

Notat

Til: Kosttilskudsgruppen, Fødevarestyrelsen

Vedr. Risikovurdering af roden fra *Withania somnifera*

Fra: DTU Fødevareinstituttet

15. maj 2020
DTU DOCX. nr. 19/1030299

Baggrund

Kosttilskudsgruppen ønsker en risikovurdering af roden fra *Withania somnifera* (L.) Dunal.

Konklusion

Indholdsstoffer

Roden fra *Withania somnifera* (L.) Dunal indeholder to hovedstofgrupper, som anses for at have betydning for dens mulige effekter: steroidlaktoner (kaldet withanolider) og alkaloider. Der er kvantitative oplysninger om det totale indhold af withanolider, enkelte withanolider og det totale indhold af alkaloider, men ingen kvantitative data for de enkelte alkaloider. På det foreliggende datagrundlag er det ikke muligt at udpege det/de stoffer i *W. somnifera* som kan være årsag til de rapporterede effekter i mennesker og dyr.

DTU Fødevareinstituttet har medtaget eksperimentelle undersøgelser der er udført med andre plantedele end roden, da der er sammenfald af indholdsstoffer. Withanolider og alkaloider findes også i andre plantedele og eksperimentelle undersøgelser med andre plantedele end roden kan derfor hjælpe med at kaste lys over mulige effekter af roden.

Generelle toksikologiske undersøgelser

Der er publiceret forsøg med to kommercielt fremstillede ekstrakter af roden, i 28-dages forsøg i rotter. I det ene forsøg med en ethanolekstrakt, som kun i begrænset omfang viste forsøgsdata, er der fundet statistisk signifikante stigninger i parametre knyttet til de røde blodlegemer og koagulationstid, mens der i undersøgelsen af en methanolekstrakt ikke blev fundet nogle effekter.

Effekter på kønshormoner og reproduktion

Der er oplysninger om, at kvinder har anvendt roden som abortfremkaldende middel. Der er ikke udført eksperimentelle undersøgelser til at fastsætte et niveau, hvorunder en eventuel abortfremkaldende effekt ikke forekommer. På grund af manglende data om sikkerheden fraråder Verdenssundhedsorganisationen (WHO) anvendelse af roden under graviditet og amning.

Kliniske forsøg i mænd kunne tyde på, at roden eller præparater heraf, kan have en effekt på hormonniveauet af testosteron, LH (luteiniserende hormon) og DHEA-S (dehydroepiandrosteron-sulfat). Hovedparten af disse undersøgelser er dog ikke udført i raske mænd, men i mænd, der i forvejen lider af dårlig sæd kvalitet og har forandrede niveauer af kønshormoner.

Der er foretaget en række eksperimentelle undersøgelser i forsøgsdyr, som har fundet, at roden og præparater heraf har effekter på reproduktionen i hanrotter (kønshormoner, parringsadfærd og kønsorganer). To undersøgelser med vandige ekstrakter af bladet fandt påvirkning af hormonsystemet i ikke-kønsmodne rotter, hvor både hanner og hunner blev tidligere kønsmodne end normalt. Studier har også vist, nedsat sædkvalitet samt nedsat fertilitet efter dosering med andre plantedele end roden. DTU Fødevareinstituttet vurderer samlet set, at dyrestudierne indikerer en påvirkning af kønshormoner efter dosering med *W. somnifera*, som potentielt kan udgøre en risiko for brugernes helbred.

Effekter på stofskiftet, immunsystemet og centralnervesystemet

Undersøgelser i forsøgsdyr har vist, at roden eller ekstrakter heraf kan påvirke skjoldbruskkirtlens hormoner. Der er enkelte undersøgelser, der tyder på, at planten (ikke alle undersøgelser specificerer den anvendte plantedel) kan øge niveauet af disse hormoner i mennesker, der dermed kan have en risiko for at udvikle forhøjet stofskifte. Eksperimentelle undersøgelser i reagensglasforsøg og i et rotteforsøg har vist, at ekstrakter af roden kan hæmme acetylcholinesterase. Eksperimentelle undersøgelser med forskellige ekstrakter i mus og rotter har vist effekter på immunsystemet.

DTU Fødevareinstituttet vurderer, at ovennævnte studier peger på forskellige typer af skadelige effekter som følge af indtag af ekstrakter af roden fra *W. somnifera* samt ekstrakter af andre dele af planten. Det skal bemærkes, at en del af disse effekter ikke kun er observeret i dyreforsøg. Der er også observationer fra kliniske undersøgelser eller bivirkningsindberetninger, der kunne tyde på, at disse effekter kan ses i mennesker f.eks. effekter på skjoldbruskkirtlen og kønshormoner.

DTU Fødevareinstituttet finder, at der på det foreliggende datagrundlag ikke kan fastsættes en grænse for indtag af roden eller ekstrakter af roden, hvorunder indtaget vil være uden risiko for skadelige effekter.

Anvendte forkortelser

BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung, Det Tyske Risikovurderingsinstitut

BMI: Body Mass Index

DHEA-S: Dehydroepiandrosteron-sulfat

FSH: Follikelstimulerende hormon

LH: Luteiniserende hormon

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level

SD: Standardafvigelse

T₃: Trijodthyronin

T₄: Thyroxin eller tetrajodthyronin

TSH (Thyroideastimulerende hormon) eller thyrotropin

WHO: World Health Organization, Verdenssundhedsorganisationen

Litteratursøgning

W. somnifera er en plante, hvor DTU Fødevareinstituttet løbende har foretaget nye litteratursøgninger. Den seneste blev foretaget 26. august 2019 i Web of Science med søgeprofilen: (withania somnifera) or ashwagandha. Ud over artikler, som er fundet ved litteratursøgning, er der rekvireret andre relevante artikler, som f.eks. har været nævnt i artikler fundet ved litteratursøgning.

Indholdsstoffer

Taksonomi, naturlig forekomst og kemotyper

Planten er naturligt forekommende i Indien, Mellemøsten, dele af Afrika og Sydeuropa (USDA, Agricultural Research Service 2019). Den har ikke noget anbefalet dansk navn (Jensen *et al.* 2003), men omtales nogle gange under det indiske navn ashwagandha. Planten tilhører Natskyggefamilien (Solanaceae) (USDA, Agricultural Research Service 2019). Der er beskrevet forekomst af forskellige morfologiske former og kemotyper baseret på f.eks. forskelle i indholdsstoffer i bladene. Dette er undersøgt af israelske forskere på lokale planter, mens der kun er meget begrænsede oplysninger om indiske planter (Kalra & Kaushik 2017). Da der er yderst få oplysninger om indholdsstoffer i kemotyper og der ikke er oplysninger om hvilke kemotyper, der er anvendt i de i notatet beskrevne artikler om effekter af *W. somnifera* i forsøgsdyr og mennesker, vil DTU Fødevareinstituttet ikke nærmere komme ind på indholdsstoffer i kemotyper.

Indholdsstoffer i roden og andre plantedele.

Roden indeholder ifølge WHO (2009) to hovedgrupper af bioaktive stoffer: steroidlakter kaldet withanolider og alkaloider. Disse to stofgrupper vurderes at have speciel betydning for de mulige effekter. DTU Fødevareinstituttet har valgt også at beskrive indholdsstoffer i andre plantedele som blad, frugt/bær og stængel. Dels findes withanolider og alkaloider også i flere af disse plantedele og eksperimentelle undersøgelser med andre plantedele kan derfor hjælpe med at kaste lys over mulige effekter af roden. Der findes andre indholdsstoffer som f.eks. polyfenoler og flavonoider i planten (Alam *et al.* 2011). Det kvantitative indhold af disse stoffer vil blive kort beskrevet.

Roden

Alkaloider

Der er publiceret flere nyere undersøgelser af det totale indhold af alkaloider. I en af dem blev der indsamlet *W. somnifera* fra forskellige områder i Indien for at identificere genotyper med højt udbytte af aktive indholdsstoffer. Data for roden fra 15 særligt lovende genotyper viste, at det totale indhold af alkaloider varierede fra 0,24-0,9% (tørvægt) (Srivastava *et al.* 2018). I en anden undersøgelse af 25 genotyper dyrket i Indien i to vækstsæsoner (2015-2017), varierede det total indhold af alkaloider i roden fra 0,16-0,96% (Chauhan *et al.* 2019).

Alkaloiderne tilhører forskellige stofgrupper. Anaferin, anahygrin, hygrin, cuscohygrin, isopelletierin klassificeres som piperidin- og pyrrolidinalkaloider, mens tropin og pseudotropin er tropanalkaloider. Der findes ikke kvantitative data om indholdet af de enkelte alkaloider (WHO 2009, Klenow *et al.* 2012). Analyserne er publiceret i artikler fra 1960'erne (Klenow *et al.* 2012). DTU Fødevareinstituttet har ikke fundet nyere analyser af indholdet af de enkelte alkaloider i roden.

Withanolider

I rødderne af forskellige indiske dyrkede og vilde eksemplarer af *W. somnifera* fandtes et totalindhold af withanolider på 0,23-1,11% (Sreerekha *et al.* 2004). Indholdet af tre withanolider i syv indiske prøver af

roden blev målt til: 0,11-0,16% withanolid A, 0,002-0,04% withaferin A og 0,01-0,09% 12-deoxywithastramonolid angivet som tørvægt (Srivastava *et al.* 2008). I 15 prøver fra Indien fandtes i rødderne et indhold per 100 g (tørvægt) på op til 0,117 g withanolid A, op til 0,035 g withanon, op til 0,044 g withaferin A, op til 0,009 g withastramonolid, op til 0,004 g 27-hydroxywithanon, op til 0,042 g withanosid og op til 0,017 g physagulin (Dhar *et al.* 2006). I en undersøgelse af temperaturens og tidspunktet i vækstsæsonens indflydelse på indholdet af withanolider i planteprøver fra Indien var den højst målte koncentration af withanolid A i roden 0,11% (tørvægt) (Kumar *et al.* 2012). Rødder indsamlet i Indien blev analyseret for tre withanolider. Det gennemsnitlige indhold af 12-deoxywithastramonolid var på 0,44 mg/g tørvægt, mens gennemsnitsindholdet af withanolid A lå på 0,72 mg/g tørvægt (Gajbhiye *et al.* 2015). På baggrund af oplysninger i artiklen har DTU Fødevareinstituttet beregnet, at indholdet af withaferin A i roden var 0,32 mg/g tørvægt. I en undersøgelse blev der indsamlet planter fra forskellige områder i Indien for at identificere genotyper med højt udbytte af aktive indholdsstoffer. Der er data for roden fra 15 særligt lovende genotyper. Indholdet af withaferin A varierede fra 0,06-0,89% og det højest målte indhold af withanolid A var på 1,47%, angivet som tørvægt (Srivastava *et al.* 2018). I en undersøgelse af roden fra 25 genotyper af *W. somnifera* dyrket i Indien i to vækstsæsoner (2015-2017), varierede det total indhold af withanolid A fra 1,2-2,35 µg/mg (Chauhan *et al.* 2019).

Andre indholdsstoffer

Det totale indhold af polyfenoler og flavonoider i roden af *W. somnifera*, som var dyrket i en botanisk have i Bangladesh, blev undersøgt. Der blev målt et totalt indhold af polyfenoler i roden på 17,8 mg/g tørvægt (angivet som gallussyre-ækvivalenter), mens indholdet af flavonoider var på 15,49 mg/g tørvægt (angivet som catechin-ækvivalenter) (Alam *et al.* 2011). I en undersøgelse af roden fra 25 genotyper af *W. somnifera* dyrket i Indien varierede stivelsesindholdet fra 5,5-15,7% og fiberindholdet fra 18,7-35,8% (Chauhan *et al.* 2019).

Bladet

Alkaloider

Pati *et al.* (2008) målte i de tørrede blade et totalt indhold af alkaloider på 2,10%. Blade, som var angrebet af en svamp (*Alternaria*), havde et næsten dobbelt så højt alkaloidindhold på 4,14% (Pati *et al.* 2008). I en undersøgelse blev der indsamlet planter fra forskellige områder i Indien for at identificere genotyper med højt udbytte af aktive indholdsstoffer. Bladets indhold af totalalkaloider i 15 særligt lovende genotyper varierede fra 0,18-0,58% (tørvægt) (Srivastava *et al.* 2018).

