized rats. Int J Reprod Biomed 3, 183.

Sanchez-Pozo MC, Mendiola J, Serrano M et al. (2012). Proposal of guidelines for the appraisal of SEMen QUAlity studies (SEMQUA). Hum Reprod 1, 10-21.

Sun B, Wells J, Goldmuntz E et al. (1996) A simplified, competitive RT-PCR method for measuring rat IFN-α mRNA expression. J Immunol Method 2, 139-148.

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK et al. (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50 (In Persian).

Von Kopylow K, Schulze W, Salzbrunn A et al. (2018) Dynamics, ultrastructure and gene expression of human in vitro organized testis cells from testicular sperm extraction biopsies. Mol Hum Reprod 3, 123-134.

Zheng Z (1997) Analysis on the therapeutic effect of combined use of acupuncture and mediation in 297 cases of male sterility. J Tradition Chin Med Chung 3, 190-193.