Withanolider

I bladene fra forskellige dyrkede og vilde indiske eksemplarer af *W. somnifera* fandtes et totalindhold af withanolider på 0,16-2,07% (Sreerekha *et al.* 2004). Pati *et al.* (2008) målte i de tørrede blade et totalt indhold på 3,75% withanolider, herunder et indhold på 0,13% af withaferin A. I blade angrebet af svampen *Alternaria* var indholdet af withanolider væsentligt lavere på 0,89% withanolider og 0,11% withaferin A. Srivastava *et al.* (2008) analyserede syv indiske prøver af bladet for tre withanolider og fandt et indhold på: 0,12-1,3% withanolid A, 0,1-1,1% withaferin A og 0,004-0,25% 12-deoxywithastramonolid (alle angivet som tørvægt). I en undersøgelse af 15 prøver fra Indien fandtes i bladene et indehold per 100 g (tørvægt) på op til 0,025 g withanolid A, op til 0,320 withanon, op til 0,567 g withaferin A, op til 0,125 g withastramonolid, op til 0,147 g 27-hydroxywithanon, op til 0,084 g withanosid og op til 0,086 g physagulin (Dhar *et al.* 2006). I en indisk undersøgelse af temperaturens og tidspunktet i vækstsæsonens indflydelse på indholdet af tre withanolider blev der ikke påvist withanolid A i bladet, mens de højest målte niveauer af withanon og withaferin A var henholdsvis 0,389% og 0,594% (tørvægt) (Kumar *et al.* 2012). Der blev

analyseret for indholdet af tre withanolider i bladet indsamlet i Indien. Indholdet af withaferin A blev målt til 8,84 mg/g (tørvægt), mens der ikke blev fundet withanolid A (Gajbhiye *et al.* 2015). Indholdet af 12-deoxywithastramonolid i bladet blev angivet i forhold til indholdet i roden og DTU har beregnet, at gennemsnitsindholdet af 12-deoxywithastramonolid i bladet var 0,02 mg/g tørvægt. I en undersøgelse blev der indsamlet 53 genotyper fra forskellige områder i Indien for at identificere genotyper med højt udbytte af aktive indholdsstoffer. I 15 særligt lovende genotyper varierede indholdet af withanolid A i bladet fra 0,01-0,17% og det højest målte indhold af withaferin A var på 0,02% (tørvægt) (Srivastava *et al.* 2018). Ægyptisk *W. somnifera* indeholdt i de tørrede blade op til 0,21% withanolid S (Mahrous *et al.* 2018).

Andre indholdsstoffer

Der blev fundet indhold af polyfenoler på 32,58 mg/g tørvægt (angivet som gallussyre-ækvivalenter) og af flavonoider på 31,58 mg/g tørvægt (angivet som catechin-ækvivalenter) i blade fra planter dyrket i Bangladesh (Alam *et al.* 2011).

Frugten/bærret

Alkaloider

Der er ikke fundet undersøgelser af indholdet af alkaloider.

Withanolider

I bærrerne af forskellige dyrkede og vilde indiske eksemplarer af *W. somnifera* fandtes et totalindhold af withanolider på 2,95-3,35% (Sreerekha *et al.* 2004). Plantemateriale, herunder frugten, indsamlet i Indien blev analyseret for indhold af withanolider. Indholdet af withanolider blev angivet i forhold til det gennemsnitlige indhold i andre plantedele (Gajbhiye *et al.* 2015). DTU Fødevareinstituttet har beregnet, at frugtens gennemsnitsindhold af withaferin A var 3,96 mg/g, af 12-deoxywithastramonolid var 0,10 mg/g og af withanolid A var 0,04 mg/g (alt angivet af tørvægt). I frugter fra *W. somnifera* dyrket på en indisk forsøgs-mark plukket i forskellige stadier af udviklingen varierede indholdet af withanolider fra 3,1-27,7 mg/g tørvægt (Sidhu *et al.* 2011).

Andre indholdsstoffer

Der blev målt et indhold af polyfenoler på 22,29 mg/g tørvægt (angivet som gallussyre-ækvivalenter) og et indhold af flavonoider på 21,15 mg/g tørvægt (angivet som catechin-ækvivalenter) i frugten fra *W. somnifera* dyrket i Bangladesh (Alam *et al.* 2011). Indholdet af withanamider varierede fra 4,6-17,2 mg/g tørvægt (Sidhu *et al.* 2011).

Stænglen

Der er kun fundet få undersøgelser af stænglen og ingen undersøgelser af indholdet af alkaloider, polyfenoler eller flavonoider.

Withanolider

På baggrund af oplysninger fra artiklen af Gajbhiye *et al.* (2015) har DTU Fødevareinstituttet beregnet, at gennemsnitsindholdet i indiske prøver af stænglerne var 1,51 mg/g tørstof for withaferin A, 0,04 mg/g tørstof af 12-deoxywithastramonolid og 0,03 mg/g tørstof af withanolid A.

Ikke specificerede plantedele

Withanolider

Indholdet af withaferin A og seks andre withanolider blev undersøgt i ti kommercielle produkter solgt i Indien. Der var på produkterne oplysninger om indholdet af *W. somnifera* per dagsdosis. Den målte mængde af withaferin A i plante eller ekstrakt varierede fra 0,02-2,34 mg/g. Med den af producenterne anbefalede dagsdosis blev der indtaget fra 0,02-1,4 mg withaferin A. Der var lignende variation i indholdet af andre undersøgte withanolider. Forfatterne spekulerede på, om årsagen til den store variation i indholdsstoffer skyldtes det anvendte plantemateriale, dyrkningsforhold, forhold under præparationen eller uregulerede og ikke-deklarerede tilsætninger. De anbefalede derfor bedre kvalitetssikring af produkter fremstillet af *W. somnifera*, så indholdet bliver mere ensartet (Sangwan *et al.* 2004).

Alkaloider

Der blev udført analyser for indhold af forskellige alkaloider i et tørret pulveriseret plantemateriale fra *W. somnifera* indkøbt fra en polsk leverandør og et kosttilskud med deklareret indhold af planten købt på et polsk apotek. Der er ikke oplysninger om hvilke plantedele, der indgår i de to produkter. Der blev fundet purinalkaloider (koffein, theobromin, theofyllin), indolalkaloider (harmin, harman og yohimbin) samt isoquinolinalkaloider (berberin, noskapin og papaverin) både i det pulveriserede plantemateriale og i kosttilskuddet (Filipiak-Szok *et al.* 2017). I en artikel fra 2018 undersøgte samme forskergruppe indholdet af isoquinolinalkaloider i en prøve af pulveriseret plante og i et kosttilskud med angivet indhold af *W. somnifera*. Der blev igen fundet berberin, noskapin og papaverin (Filipiak-Szok *et al.* 2018).

Der undersøges ikke for tropan-, piperidin- og pyrrolidinalkaloider, som er de grupper af alkaloider, der er fundet i roden tidligere (WHO 2009, Klenow *et al.* 2012). Det skal bemærkes, at de fundne alkaloider ikke tilhører grupper af alkaloider, som tidligere er fundet i *W. somnifera* og heller ikke er alkaloider, som man normalt ville forvente at finde i en plante tilhørende Natskyggefamilien. DTU Fødevarestyrelsen vurderer, at de undersøgte produkter enten må indeholde andre plantearter, som har et naturligt indhold af de nævnte alkaloider, eller er tilsat alkaloiderne.

Generelle toksikologiske undersøgelser

Roden

En artikel (Patel *et al.* 2016) beskriver to rotteforsøg udført i rottestammen Wistar. Begge undersøgelser blev udført med en ekstrakt af roden. Ekstrakten indeholdt 4,5% withaferin A og blev leveret af Pharmanza Herbal Pvt. Ltd., Gujarat, Indien. Ekstrakten blev fremstillet af den pulveriserede rod fra *W. somnifera* først med ethanol som ekstraktionsmiddel og afdampning af ekstraktionsmidlet, derefter med ethylacetat og igen fjernelse af væske, indtil slutproduktet, en koncentreret ekstrakt.

Det akutte forsøg blev udført med 5 hunrotter, som oralt (gennem munden) med mavesonde fik en enkelt dosis ekstrakt på 2000 mg/kg legemsvægt. Ekstrakten blev opløst i destilleret vand. Der var ingen rotter, der døde i de efterfølgende 14 dage, hvor de blev observeret for mulige tegn på toksiske effekter, som der ikke blev rapporteret nogle af. Der blev heller ikke set makroskopiske patologiske forandringer på dag 15, hvor rotterne blev aflivet. På baggrund af dette forsøg konkluderede forfatterne, at for ekstrakten er LD₅₀, dvs. den enkeltdosis, der slår 50% af rotterne ihjel, større end 2000 mg/kg legemsvægt/dag.

Ifølge artiklen (Patel *et al.* 2016) følger det subakutte forsøg OECD-guideline 407 for et 28-dages forsøg i gnavere ("Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents" fra 2001). I forsøget indgik 5 hanner og 5 hunner (per dosisgruppe), som i 28 dage blev doseret med ekstrakt i doser på 0, (ikke-doseret gruppe),

500, 1000 eller 2000 mg/kg legemsvægt/dag, hvorefter de blev aflivet. Der blev udtaget blod til hæmatologiske undersøgelser og til klinisk kemi, udvalgte organer blev vejede, og der blev udført makroskopiske og histopatologiske undersøgelser af de udtagne organer. Der indgik endnu en kontrolgruppe og en gruppe, der fik højeste dosis (2000 mg/kg legemsvægt) i 28 dage efterfulgt af en doseringsfri periode på 14 dage, hvorefter disse dyr også blev aflivet og undersøgt som de øvrige grupper. Der blev ikke set dødsfald under forsøget. Ifølge forfatterne var der ikke nogle toksiske effekter af doseringen sammenlignet med kontrolholdet for: Kliniske effekter, indtag af foder- og vand (data er ikke vist), tilvækst (data er ikke vist), øjenundersøgelser (oftalmologiske undersøgelser), kliniske observationer, organvægte (data ikke vist) og de makroskopiske og mikroskopiske patologiske undersøgelser (data ikke vist). Der blev observeret nogle statistisk signifikante forskelle i de hæmatologiske og klinisk-kemiske målinger, som ifølge forfatterne er inden for de normalt målte niveau i laboratoriet.

Forfatterne anbefaler et 90-dages forsøg med ekstrakten og et "prenatal developmental toxicity study" for yderligere at vurdere sikkerheden af ekstrakten. DTU Fødevareinstituttet bemærker, at ekstrakten og den laboratorietestning, der var nødvendig for at udføre undersøgelsen, var finansieret af Pharmanza Herbal Pvt. Ltd., ligesom artiklens sidsteforfatter er ansat i denne virksomhed.

Et akut forsøg udføres for at fastlægge en enkelt dosis af et stof, (eller som her en ethanolekstrakt af roden), der slår 50% af dyrene ihjel. Det er ikke designet til at finde effekter, der opstår efter længere tids dosering. DTU Fødevareinstituttet bemærker, at der i 28-dages forsøget hos hannerne blev fundet statistisk signifikante stigninger i "packed cell volume" (et mål for mængden af røde blodlegemer i blodet) både ved 1000 og 2000 mg/kg legemsvægt/dag, hæmoglobinkoncentrationen var forhøjet ved den højeste dosis, det samme var MCV ("mean corpuscular volume") dvs. det gennemsnitlige rumfang af de røde blodlegemer var større end normalt. Hos hunnerne var antallet af hvide blodlegemer forhøjet ved den højeste dosis, hæmoglobinkoncentrationen var forhøjet både ved 1000 og 2000 mg/kg legemsvægt/dag og protrombintiden var lavere ved den højeste dosis. I hanner og hunner fra højdosisgruppen, der efterfølgende havde en doseringsfri periode på 14 dage, var "Activated partial tromboplastin"-tiden statistisk signifikant lavere hos hunnerne, mens protrombintiden var lavere både hos både hanner og hunner, dog uden at være statistisk signifikant.

Ifølge den nyeste OECD-guideline nr. 407 for et 28-dages forsøg fra (2008) kan man eventuelt veje livmoder og æggestokke – det er ikke gjort i forsøget. Det er ikke forklaret, hvorfor forfatterne har valgt at følge en tidligere guideline for et 28-dages forsøg fra 2001, når der eksisterer en nyere udgave.

En artikel af Prabu *et al.* (2013) beskriver to rotteforsøg, et akut forsøg og et subakut forsøg udført i rottestammen Wistar. Rotterne blev doseret med en ekstrakt leveret af virksomheden Ellees Aromatics Ltd. Den anvendte ekstrakt var en methanolekstrakt af roden af *W. somnifera* dyrket i Indien. Ekstrakten blev fremstillet ved, at den pulveriserede lufttørrede rod blev blandet med 80% methanol, hvorefter væsken blev destilleret, tørret, siet og pulveriseret. Udbyttet af ekstrakt var 10% (dvs. at der fra 100 g rod udvindes 10 g ekstrakt). Ekstraktens indehold af withaferin A blev målt til $0,043 \pm 0,004$ g per 100 g.

Det akutte forsøg i hunrotter er ifølge artiklen foretaget efter OECDs guideline nr. 425 (OECD 2001) med mindre modifikationer. Fem hunrotter fik oralt (med mavesonde) en enkelt dosis af ekstrakt (opløst i destilleret vand) på 2000 mg ekstrakt/kg legemsvægt. Der blev ikke observeret dødsfald eller set adfærdsmæssige ændringer i de 14 dage forsøget varede og ikke set patologiske ændringer ved den makroskopiske undersøgelse af de aflivede rotter.

I det subakutte forsøg blev rotter (6 hanner og 6 hunner per dosisgruppe) dagligt i 28 dage med mavesonde doseret med ekstrakten (opløst i destilleret vand) i doser på 0 (kontrol), 500, 1000 and 2000 mg/kg legemsvægt. Yderligere indgik endnu en kontrolgruppe og en gruppe, der fik 2000 mg/kg legemsvægt i 28 dage efterfulgt af en doseringsfri periode på 14 dage. Der blev ikke set statistisk signifikante forskelle mellem de doserede grupper og kontrolgruppen i foderforbrug og væskeindtag, legemsvægte og tilvækst, organvægte, hæmatologiske og biokemiske parametre eller ved de makroskopiske og histopatologiske undersøgelser. Data vises i artiklen. På baggrund af forsøget konkludere forfatterne, at NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) for den undersøgte ekstrakt er 2000 mg/kg legemsvægt/dag. Ligesom Patel *et al.* (2016) anbefaler artiklens forfattere, at der udføres længerevarende toksikologiske undersøgelser (90 dage eller et år), undersøgelser af mulige effekter på reproduktion, fosterudvikling og evt. kræftfremkaldende virkninger. Forfatterne er universitetsansatte og oplyser, at de ikke har interessekonflikter.

DTU Fødevareinstituttet finder det usædvanligt, at ikke en eneste af de mange testede parametre afviger statistisk signifikant fra kontrolgruppen. Forfatterne har efter variansanalysen brugt Tukeys test. Tukeys test sammenligner alle grupper med hinanden, inklusive kontrolgruppen, mens en anden test, Dunnett's test, sammenligner de doserede grupper med kontrolgruppen. Det er den sidste sammenligning, man typisk foretager i dyreforsøg. Dunnett's test er f.eks. også brugt i det andet 28-dages forsøg (Patel *et al.* 2016). Beskrivelsen af de statistiske test er fra GraphPad Prism 5, det statistikprogram, som artiklens forfattere har anvendt.

Bærrene

Ifølge Duke (1985) forårsager bærrene, der en gang imellem bliver spist af børn, alvorlige symptomer fra mave-tarmkanalen.

Hele planten

I en screeningundersøgelse for toksiske effekter blev planterne indkøbt hos lokale handlende på Sri Lanka, der solgte ayurvedisk urtemedicin. Hele planten (20% w/w tørret pulveriseret plante) blev blandet i foder, som blev indgivet i 10-14 dage til Sprague-Dawley rotter (Arseculeratne *et al.* 1985). Rotterne indtog ca. 5 g plante/rotte per dag (Arseculeratne *et al.* 1981, 1985). Der var ingen dødsfald, men 5/6 rotter havde centrilobulær hydrofisk degeneration i leveren, 4/6 rotter havde peribronchial og perivenøst ødem i lungen og i 5/6 rotter var der i nyrerne betydelig intertubulær karkongestion, tubulære casts og tubulær degeneration (5/6) (Arseculeratne *et al.* 1985).

I undersøgelser af hele planten blev effekter undersøgt efter otte måneders dosering og fire ugers dosering (Sharma *et al.* 1986). Hele planten blev brugt til fremstilling af en dekott og både væsken og resterne af planten blev efter dekoktfremstillingen doseret til rotter i drikkevandet i fire uger samt otte måneder. Det beskrives ikke i artiklen om der anvendes tørret eller frisk plante.

Kønsmodne rotter blev inddelt i grupper (bestående af fire hunner og to hanner), der dagligt blev doseret med henholdsvis kogt vand (kontrolgruppen) eller 100 mg/kg i drikkevandet. Der var ingen dødsfald i gruppen, der fik *W. somnifera*, mens et dyr døde i kontrolgruppen. Den doserede gruppe tog mere på i vægt efter 8 måneders dosering (227%) i forhold til kontrolgruppen (146%) og forskellen var statistisk signifikant. Der var seks hunrotter, der blev drægtige i den doserede gruppe, og fem i kontrolgruppen. Kuld størrelsen var otte i den doserede gruppe og ni i kontrolgruppen. Efter en måned var den gennemsnitlige

vægt af afkommet i den doserede gruppe højere end i kontrolgruppen, 70 g i forhold til 45 g, dog er der ikke foretaget statistiske analyser og vægte for afkommets hanner og hunner angives ikke hver for sig.

Data fra flere fire ugers studier fra samme forfattere er samlet og beskrevet. Dyrene blev doseret på samme måde som i otte måneder-studiet. Grupperne bestod af albino hanrotter (vægt på ca. 200 g). Kontrolgruppen bestod af 23 dyr og gruppen, der fik *W. somnifera* (250 mg/kg) bestod af 35 dyr. Der var ikke nogen statistisk signifikant forskel på tilvæksten mellem den eksponerede gruppe og kontrolgruppen efter fire uger. Forfatterne undersøgte i 12 kontroller og doserede dyr også organvægte, legemstemperaturen og kortisolindholdet i blodplasma. Den relative levervægt var statistisk signifikant forøget i den doserede gruppe i forhold til kontrolgruppen, men der blev ikke observeret histopatologiske ændringer i leveren i den eksponerede gruppe. Den relative binyrevægt og kortisolindholdet i blodplasma var begge statistisk signifikant lavere i den doserede gruppe sammenlignet med kontrolgruppen og der var ingen histopatologiske forandringer i binyrerne. Den doserede gruppe havde en lavere legemstemperatur på 1.5 °C i forhold til kontrolgruppen (28,17 °C sammenlignet med 29,87 °C).

DTU Fødevareinstituttet har medtaget denne artikel, men vurderer at både 8 måneders-studiet samt 4 ugers- studiet har væsentlige begrænsninger i studiedesign og rapporteringen af data i forhold til at foretage en vurdering af mulige toksiske effekter. I toksikologiske forsøg kan forskelle mellem kontrolgruppe og doseret gruppe være tegn på effekter af doseringen. DTU Fødevareinstituttet vurderer ikke, at den større vægtstigning i den doserede gruppe af voksne dyr sammenlignet med kontrolgruppen, eller den højere vægt af afkommet sammenlignet med kontrolgruppen er gunstige effekter. Der er imidlertid ikke foretaget yderligere undersøgelser, der kan afklare grunden til de observerede forskelle. I undersøgelsen, der varer 8 måneder, er der for få dyr i hver gruppe, der er kun en dosisgruppe, data for hanner og hunner er blandet sammen og angives ikke hver for sig, organerne vejes ikke og der indgår ingen undersøgelser af eventuelle patologiske forandringer, hverken makroskopisk eller mikroskopisk. Derudover avler man på dyrene, som får et kuld unger i 8 måneders forsøget. Der er ingen beskrivelser af, at drikkevandsforbruget måles, hvilket er nødvendigt for at beregne indtaget i mg/kg legemsvægt. Det er ikke beskrevet, hvordan målingerne af legemstemperaturen er foregået, men rektaltemperaturen for rotter ligger på 37-39 °C (Den Danske Dyrlegeforening 2013). I 4-ugers undersøgelsen er der i forhold til at vurdere de mulige toksiske effekter set forskelle i de relative levervægte og binyrevægte mellem de doserede dyr og kontrolgruppen.

Undersøgelser af drægtighed og fosterudvikling

Roden

Prabu & Panchapakesan (2015) undersøgte effekten af en methanolekstrakt af roden fra *W. somnifera* i drægtige Wistar hunrotter. Ekstrakten har samme batchnummer, som ekstrakten anvendt af Prabu *et al.* (2013) og var produceret af virksomheden Ellees Aromatics Ltd. Ifølge artiklen var forsøget udført efter OECDs guideline 414 "for the assessment of prenatal developmental toxicity", udgaven fra 2001. I undersøgelsen indgik fire grupper af hunrotter (25 rotter/gruppe), som hver blev parret med en hanrotte (dag 0). Fra dag 5-19 blev hunnerne oralt (med mavesonde) doseret med ekstrakt i doser på 0 (kontrol), 500, 1000 eller 2000 mg/kg legemsvægt/dag. Hunnerne blev aflivet dag 20. Der var ingen dødsfald under doseringen. Rotterne i det højest doserede gruppe havde statistisk signifikante højere legemsvægte og vægte af de gravide livmodere sammenlignet med kontrolgruppen. Det gennemsnitlige antal levendefødte unger var også højere (10,4 i højest dosisgruppe mod 7,3 i kontrolgruppen - forskellen var ikke statistisk signifikant). Forfatterne bemærkede, at de højere legemsvægte og vægte af livmodere kunne fortolkes som en østrogen

effekt, men da der samtidig var et øget antal levende fostre i den højest doserede gruppe, kunne det være forklaringen. Forfatterne konkluderede, at ekstrakten ikke gav anledning til toksiske effekter på moderdyrene eller på fostrene vurderet ud fra antallet af gule legemer (*corpora lutea*), implantationer, antallet af levende fostre og forekomsten af eksterne misdannelser samt misdannelser på skeletter eller organer.

DTU Fødevareinstituttet skal bemærke, at OECDs guideline nr. 414 giver valgmuligheder mht. om doseringen skal foregå i hele drægtighedsperioden eller først begynde på drægtighedens dag 5 dvs. det tidspunkt, hvor organudviklingen begynder i embryonerne/fostrene hos rotter. Guideline beskriver, at hvis der i præliminære undersøgelser ikke er observeret præimplantationstab, dvs. at de befrugtede æg/embryon går til grunde tidligt i drægtigheden, kan doseringen foregå i hele drægtighedsperioden. Da doseringen i forsøget er begyndt på drægtighedens dag 5, er forsøget designet på en måde, hvor det ikke er muligt at vurdere, om ekstrakten har en skadelig virkning på det befrugtede æg/embryon tidligere i fosterudviklingen. Denne tidlige periode er af speciel relevans i lyset af, at roden er omtalt som abortfremkaldende jf. WHO (2009).

Specifikke undersøgelser - kønshormoner, fertilitet og parringsadfærd

Roden: Effekter på vægte af kønsorganer, kønshormoner og parringsadfærd hos voksne hanrotter

Illyperuma *et al.* (2002) undersøgte effekten af en methanolekstrakt, som forfatterne selv fremstillede fra roden af *W. somnifera* på en række parametre knyttet til parringsadfærd. Roden var købt på et lokalt marked i Sri Lanka og ægtheden blev bekræftet af en navngiven botaniker fra universitetet. Hanrotter (10 dyr per gruppe) fik ekstrakt oralt i en dosis på 0 (2 grupper) eller 3000 mg/kg legemsvægt/dag i syv dage (2 grupper). Ifølge forfatterne var den anvendte dosis 15 gange højere end den dosis, som mennesker indtager. Hannerne blev sat sammen med parringsvillige hunner 7 dage før behandlingen begyndte, på doseringsdag 3 og 7 samt 14 og 30 dage efter behandlingen. Rotterne, der fik ekstrakt, viste en betydelig reduktion i parringsvillighed, mens de blev doseret med ekstrakten. Nogle af de målte parametre var stadig nedsat 30 dage efter, at doseringen var ophørt. Der var ingen dødsfald, foder- og vandforbrug forblev normale, der sås ikke makroskopiske ændringer eller vægtændringer af kønsorganer og accessoriske kønsorganer

DTU Fødevareinstituttet skal bemærke, at artiklen ikke viser data for de nævnte parametre.

Kiasalari *et al.* (2009) undersøgte effekten af roden på forskellige kønshormoner i blodet hos hanrotter. Roden var købt på det lokale marked i Iran og ægtheden var bekræftet af universitetets botaniske afdeling. I forsøget indgik Wistar hanrotter (vægt 195-220 g, 8 dyr i kontrolgruppen og 11 i den doserede gruppe), der i fire uger fik almindeligt rottefoder (kontrol) eller foder iblandet 6,25% tørret rod fra *W. somnifera*. Der blev observeret statistisk signifikant lavere indhold af FSH (follikelstimulerende hormon) i serum hos rotter doseret med *W. somnifera* sammenlignet med kontrolgruppen. Progesteron-, testosteron- og LH (luteiniserende hormon) -niveauerne var alle statistisk signifikant højere i forhold til kontrolgruppen, mens østrogenniveauet ikke var påvirket.

Ganu *et al.* (2010) udblødte i vand den pulveriserede, tørrede rod fra *W. somnifera* købt af en forhandler i Indien. Hanrotter (Wistar, 250-300 g, 6 per gruppe) blev doseret dagligt med ekstrakten i doser på 0 (vehikel eller ekstrakt med 1% CMC i DW, 10 ml/kg) opløst i destilleret vand 100, 200 og 400 mg/kg legemsvægt i fire uger. Forkortelserne CMC og DW er ikke defineret, men DW kunne være destilleret vand. Efter aflivning blev der fra bitestiklerne fra fire hanner udtaget sædceller, som blev talt i et tællekammer. Le-

gemesvægten var statistisk signifikant højere i den højeste doserede gruppe sammenlignet med kontrolgruppen. For den mellemste og højeste dosisgruppe var de relative organvægte (mg/100 g legemsvægt) af testikler og prostata statistisk signifikant højere sammenlignet med kontrolgruppen. Antallet af sædceller var statistisk signifikant højere i alle grupper doseret med *W. somnifera* sammenlignet med kontrolgruppen. I artiklen beskrives også en undersøgelse i hanmus (6 mus per gruppe), der oralt fik en enkelt dosis af ekstrakten (samme dosisniveauer som i rotteforsøget) og 30 minutter efter doseringen havde øget parringsadfærd.

DTU Fødevareinstituttet har medtaget undersøgelsen af Ganu *et al.* (2010), men skal bemærke, at undersøgelsen er mangelfuldt beskrevet, når det gælder fremstilling af ekstrakt, forsøgsdesign og resultater.

Sahin *et al.* (2016) undersøgte effekterne på organvægte, kønshormoner, sædkvalitet og parringsadfærd. Hanrotter (Sprague-Dawley, 8 uger gamle, 7 per gruppe) blev i otte uger ikke doseret (negativ kontrol) eller fik oralt (med mavesonde) sidenafilcitrats (viagra) 5 mg/kg legemsvægt/dag (positiv kontrol) eller en ekstrakt af roden fra *W. somnifera* (300 mg/kg legemsvægt/dag opløst i destilleret vand). Ekstrakten var fremstillet fra den tørrede rod med ekstraktionsmidlerne methanol-vand (70:30). Den færdige ekstrakt indeholdt som minimum 2,5% total-withanolider og havde en renhed på 98%. Den anvendte ekstrakt stammede fra virksomheden Omniactive Health Technologies (Indien). Efter aflivning blev følgende kønsorganer og accessoriske kønsorganer vejet: testikler, bitestikler, vas deferens (sædleder), sædblærer og ventrale prostata. Sædkvaliteten blev undersøgt ved tælling af sædceller i cauda epididymis (en del af bitestiklen) og undersøgelse af, om sædcellerne havde et normalt udseende (morfologi). Blodprøver blev udtaget til hæmatologiske og biokemiske undersøgelser. Niveauet af testosteron i blodet og sædcelleantallet var statistisk signifikant højere i rotter doseret med *W. somnifera* (det samme blev set med viagra) sammenlignet med den ubehandlede kontrol. Både viagra og *W. somnifera* øgede parringsadfærden sammenlignet med den ubehandlede kontrol. Der blev ikke set forskelle mellem gruppen doseret med *W. somnifera* og de ubehandlede kontroldyr i de øvrige undersøgte parametre.

Forsøget er udført af tyrkiske universitetsforskere, som blev støttet finansielt af virksomheden Omniactive Health Technologies (USA). Artiklens sidste forfatter er ansat i virksomheden. I undersøgelsen indgik også ekstrakter af to andre planter fra samme virksomhed og både *Mucuna pruriens* og *Tribulus terrestris* viste sig også at påvirke parringsadfærden og forskellige andre af de målte parametre. Alle ekstrakter angives at have en renhed på 98%. Der er ikke udført kemiske undersøgelser af ekstrakten med *W. somnifera* eller de andre ekstrakter foretaget af uafhængige kilder.

Blade: Kønsmodning hos rotter

Abdel-Magied *et al.* (2001) fremstillede en vandig ekstrakt ved at opløse 200 g pulveriserede blade i varmt, destilleret vand. Opløsningen blev filtreret og frysetørret. Udbyttet var 32 g ekstrakt. Tyve dage gamle hanrotter (Wistar, legemsvægt 37-39 g, 10 dyr/gruppe) blev i 6 dage doseret oralt (med sonde) med destilleret vand (kontrolgruppe) eller ekstrakt opløst i destilleret vand (470 mg/kg legemsvægt/dag). Der sås spermatogenese (dannelse af sædceller) i testiklerne hos det *W. somnifera*-doserede grupper, men ikke i kontrolgruppen. Derudover blev der i blodet målt statistisk signifikante lavere indhold af testosteron og FSH i gruppen, der fik ekstrakt, sammenlignet med kontrolgruppen, mens der ikke var forskel i niveauerne af LH.

Al-Qarawi *et al.* (2000) undersøgte effekterne af en vandig ekstrakt af bladet på kønshormoner og æggestokke hos ikke-kønsmodne hunrotter. Ekstrakten blev fremstillet på samme måde, som beskrevet i Abdel-Magied *et al.* (2001) (beskrevet ovenfor i notatet). Wistar hunrotter (10 dyr/gruppe), der var enten 17 eller 25 dage gamle ved forsøgets begyndelse, blev i seks dage doseret oralt (med sonde) med destilleret vand (kontrolgruppe) eller ekstrakt (470 mg/kg legemsvægt/dag). Efter doseringen vejede de doserede yngste rotter statistisk signifikant mere end kontrolgruppen (40,5 g mod 28,5 g), mens vægte af æggestokke og blodets indhold af de to hormoner LH og FSH ikke var forskellige. I rotter doseret fra dag 25, var den relative vægt af æggestokkene statistisk signifikant højere i den doserede gruppe sammenlignet med kontrolgruppen (118 mod 78 mg/100 g legemsvægt) og blodets indhold af FSH var også statistisk signifikant højere i den doserede gruppe (17,6 IU/l) sammenlignet med kontrolgruppen (13,9 IU/l), mens LH-niveauerne ikke var forskellige mellem grupperne. Den højere vægt af æggestokkene i de ældste doserede dyr skyldtes udvikling af follikler i dette organ, som er et tegn på tidlig kønsmodning.

Stængel: Sædkvalitet hos hanrotter

Singh *et al.* (2013) nævner, at der er beskrevet antifertile egenskaber af *W. somnifera* i Ayurveda. Forsøgets formål var derfor at undersøge, om stænglerne havde antifertile egenskaber, der evt. vil kunne bruges til at nedbringe befolkningstilvæksten. Stænglen blev indsamlet i Indien og en botanisk afdeling på et universitet bekræftede, at det var den rigtige plante. Forfatterne fremstillede en ethanolekstrakt (50% ethanol) af den tørrede stængel. Stængel og ethanol blev kogt i 24 timer, derpå filtreret gennem gaze og koncentreret under tryk. Koncentrationsforhold: 250 g tørret stængel gav 15 g ekstrakt. Der blev fundet steroider, alkaloider og tanniner ved fytokemisk screening af ekstrakten, som ikke blev yderligere kemisk undersøgt. Hanrotter (6 dyr per gruppe) fik i 60 dage dagligt oralt (med sonde) destilleret vand (kontrolgruppe), eller ekstrakt (opløst i destilleret vand) i doser på 25 mg/kg legemsvægt eller 50 mg/kg legemsvægt. Ekstrakten blev fremstillet dagligt. Fem dage før forsøgets afslutning blev hanrotterne sat sammen med fertile hunrotter (2 hunner per han). Antallet af drægtige hunner, det totale antal fødte unger per gruppe og antallet af unger per kuld blev talt. Hanrotterne blev vejet ved forsøgets begyndelse og før aflivning. Ved aflivningen udtog og vejede man testikler, bitestikler, sædblærer (vesicula seminalis) og den ventrale prostata. Sædkvalitet (sædcellernes bevægelighed, morfologi og antal per ml) blev undersøgt i en sædprøve udtaget fra bitestiklen. Blodets (serums) indhold af kønshormonerne testosteron, FSH og LH blev målt. Testiklerne blev undersøgt mikroskopisk (histopatologisk). Doseringen påvirkede ikke hanrotternes legemsvægt. De relative organvægte (mg per 100 g rotte) af testikler, bitestikler og sædblærer var alle statistisk signifikant og dosisafhængigt mindre i de to doserede hold sammenlignet med kontrolgruppen. I begge doserede grupper var antallet af sædceller statistisk signifikant og dosisafhængigt reduceret, mens sædcellernes bevægelighed kun var statistisk signifikant reduceret i den højeste dosisgruppe sammenlignet med kontrolgruppen. Den histopatologiske undersøgelse viste, at dannelsen af sædceller var ophørt i de doserede grupper. Niveauerne af testosteron og FSH var statistisk signifikant reducerede i den højeste dosisgruppe, men ikke i den lave dosisgruppe sammenlignet med kontrolgruppen. LH-niveauerne var ikke påvirkede af doseringen. Antallet af drægtige hunner blev negativt og dosisafhængigt påvirket af doseringen med ekstrakten. Alle 12 hunner (100%) parret med hanner i kontrolgruppen blev drægtige, sammenlignet med 8 hunner (67%) parret med hanner fra den laveste og 4 hunner (29%) parret med hanner fra den højeste dosisgruppe. DTU Fødevareinstituttet bemærker, at antallet af dyr (6/gruppe) er få for sådan et type studie.

Frugten: Sædkvalitet hos rotter

Mali *et al.* (2008) fra Indien præsenterede i et abstract resultater fra en undersøgelse foretaget med hanrotter, der dagligt oralt i 60 dage blev doseret med 50 mg/kg legemsvægt af en 50% ethanolekstrakt af

frugten fra *W. somnifera*. Der blev foretaget undersøgelser af organvægte af kønsorganer og accessori-ske kønsorganer, sædkvalitet (sædcellernes bevægelighed og antal/ml) og foretaget histopatologiske undersøgelser af testiklerne. I de doserede dyr var sædkvaliteten dårligere både mht. sædcellernes bevæ-gelighed og antal, vægte af testiklerne og sædblærer samt andre accessoriske kønsorganer var lavere og der blev set histopatologiske forandringer i de områder af testiklerne, der har betydning for normal dan-nelse af sædceller.

DTU Fødevareinstituttet skal bemærke, at det er præliminære data, der præsenteres i et abstract. Der mangler mange oplysninger i forsøgsbeskrivelsen f.eks. antallet af hanrotter, om der indgår en ubehand-let kontrolgruppe og der findes ingen kvantitative data i resultatafsnittet.

Kliniske undersøgelser i mænd - kønshormoner

Rod: effekt på kønshormonet testosteron hos mænd, der samtidig styrketræner

I et dobbelt-blindt, placebo-kontrolleret klinisk forsøg af 8 ugers varighed rekrutteredes 57 raske mænd i alderen 15-50 år. Der indgik målinger af testosteronniveauer i blodet, men undersøgelsens primære for-mål var at måle mulige effekter af en ekstrakt på muskelstyrken hos mænd, der samtidig styrketrænede. Mændene blev inddelt i to grupper, der indtog identisk udseende tabletter enten en daglig dosis på 600 mg ekstrakt af roden eller placebo (cellulose). Ekstrakten kaldet "KSM-66" var en vandig ekstrakt af roden fra *W. somnifera* standardiseret til at indeholde 5% withanolider. Den var doneret af producenten Ixoreal BioMed, USA. Begge grupper styrketrænede i forsøgsperioden. Femogtyve forsøgspersoner i hver gruppe gennemførte undersøgelsen. Tre forsøgspersoner i placebogruppen og fire i *W. somnifera*-grup-pen holdt op i styrketræningsprogrammet før tid. Der blev udtaget blodprøver ved undersøgelsens begyn-delse og slutning. For at deltage skulle forsøgspersonerne opfylde en række kriterier. Forsøgspersonerne måtte ikke drikke alkohol, ryge eller indtage anti-inflammatoriske lægemidler i forsøgsperioden. De måtte bl.a. heller ikke indtage medicin, herunder steroider, for at øge deres fysiske formåen, have haft et vægt-tab større end 5 kg i de sidste tre måneder, måtte ikke tidligere have brugt illegale stoffer, røget mere end 10 cigaretter per dag eller indtaget mere end 14 g alkohol per dag, være overfølsomme over for *W. som-nifera* eller have deltaget i andre kliniske undersøgelser i de sidste tre måneder før forsøgsstart. Forsøgs-personerne skulle rapportere om eventuelle bivirkninger. Ifølge forfatterne blev der ikke rapporteret alvor-lige bivirkninger og der blev ikke set forskelle mellem de to gruppers såkaldte PGATT-scorer, hvor PGATT står for "Physicians Global Assessment of Tolerability to Therapy form". Forfatterne fandt, at der var en større statistisk signifikant stigning ($P=0,004$) i testosteronniveauet i serum fra forsøgets begyn-delse til forsøgets afslutning i gruppen, der fik *W. somnifera* (96,2 ng/dl) sammenlignet med placebogrup-pen (18,0 ng/dl) ($P=0,004$) (Wankhede *et al.* 2015).

DTU Fødevareinstituttet konstaterer, at der er variation i den gennemsnitlige koncentration af testosteron i serum mellem de to grupper ved forsøgets begyndelse med 630 ng/dl (SD (standardafvigelse) 232 ng/dl) i *W. somnifera*-gruppen og 675 ng/dl (SD 157 ng/dl) i placebogruppen. Ved forsøgets afslutning er de tilsvarende tal 727 ng/dl (SD 172 ng/dl) i *W. somnifera*-gruppen sammenlignet med 693 ng/dl (SD 115 ng/dl) i placebogruppen. Generelt ses betydelig spredning i de målte værdier. Hvis man sammenligner det absolutte testosteronniveau ved forsøgets afslutning er der ingen statistisk signifikant forskel ($P=0,42$) mellem de to grupper. Det er ikke nærmere beskrevet, hvilke bivirkninger, der blev rapporteret i de to grupper. DTU Fødevareinstituttet vurderer, at det valgte system til indsamling af bivirkninger er udviklet til brug ved testning af lægemidler. Det skal bemærkes, at de samme bivirkninger/skadelige virkninger for lægemidler vurderes mildere, fordi det normalt accepteres, at lægemidler kan have bivirkninger, mens produkter, der sælges som kosttilskud, ikke bør have bivirkninger.

Roden: effekter på niveauet af kønshormoner hos infertile mænd

Der er ved litteratursøgningen fundet fire undersøgelser, der ser på mulige effekter af den tørrede, pulveriserede rod eller en ekstrakt heraf i ufrivilligt barnløse, men ellers raske, indiske mænd (Ahmad *et al.* 2010, Mahdi *et al.* 2011, Gupta *et al.* 2013, Ambiye *et al.* 2013). Mændenes manglende frugtbarhed skyldtes især dårlig sædkvalitet. Tre af undersøgelserne blev udført af samme forskergruppe (Ahmad *et al.* 2010, Mahdi *et al.* 2011, Gupta *et al.* 2013), som gav i alt 315 infertile mænd i alderen 22-45 år, 5 g tørret pulveriseret rod dagligt i tre måneder. Roden blev givet sammen med mælk. Det blev nærmere specificeret, om den manglende fertilitet skyldtes uforklarlige årsager eller mændene havde lavere antal sædceller end normalt, sædceller med dårlig bevægelsesevne eller med morfologiske forandringer. Roden blev købt af lokale forhandlere af medicinske planter. I en af artiklerne har en botaniker på universitetet identificeret, at den anvendtes *W. somnifera* (Mahdi *et al.* 2011). Der blev ikke analyseret for indholdsstoffer i rødderne. Blodets (serums) indhold af hormonerne testosteron, LH, FSH og prolaktin blev undersøgt ved forsøgenes begyndelse og afslutning. Ved forsøgenes begyndelse blev hormonniveauerne i de infertile mænd sammenlignet med fertile mænd. De infertile grupper af mænd havde alle lavere niveauer af testosteron og LH og i de fleste tilfælde højere niveauer af FSH og prolaktin sammenlignet med de fertile mænd. Efter dosering med roden var niveauerne af testosteron og LH højere og FSH lavere, mens prolaktin var lavere eller uforandret i forhold til niveauerne ved forsøgets begyndelse (Ahmad *et al.* 2010, Mahdi *et al.* 2011, Gupta *et al.* 2013).

Den fjerde undersøgelse var en randomiseret dobbelt-blind, placebokontrolleret klinisk undersøgelse i 46 infertile mænd (med lavt sædcelleantal), fordelt på 25 mænd, der fik kapsler med placebo og 21 mænd, som dagligt i 90 dage blev doseret med kapsler med 675 mg ekstrakt fremstillet af roden. Der er ikke oplysninger om indholdet i placebokapslerne. Ekstrakten blev fremstillet af et indisk firma, Ixoreal Biomed Private Ltd. Det anvendte ekstraktionsmiddel er ikke oplyst, men ekstrakten var standardiseret til et indhold af mindst 5% withanolider. Ifølge artiklen indeholdt den også tilsigtede mængder af alkaloider, lang- og kortkædede aminosyrer, komplekse sukkerarter, vitamin A, calcium og jern. I den doserede gruppe var testosteron-niveauet efter 90 dages dosering steget med 17% ($P < 0,01$) (fra $4,45 \pm 1,41$ ng/ml til $5,22 \pm 1,39$ ng/ml, gennemsnit $\pm$ SD) og LH med 34% ($P < 0,02$) (fra $3,97 \pm 1,21$ mIU/ml til $5,31 \pm 1,33$ mIU/ml) sammenlignet med niveauet inden dosering (Ambiye *et al.* 2013).

DTU Fødevareinstituttet skal bemærke, at der i de fire undersøgelser mangler oplysninger om antallet af personer, der ikke gennemførte undersøgelserne. Det er ikke sandsynligt, at alle gennemførte. Der er i tre af undersøgelserne (Ahmad *et al.* 2010, Mahdi *et al.* 2011, Gupta *et al.* 2013) ingen beskrivelse af, at der blev indsamlet oplysninger om bivirkninger, mens der i undersøgelsen af Ambiye *et al.* (2013) blev registreret bivirkninger, som dog ikke beskrives med oplysninger om symptomer. I tre undersøgelser indtog forsøgspersonerne også mælk sammen med roden og har dermed yderligere indtaget næringsstoffer, vitaminer og mineraler fra mælken. I undersøgelsen, hvor forsøgspersonerne indtog ekstrakt (Ambiye *et al.* 2013), indeholdt denne også forskellige vitaminer og mineraler. Det er uklart, om de stammer fra roden eller er tilsat.

Rod og blade: effekter på kønshormoner hos overvægtige mænd

I et dobbelt-blindt, placebo-kontrolleret, overkrydsningsforsøg blev der rekrutteret raske, overvægtige mænd (Body Mass Index (BMI) 25-35). Forsøgspersonerne var i alderen 40-70 år, havde milde til moderate symptomer på træthed og var bosiddende i Australien. Kriterier for at indgå i undersøgelsen var, at mændene skulle være ikke-rygere, ikke måtte have indtaget medicin i de foregående tre måneder og ikke

havde planer om livstilsændringer, herunder at gå på slankekur, under forsøget. Deltagelse var udelukket, hvis mændene led af psykiske sygdomme eller fysiske sygdomme som sukkersyge, autoimmune sygdomme, hjerte-karsygdomme, forhøjet blodtryk, kronisk træthedssyndrom, astma, havde haft en infektion i de sidste måneder, drak mere end 14 genstande alkohol om ugen, indtog narkotiske stoffer, indtog andre plantebaserede kosttilskud, urter eller krydderier. De anvendte tabletter havde identisk udseende og indeholdt enten ristet rismel (placebo) eller en ekstrakt, "Shoden beads", fremstillet af rod og blad fra *W. somnifera* af en indisk virksomhed Arjuna Natural Ltd. Der er ikke oplysninger om det anvendte ekstraktionsmiddel. Ekstrakten var standardiseret til at indeholde 35% withanolidglykosider. Med en dagdosis blev der indtaget 21 mg withanolidglykosider. Alle mænd indtog placebo i 8 uger og ekstrakt af *W. somnifera* i 8 uger. Af de 57 mænd, som indgik i undersøgelsen, fuldførte 43. Forsøgspersonerne indberettede eventuelle bivirkninger uge 4, 8, 12 og 16. Der var ikke forskel mellem bivirkninger med placebo og ekstrakt. Forfatterne beskrev ikke nærmere de rapporterede bivirkninger. Ingen forsøgspersoner trak sig fra undersøgelsen på grund af bivirkninger. Spytpøver indsamlet af forsøgspersonerne selv om morgenen ved forsøgets begyndelse, efter 8 uger og efter 16 uger, blev undersøgt for indhold af testosteron, kortisol, østradiol og DHEA-S (dehydroepiandrosteron-sulfat, et forstadium til testosteron og østrogen). Indtagelse af ekstrakten gav anledning til et øget indhold af DHEA-S (18%, $P = 0,005$) og et øget indhold af testosteron (14,7%, $P = 0,01$) i spyt sammenlignet med placebo, mens der ikke var statistisk signifikante forskelle i niveauerne af kortisol og østradiol. Forfatterne gør opmærksom på, at undersøgelsen havde få deltagere, hvilket gør det vanskeligt at drage faste konklusioner. Tyve procent af forsøgspersonerne var skifteholdsarbejdere. Hormoner blev målt i spyt i stedet for i serum. Forfatterne henviser til artikler, der skulle vise, at hormonmålinger i spyt korrelerer med indhold i serum. Spytpøven skal udtages i de første 15 minutter efter at personen er vågnet og stadigvæk er fastende, hvilket forfatterne ikke havde mulighed for at tjekke om blev fulgt. Hvis dette ikke overholdes, vil det negativt påvirke pålideligheden af data, fordi der er stor dagsvariation i hormonniveauerne. Undersøgelsen var finansieret af virksomheden, der fremstiller ekstrakten. Forfatterne kommer i diskussionen ind på, at stigninger i testosteron og DHEA-S i mænd vurderes at have positiv effekt på helbredet, men medicinsk behandling for manglende testosteron er forbundet med øget risiko for mænd, der allerede har øget risiko for at udvikle hjerte-karsygdomme, allerede lider af sygdomme i prostata eller har søvnapnø. Forfatterne mener, at sikkerheden af *W. somnifera* i mænd med den type sygdomme kræver nærmere overvejelser, men mener samtidig, at det vil være usandsynligt, at den stigning, der blev set i testosteronniveauet, som er inden for normale endogene koncentrationer, skulle give anledning til alvorlige bivirkninger (Lopresti *et al.* 2019).

Der mangler oplysninger om fremstillingen af ekstrakten og der indgår kun få forsøgspersoner. DTU Fødevareinstituttet vurderer, at hormonniveauerne er målt med en mere upålidelig metode (i spyt ikke i blod-plasma) og kan yderligere være påvirket af, at døgnrytmen kan være forstyrret hos deltagere, der havde skifteholdsarbejde.

Specifikke undersøgelser - skjoldbruskkirtlen

Roden: Skjoldbruskkirtlen, dyreforsøg

En vandig ekstrakt af pulveriseret rod af indisk *W. somnifera* (koncentrationsforhold rod: ekstrakt, 5:1, roden indeholdt 1,75% withanolider) blev givet oralt med sonde i en dosis på 0 (destilleret vand) eller 1,4 g/kg legemsvægt/dag i 20 dage til voksne hunmus (Swiss albino, 7 mus/gruppe) og til voksne hanmus (Swiss albino, 10 mus/gruppe). Hos hunmus doseret med *W. somnifera* blev der set en stigning i blodets (serums) indhold af hormonet T_4 (thyroxin, tetrajodthyronin) ($P < 0,001$), men ikke T_3 (trijodthyronin) sammenlignet med kontrol dyr. I hanmus forårsagede den vandige ekstrakt af *W. somnifera* stigninger i skjoldbruskkirtelhormonerne T_4 ($P < 0,001$) og T_3 ($P < 0,05$) sammenlignet med kontrolholdet. De observerede

hormonændringer pegede på, at ekstrakten kan påvirke skjoldbruskkirtlens funktion (Panda & Kar 1998, Panda & Kar 1999).

De samme forfattere undersøgte også effekten af daglig indgivelse af 20 mg ekstrakt af roden/dyr til hane-kyllinger i 30 dage. Her steg koncentrationen af T_4 , men ikke T_3 (Panda & Kar 1997).

Forskerne fra et egyptisk forskningscenter fremstillede en methanolekstrakt (vand og methanol som ekstraktionsmidler) af pulveriseret rod fra *W. somnifera* købt i Egypten. Botanikere på forskningscenteret bekræftede, at pulveret stammede fra *W. somnifera*. Kvalitativ analyse af methanolekstrakten viste bl.a. indhold af alkaloidet tropin og withanoloid B. En gruppe hanrotter (albinorotter fra forskningscenterets dyrekoloni, vægt 150-200 g) fik induceret for lavt stofskifte (hypothyroidisme) ved dosering med 0,05% propylthiouracil i drikkevandet i 6 uger. Rotter, der ikke var blevet doseret med propylthiouracil og dermed havde normalt stofskifte, blev fordelt på en ubehandlet kontrolgruppe og en gruppe, der oralt fik *W. somnifera*-ekstrakt (500 mg/kg legemsvægt/dag). Rotter med hypothyroidisme blev fordelt på tre andre grupper: en ubehandlet kontrolgruppe (positiv kontrol), en gruppe, der med sonde fik et lægemiddel som tilførte thyroxin (T_4), Eltroxin™ (20 µg/kg legemsvægt/dag), og en gruppe, der fik ekstrakt af *W. somnifera* (500 mg/kg legemsvægt/dag). Hver gruppe bestod af 10 rotter og alle grupper blev aflivet efter en måneds dosering. Ved aflivningen blev der bl.a. udtaget blodprøver til undersøgelse af indholdet af hormonerne: TSH (thyroideastimulerende hormon), T_3 (total og frit) og T_4 (total og frit) i serum. Rotter doseret med propylthiouracil havde udviklet hypothyroidisme vist ved hormonniveauer, der var statistisk signifikant forskellige ($P \leq 0,05$) fra niveauerne i den ubehandlede kontrol. Rotter med hypothyroidisme doseret med *W. somnifera*-ekstrakt eller Eltroxin, havde et statistisk signifikant lavere indhold i serum ($P \leq 0,05$) af TSH henholdsvis 1,21 ng/ml eller 1,51 ng/ml sammenlignet med den positive kontrol (14,86 ng/ml). I den ubehandlede kontrol var TSH på 1,26 ng/ml og i rotter doseret med ekstrakt på 1,25 ng/ml. Rotter med hypothyroidisme doseret med *W. somnifera*-ekstrakt eller Eltroxin havde et statistisk signifikant ($P \leq 0,05$) højere serumindhold af total T_3 på henholdsvis 41,3 eller 72,4 ng/ml sammenlignet med 34,4 ng/ml i den positive kontrol (ubehandlet kontrol 65,5 ng/ml og rotter, der fik ekstrakt 62 ng/ml). Rotter med hypothyroidisme doseret med *W. somnifera*-ekstrakt eller Eltroxin havde et statistisk signifikant ($P \leq 0,05$) højere serumindhold af frit T_3 (begge på 2,91 pg/ml) sammenlignet med 1,59 pg/ml i den positive kontrol. Frit T_3 i den ubehandlede kontrol var på 2,22 pg/ml og i rotter doseret med ekstrakt 2,92 pg/ml. Niveauet af total T_4 , var statistisk signifikant højere ($P \leq 0,05$) i rotter med hypothyroidisme doseret med *W. somnifera*-ekstrakt eller Eltroxin henholdsvis 6,44 eller 7,32 µg/dl sammenlignet med 3,91 µg/dl i den positive kontrol. Den ubehandlede kontrolgruppe havde et niveau på 5,62 µg/dl og raske dyr, der fik ekstrakt, et niveau på 6,03 µg/dl. Niveauet af frit T_4 i rotter med hypothyroidisme var statistisk signifikant ($\leq 0,05$) højere og på 1,11 eller 1,16 ng/ml i rotter doseret med henholdsvis *W. somnifera*-ekstrakt eller Eltroxin sammenlignet med den positive kontrol 0,58 ng/ml. I den ubehandlede kontrol var frit T_4 på 1,49 ng/ml og i raske rotter doseret med ekstrakt på 1,54 ng/ml (Abdel-Wahhab *et al.* 2019).

Formålet med undersøgelsen var ikke at undersøge sikkerheden ved indtagelse af *W. somnifera*-ekstrakt, men om ekstrakten havde en effekt på skjoldbruskkirtlen og dens hormoner hos rotter med eksperimentelt induceret lavt stofskifte. DTU Fødevareinstituttet skal bemærke, at forfatterne ikke har angivet, at der skulle være statistisk signifikante forskelle i hormonniveauer mellem rotter med normalt stofskifte (ubehandlet kontrol) og dyr med normalt stofskifte doseret med *W. somnifera*-ekstrakt, selvom niveauerne af frit T_3 og total T_4 er højere i de doserede dyr sammenlignet med, hvad der findes i den ubehandlede kontrol. Der er også forskelle f.eks. i tilvækst, hvor der heller ikke er angivet statistisk signifikans, selv om der

er tydelige forskelle mellem de to grupper af rotter, der ikke havde for lavt stofskifte. Det antages, at forfatterne generelt ikke har fundet sådanne sammenligninger interessante og derfor heller ikke har angivet, hvis der var statistiske forskelle. Der er ikke data til, at DTU Fødevareinstituttet selv kan lave en statistisk analyse. De højere niveauer af fri T_3 og total T_4 i doserede rotter (uden for lavt stofskifte) sammenlignet med, hvad der findes i den ubehandlede kontrol, tyder på, at ekstrakten også kan påvirke rotter med normalt stofskifte.

Roden: Skjoldbruskkirtlen – kliniske undersøgelser i mennesker

Sharma *et al.* (2018) har i et pilotstudie udført i Indien undersøgt effekten af produktet (KSM-66), som indeholdt en 100% vandig ekstrakt af roden. Den færdige ekstrakt indeholdt 5% withanolider. KSM-66 blev givet i en daglig dosis på 600 mg ekstrakt i 8 uger. Ekstrakten var doneret af producenten Ixoreal Biomed, USA. Forsøgspersoner, både mænd og kvinder, led af for lavt stofskifte (hypothyroidisme) bestemt ved et højt serumindhold af hormonet TSH, der stimulerer skjoldbruskkirtlen. Forsøgspersonerne (50 personer) blev fordelt, så 25 fik placebo (stivelse) og 25 andre fik ekstrakt i 8 uger. Otte ugers indtagelse af ekstrakten gav statistisk signifikante ændringer i serumniveauerne af TSH, T_3 og T_4 , så de kom nærmere normalværdierne, sammenlignet med placebogruppen. Der blev ikke rapporteret om forskel i bivirkninger mellem forsøgspersoner, der fik ekstrakt (1 bivirkning), og dem, der fik placebo (3 bivirkninger). Forfatterne gør opmærksom på, at der er behov for undersøgelser i en større gruppe forsøgspersoner og med længere tids dosering for at sikre, at indtagelse ikke fører til udvikling af thyreotoksikose, som beskrevet i tilfældet omtalt af van der Hooft *et al.* (2005), der beskrives senere.

Uspecificeret plantedel – bivirkninger mennesker

I Holland udviklede en 32-årig ellers rask kvinde thyreotoksikose (dvs. forhøjet stofskifte som følge af at organismen påvirkes af abnorme mængder af hormoner dannet i skjoldbruskkirtlen) efter at have indtaget kapsler indeholdende en ekstrakt af ashwagandha (plantens navn på sanskrit). Kvinden indtog ikke andre af den type produkter eller medicin. Sygdommen forsvandt efter, at hun var holdt op med at tage kapslerne (van der Hooft *et al.* 2005).

Uspecificeret plantedel – skjoldbruskkirtlen – kliniske undersøgelser i mennesker

Gannon *et al.* (2014) undersøgte en standardiseret ekstrakt af *W. somnifera* (Sensoril®) doneret af producenten Natreon, USA. Studiets formål var at undersøge mulige effekter på mentale færdigheder (kognitive funktioner) i mennesker, der led af bipolar lidelse. Forsøgspersonerne fortsatte med den medicin, de normalt indtog, i forsøgsperioden. Der er ikke oplysninger om ekstrakten i Gannon *et al.* (2014). Flere detaljer om forsøget er beskrevet i en tidligere artikel (Chengappa *et al.* 2013). Her oplyses, at USAs fødevarer- og lægemiddelmyndighed (FDA, Food and Drug Administration) godkendte forsøget efter en "investigational new drug application", og at Sensoril® indeholdt en vandig ekstrakt standardiseret til at indeholde minimum 8% withanolider og maximum 2% withaferin (som ifølge artiklen kan være toksisk i højere doser). Derudover indeholdt ekstrakten 32% oligosakkarider (bærestoffer). Det fremgik ikke, hvilken plantedel, der blev brugt til fremstilling af ekstrakten (Chengappa *et al.* 2013). Fordi forfatterne havde læst om påvirkning af skjoldbruskkirtlen i dyreforsøg og om thyreotoksikose hos et menneske, inkluderede de for yderligere at undersøge sikkerheden målinger af TSH, frit T_4 og T_3 i serum inden forsøget begyndte og ved dets afslutning. Der indgik i alt 60 personer, både mænd og kvinder, i undersøgelsen fordelt på en placebogruppe og en gruppe, der fik 500 mg af ekstrakten i 8 uger (Gannon *et al.* 2014, Chengappa *et al.* 2013). Det er data fra 18 personer i *W. somnifera*-gruppen og 19 personer fra placebogruppen i undersøgelsen af hormonniveauer i blodet før og efter forsøget. Tre forsøgspersoner (3/18 ~ 17%), der fik Sen-

soril®, havde stigninger i T₄-niveauet på 7-24% efter 8 ugers dosering. I placebogruppen var der 7 forsøgspersoner, der havde ændringer i T₄-niveauet. Her var der i 6/7 (6/19 ~ 32%) fald på 4-29%, mens 1/7 (1/19 ~ 5 %) havde en stigning på 15%. Forfatterne konkluderede, at de observerede forandringer tydede på, at *W. somnifera* kan få T₄-niveauet til at stige, og at det berettiger til øget opmærksomhed, om indgivelse af planten kan medføre forhøjet stofskifte (hyperthyroidisme). Forfatterne erklærede, at de ikke havde interessekonflikter.

Specifikke undersøgelser - centralnervesystemet

Roden: dyreforsøg

En methanolekstrakt af roden havde i reagensglasforsøg (*in vitro*) en betydelig (76%) inhiberende (hæmmende) effekt på acetylcholinesterase (Vinutha *et al.* 2007). En undersøgelse viste dosis-afhængige hæmmende effekter på acetylcholinesterase af såvel en vandig ekstrakt som en methanolekstrakt udvundet af roden i forskellige hjerneområder (bl.a. cerebral cortex og cerebellum) i hanrotter, der i 10 dage dagligt oralt fik en af ekstrakterne samtidig med injektioner af skopolamin. De doserede grupper blev sammenlignet med en gruppe hanrotter, der alene fik skopolamin, som øger niveauet af neurotransmitteren acetylcholin i forskellige områder af hjernen. Der indgik også en kontrolgruppe, der fik saltvand, en gruppe, der fik skopolamin, og en gruppe der fik skopolamin samtidig med et dagligt oralt indtag af et aktivt lægemiddelstof donepezil, der virker ved at hæmme aktiviteten af acetylcholinesterase i hjernen. Rotterne var af stammen Wistar og der var fem hanrotter per gruppe. Forskerne fremstillede selv ekstrakterne af rødder af *W. somnifera*, som de havde købt og som en botaniker på universitetet havde bekræftet var den korrekte planteart (Visweswari *et al.* 2014).

Der er udført forskellige adfærdsundersøgelser, som sammenligner effekten af ekstrakt med kendte lægemidler. Gupta & Rana (2007) sammenlignede den angstdæmpende effekt af et kommercielt ekstrakt udvundet af roden fra *W. somnifera* (fra Dabur, Indien) med lægemidlet diazepam (et benzodiazepin). Rotter, der havde været isoleret fra artsfæller i 6 uger, blev adfærdstestet. Rotter fik dagligt oralt 0, 50, 100, 200 og 500 mg/kg legemsvægt 5 dage inden adfærdstestningen eller intraperitonealt (injektion i bughulen) 1 eller 2 mg/kg diazepam 30 minutter før testen. Der var 7 dyr per gruppe. Der blev observeret adfærd, der tydede på angstdæmpende effekt i grupperne, der havde fået mellem 100-500 mg/kg af ekstrakten eller diazepam. Gupta & Rana (2007) fandt også, at rotterne doseret med fra 100-500 mg/kg ekstrakt havde en dosisafhængig adfærdsmæssig ændring i en "forced swimming test", hvilket blev tolket som et tegn på antidepressiv effekt. I et andet forsøg, hvor mus var stressede på grund af manglende søvn, blev der ligeledes set en ændret adfærd, der tolkes som at der er sket en angstdæmpning, efter oral indtagelse af 100 eller 200 mg/kg legemsvægt af en købt ekstrakt fra roden, hvor der ikke er yderligere oplysninger om ekstraktionsmidler (Kumar & Kalonia 2007).

DTU Fødevareinstituttet har ikke ved litteratursøgningen fundet forsøg, som undersøger effekter på aktiviteten af acetylcholinesterase i forsøgsdyr, der doseres oralt med roden eller præparationer heraf uden samtidig indgivelse af andre stoffer. Hæmning af acetylcholinesterase over et vist niveau vurderes som en skadelig effekt (Nielsen *et al.* 2008, JMPR 1999). Der er ikke udført toksikologiske undersøgelser med roden, der kan anvendes til at finde et niveau, hvorunder denne hæmning af acetylcholinesterase ikke ses.

Specifikke undersøgelser - immunsystemet

Roden

En etanolekstrakt udvundet fra roden blev dagligt oralt indgivet til grupper á 6 hunmus i doser på 0, 10, 30, 100 mg/kg legemsvægt i 15 dage. Ekstrakten indeholdt 1,34 g withanolid A per 100 g og andre withanolider i lavere koncentrationer. Levamisol, et veterinært lægemiddel brugt mod indvoldsorm, som også har en stimulerende effekt på immunsystemet, fungerede som positiv kontrol. Dag 9 blev alle mus immuniseret intraperitonealt med røde blodlegemer fra får. Dyrene blev aflivet dag 15, hvor man vejede milt og thymus (brissel). Andre grupper doseret på samme måde blev provokeret med røde fåreblodlegemer dag 15 og der blev udført test for at måle immunsystemets funktion. Den absolutte vægt af milt og thymus var forhøjet i den laveste og mellemste dosis-gruppe sammenlignet med kontrolgruppen. I alle doserede grupper var der øget forekomst af celler i lymfoide organer som milt, brissel og knoglemarv. I dyr doseret med de to laveste doser ekstrakt var der forøget celleproliferation af T- og B-lymfocytter, når disse blev stimuleret med mitogen. I alle dosisgrupper sås en øget type IV immunologisk reaktion (forsinket allergisk reaktion), der er knyttet til T-lymfocytter (Malik *et al.* 2007).

Andre eksperimentelle undersøgelser i mus pegede på, at ekstrakter af roden kan påvirke immunsystemet f.eks. vist med ethanolekstrakter af flere prøver (Siddiqui *et al.* 2012, Kushwaha *et al.* 2012) ligesom der også er set påvirkning af immunsystemet i rotter doseret med en vandig suspension af den pulveriserede rod (Rasool & Varalakshmi 2006). DTU Fødevareinstituttet skal bemærke, at påvirkninger af immunsystemet kan være skadeligt. DTU Fødevareinstituttet vurderer, at der ikke i nogle af de nævnte undersøgelser er data til at finde et niveau, hvor disse effekter ikke ses.

Bivirkningsindberetninger

Uspecificeret plantedel - leveren

Et nyligt publiceret studie (Björnsson *et al.* 2020) beskrev fem tilfælde af leverskade hos tre mænd og to kvinder (21-62 år) fra Island og USA efter indtagelse af kosttilskud med *W. somnifera* (plantedel og præparation blev ikke specificeret) opstået i perioden 2016-2018. I de tre tilfælde fra Island kom kosttilskuddene fra samme producent og personerne havde indtaget fra 450-1350 mg/dag. Indholdet af *W. somnifera* i de fem kosttilskud blev bekræftet ved kemisk analyse. Symptomer på leverskade (kvalme, træthed, kløe og gulsot) optrådte 2-12 uger efter at indtaget var begyndt. Patienternes levertal faldt til normale niveauer 1-6 måneder efter ophørt indtag. Sandsynligheden for at indtaget af *W. somnifera* var årsag til leverpåvirkningen, blev vurderet. Et tilfælde blev vurderet som "definite" (sandsynlighed > 95%), to tilfælde som "highly likely" (sandsynlighed 75-95%) og de sidste to tilfælde som "probable" (sandsynlighed 50-74%). Forfatterne til abstract har ikke forklaret, hvordan man fortolker klassifikationen af kausaliteten (årsagssammenhængen). DTU Fødevareinstituttet har derfor tilføjet oplysninger om sandsynligheder fra Reggev *et al.* (2014). Björnsson *et al.* (2020) nævnte, at de kendte til yderligere et tilfælde af leverskade efter indtag af ashwagandha (Inagaki *et al.* 2017). Dette studie bidrager dog ikke med noget væsentligt, det er bl.a. ikke helt klart om leverskaden er forårsaget af ashwagandha og der er ingen oplysninger om den indtagne dosis.

Andre institutioners risikovurderinger af roden i kosttilskud/fødevarer

Det Tyske Risikovurderingsinstitut (BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung) foretog i 2012 en vurdering af roden fra *W. somnifera* og ekstrakter udvundet heraf (Klenow *et al.* 2012). Formålet med vurderingen var at komme med et forslag til indplacering i bilag III i EUs Forordning Nr. 1925/2006 om tilsætning af vitaminer og mineraler samt visse andre stoffer til fødevarer (EU 2006). Klenow *et al.* (2012) anbefalede

på baggrund af væsentlige mangler i data til at vurdere sikkerheden og sikkerhedsmæssige betænkkeligheder ved anvendelsen, at roden indplaceres i bilag III, del C. Bilag III, del C dækker stoffer/ingredienser, "hvis det er konstateret, at der er mulighed for sundhedsskadelige virkninger, men der fortsat er videnskabelig usikkerhed herom". Forfatterne vurderede, at roden har været anvendt i den Ayurvediske medicin, mens der kun er få oplysninger om anvendelse som fødevarer i Europa. De biologisk aktive stoffer i roden er withanolider (steroider) og alkaloider. Der er udført få undersøgelser med forskellige præparationer af roden i mennesker, hvor der ikke er observeret skadelige virkninger, men der er ikke systematisk undersøgt for sådanne virkninger. Der er ikke foretaget omfattende toksikologiske undersøgelser. Yderligere er der sikkerhedsmæssige betænkkeligheder på grund af den mulige påvirkning af skjoldbruskkirtlens funktion og på grund af, at roden er beskrevet anvendt som et abortfremkaldende middel. Det blev også nævnt, at EFSA (Den Europæiske Fødevaresikkerhedsautoritet) har foreslået, at man for nogle planter kan have en "presumption of safety", hvis der foreligger omfattende data om indtaget. Der forelå ikke historiske data, der gjorde det muligt at antage, at planten var sikker at indtage.

Internationale institutioners vurderinger af roden *W. somnifera* som lægemiddel

Det Europæiske Lægemiddelagentur

Det Europæiske Lægemiddelagentur (EMA, European Medicines Agency) konkluderede, at betingelserne for, at agenturet kunne udarbejde en monografi om roden fra *W. somnifera* (L.) Dunal ikke var opfyldt og at roden ikke kan vurderes og accepteres som et traditionelt plantelægemiddel i EU. Det skyldtes, dels at der manglede oplysninger til at beskrive præparationen (utilstrækkelige specifikationer af ekstrakt i forhold til hvad der kræves for et lægemiddel), dels at det ikke havde været muligt at finde oplysninger om 30 års medicinsk anvendelse, herunder mindst 15 års anvendelse i EU (EMA 2013).

Verdenssundhedsorganisationen (WHO)

WHO har i en monografi fra 2009 vurderet roden som lægemiddel. Her blev det nævnt, at roden kan forårsage bivirkninger som kvalme, opkastning og diarré. WHO nævnte også, at roden er kontraindiceret under graviditet og amning på grund af mangel på data om sikkerheden samt oplysninger om, at roden har været anvendt i traditionel medicin til at fremkalde abort (WHO 2009).

Andet

I en undersøgelse fra Jordan om traditionel brug af planter som lægemidler blev det nævnt, at de toksiske effekter af alle plantedele af *W. somnifera* var abort og sterilitet (Al-Qura'n 2005).

Sammendrag

Indholdsstoffer

Roden fra *W. somnifera*, som tilhører Natskyggefamilien, indeholder to hovedstofgrupper, som anses for at være bioaktive og dermed kan have betydning for de mulige effekter af planten, steroidlaktoner, kaldet withanolider, og alkaloider (WHO 2009, Klenow *et al.* 2012).

Selvom *W. somnifera* findes andre steder end i Indien, er der hovedsageligt publiceret analyser af indholdet af withanolider i indiske prøver af roden. Der blev fundet et totalindhold af withanolider på 0,23-1,11% (Sreerekha *et al.* 2004). To af de withanolider, som der er analyseret for i flere undersøgelser, er withaferrin A (0,002-0,04%) og withanolid A (0,11-0,24%) (Srivastava *et al.* 2008, Dhar *et al.* 2006, Kumar *et al.*

2012, Chauhan *et al.* 2019). I genotyper med særligt højt indhold af aktivstoffer varierede indholdet af withaferin A fra 0,06-0,89% og det højest målte indhold af withanolid A var 1,47% (Srivastava *et al.* 2018).

Det totale indhold af alkaloider i indiske prøver af roden var 0,16-0,96% (Srivastava *et al.* 2018, Chauhan *et al.* 2019). Analyser udført i 1960'erne fandt alkaloider tilhørende stofgrupperne piperidin-, pyrrolidin- og tropan-alkaloider. Der er ingen kvantitative data for indholdet af de enkelte alkaloider og ingen nyere undersøgelser. Alkaloider opfattes som en gruppe af stoffer, der potentielt kan være sundhedsmæssigt betænkelige og der mangler undersøgelser af de mulige toksiske effekter af alkaloiderne i roden.

Generelle toksikologiske undersøgelser

Der er publiceret forsøg med to kommercielt fremstillede ekstrakter af roden, i 28-dages forsøg i rotter. I det ene forsøg med en ethanolekstrakt (Patel *et al.* 2016), som i begrænset omfang præsenterede forsøgsdata, er der fundet statistisk signifikante stigninger i parametre knyttet for de røde blodlegemer og koagulationstid (protombintid), mens der i undersøgelsen af en methanolekstrakt (Prabu *et al.* 2013) ikke blev fundet nogen forskelle mellem doserede dyr og kontroldyr.

DTU Fødevareinstituttet vurderer, at forsøg af 28 dages varighed er for kort til at afklare om roden eller ekstrakt af roden har skadelige effekter, da en del effekter ikke vil opstå allerede efter for 28 dages dosering.

Effekter på kønshormoner og reproduktion

Abortfremkaldende effekt

For kvinder i den fødedygtige alder nævner Verdenssundhedsorganisationen (WHO) i en gennemgang af medicinsk anvendelse, at roden er kontraindiceret under graviditet og amning på grund af mangel på data om sikkerheden samt oplysninger om, at roden har været anvendt i traditionel medicin til at fremkalde abort (WHO 2009). Også en gennemgang foretaget af ansatte på BfR, Det Tyske Risikovurderingsinstitut, har udtrykt betænkeligheder ved sikkerheden pga. beskrivelser af, at roden er anvendt som abortfremkaldende middel (Klenow *et al.* 2012). Plantens antifertile egenskaber er kendt fra Indien (WHO 2009), men også fra Jordan, hvor alle plantedele ifølge Al-Qura'n (2005) er kendt for at kunne forårsage toksiske effekter som abort eller sterilitet. Selvom der er publiceret et enkelt dyreforsøg, hvor drægtige hunrotter gennem munden (oralt) fra drægtighedens dag 5-19 fik forskellige doser af en methanolekstrakt udvundet fra roden (Prabu & Panchapakesan 2015) kan dette forsøg ikke be- eller afkræfte rodens mulige abortfremkaldende effekter. Dels er hunrotterne ikke doseret i den relevante, tidlige periode af drægtigheden, dels er det ikke kendt hvilke stoffer i roden, der evt. virker abortfremkaldende og om de findes i den anvendte methanolekstrakt.

Kliniske studier der undersøger kønshormoner

Der er ikke publiceret undersøgelser i mænd, der har haft som hovedformål at undersøge effekter af roden eller præparationer heraf på niveauet af f.eks. testosteron i raske mænd. En enkelt undersøgelse med mænd, der styrketrænede, viste at der var en større statistisk signifikant stigning i testosteronniveauet i serum fra forsøgets begyndelse til forsøgets afslutning i gruppen, der fik *W. somnifera* sammenlignet med placebogruppen (Wankhede *et al.* 2015). I en anden undersøgelse, hvor det ikke kun var roden, der blev undersøgt, men en ekstrakt fremstillet af rødder og blade, fandt man i spytprøver stigninger i DHEA-S og testosteron i mænd, der fik ekstrakt, sammenlignet med mænd, der fik placebo. Forsøgspersonerne var raske, overvægtige mænd (Lopresti *et al.* 2019).

Der er fire undersøgelser, der ser på mulige effekter af den tørrede, pulveriserede rod (Ahmad *et al.* 2010, Mahdi *et al.* 2011, Gupta *et al.* 2013) eller af ekstrakt (Ambiye *et al.* 2013) til ufrivilligt barnløse indiske mænd, der blev doseret i tre måneder. Mændenes manglende frugtbarhed skyldtes især dårlig sædkvalitet. Efter doseringen med roden eller ekstrakt var der ændringer i hormonniveauerne så bl.a. testosteron var højere i forhold til niveauerne ved forsøgets begyndelse. De nævnte kliniske undersøgelser har alle haft relativt få deltagere og der mangler oplysninger om bivirkninger, enten registreres de ikke, eller hvis de registreres, beskrives de ikke. WHO (2009) omtalte i sin gennemgang af den medicinske anvendelse, at roden kan forårsage bivirkninger som kvalme, opkastning og diarré.

Undersøgelser af kønshormoner i dyr

Der er ikke foretaget undersøgelser med roden eller ekstrakter heraf i forsøgsdyr, der endnu ikke er kønsmodne. Undersøgelser med vandige ekstrakter af bladene i endnu ikke kønsmodne rotter viste, at både hanrotter og hunrotter, der fik ekstrakt, blev tidligere kønsmodne sammenlignet med kontroldyr, der kun fik destilleret vand (Abdel-Magied *et al.* 2001, Al-Qarawi *et al.* 2000). I begge studier blev kun en dosis anvendt.

Der er to undersøgelser, som har set på sædkvalitet, hormonniveauer og/eller effekter på kønsorganer i hanrotter doseret med andre plantedele end roden. En undersøgelse fandt, at 60 dages indgivelse af en ethanolekstrakt i to dosisgrupper af stænglen i kønsmodne hanrotter nedsatte niveauet af testosteron i blodet, fik produktionen af sædceller til at ophøre og medførte ringe fertilitet (Singh *et al.* 2013). Lignende effekter sås med en ethanolekstrakt af frugten i en dosisgruppe i en præliminær undersøgelse (Mali *et al.* 2008). Der findes withanolider i stængel og frugt, mens der ikke foreligger undersøgelser af et eventuelt indhold af alkaloider (Gajbhiye *et al.* 2015, Sidhu *et al.* 2011).

Studierne af Singh *et al.* (2001) og Mali *et al.* (2008) viser nedsat sædkvalitet samt nedsat fertilitet efter dosering med andre plantedele end roden, henholdsvis stænglen og frugten. Studierne af Abdel-Magied *et al.* (2001) og Al-Qarawi *et al.* (2000) viste, at ikke kønsmodne rotter blev tidligere kønsmodne efter dosering med vandige ekstrakter af blade.

Undersøgelse af drægtighed og fosterudvikling

Prabu & Panchapakesan (2015) undersøgte effekten af en methanolekstrakt af roden fra *W. somnifera* i drægtige Wistar hunrotter. Rotterne i den højest doserede gruppe havde statistisk signifikante højere legemsvægte og vægte af livmodere sammenlignet med kontrolgruppen. Der blev ikke observeret toksiske effekter på moderdyrene eller på fostrene vurderet ud fra antallet af gule legemer (corpora lutea), implantationer, antallet af levende fostre og forekomsten af eksterne misdannelser samt misdannelser på skeletter eller organer.

DTU Fødevareinstituttet vurderer, at der er en væsentlig begrænsning ved studiet. OECDs guideline nr. 414 giver valgmuligheder mht. om doseringen skal foregå i hele drægtighedsperioden eller først begynde på drægtighedens dag 5 dvs. det tidspunkt, hvor organudviklingen begynder i embryonerne/fostrene hos rotter. Da doseringen i forsøget er begyndt på drægtighedens dag 5, er det ikke muligt at vurdere, om ekstrakten har en skadelig virkning på det befrugtede æg/embryon tidligere i fosterudviklingen. Denne tidlige periode er af speciel relevans set i lyset af, at roden er omtalt som abortfremkaldende jf. WHO (2009).

Undersøgelser af skjoldbruskkirtlens funktion

I litteraturgennemgangen udført af ansatte på BfR (Klenow *et al.* 2012) nævnes sikkerhedsmæssige betænkeligheder på grund af den mulige påvirkning af skjoldbruskkirtlens funktion baseret bl.a. på et beskrevet tilfælde af thyreotoksikose hos en hollandsk kvinde, der havde indtaget et kosttilskud med *W. somnifera* (plantedel ukendt) (van der Hooft *et al.* 2005). Dertil kom eksperimentelle undersøgelser i mus, hvor en vandig ekstrakt af roden indgivet oralt i 20 dage medførte forhøjede niveauer af skjoldbruskkirtlens hormoner T_4 i både han- og hunmus og yderligere T_3 i hanmus (Panda & Kar 1998, Panda & Kar 1999). Der er efterfølgende publiceret et forsøg, der viste, at en methanolekstrakt af roden fra *W. somnifera* kunne påvirke blodets indhold af hormonerne TSH, T_3 og T_4 i en sygdomsmodel, hvor rotter eksperimentelt havde fået induceret for lavt stofskifte (hypothyroidisme). I raske rotter, der fik ekstrakt, var niveauerne af fri T_3 og total T_4 også højere i forhold til ubehandlede rotter (Abdel-Wahhab *et al.* 2019), hvilket kunne tyde på, at ekstrakten også påvirkede niveauerne af skjoldbruskkirtelhormon i rotter med normalt stofskifte.

Der er ikke publiceret undersøgelser, der alene har haft til formål at undersøge, om indtagelse af roden eller præparationer heraf påvirker skjoldbruskkirtlens normale funktion og dens hormoner i mennesker. To kliniske undersøgelser, begge med begrænsede antal af forsøgspersoner, kunne tyde på, at kommercielt fremstillede præparationer af roden eller af en ukendt plantedel, kan påvirke niveauet af skjoldbruskkirtlens hormoner i blodet hos mennesker. I det ene forsøg med personer, der led af for lavt stofskifte (hypothyroidisme), sås efter 8 ugers daglig indtagelse af en vandig ekstrakt af roden, at indholdet af TSH, T_3 og T_4 i blodet, nærmede sig normalværdierne for disse hormoner, sammenlignet med hormonspejlet i en gruppe, der fik placebo (Sharma *et al.* 2018). I den anden undersøgelse med personer, som ikke led af stofskiftesygdom, men af bipolar lidelse, fik deltagerne dagligt i 8 uger en standardiseret vandig ekstrakt af *W. somnifera* (plantedel ikke oplyst). Sytten procent, der fik ekstrakt, havde stigninger i T_4 i serum, mens der i placebogruppen var stigninger i det samme hormon i 5% og et fald i 32% af deltagerne (Gannon *et al.* 2014).

Studier der undersøger påvirkning af acetylcholinesterase og immunsystemet

Der er reagensglasforsøg der viser, at ekstrakter af roden kan hæmme acetylcholinesterase (Vinutha *et al.* 2007,). Et dyreforsøg har vist at, dosis-afhængige hæmmende effekter på acetylcholinesterase af såvel en vandig ekstrakt som en methanolekstrakt udvundet af roden i forskellige hjerneområder i hanrotter (Visweswari *et al.* 2014). Hæmning af acetylcholinesterase over et vist niveau vurderes som en toksisk effekt (Nielsen *et al.* 2008, JMPR 1999). Der er ikke udført undersøgelser, der kan anvendes til at fastlægge et dosisniveau, hvorunder denne hæmning af acetylcholinesterase ikke ses. Andre eksperimentelle dyreforsøg peger på, at forskellige ekstrakter af roden kan påvirke immunsystemet (Malik *et al.* 2007, Siddiqui *et al.* 2012, Kushwaha *et al.* 2012, Rasool & Varalakshmi 2006).

Effekter på leveren

Der er publiceret oplysninger om fem tilfælde af leverskade hos tre mænd og to kvinder fra Island og USA efter indtagelse af kosttilskud med indhold af *W. somnifera* (plantedel og præparation blev ikke specificeret). Symptomer på leverskade var set 2-12 uger efter at indtaget var begyndt (Björnsson *et al.* 2019).

Konklusionen på sammendraget findes på notatets side 1-2.

Referencer

- Abdel-Magied EM, Abdel-Rahman HA, Harraz FM (2001) The effect of aqueous extracts of *Cynomorium coccineum* and *Withania somnifera* on testicular development in immature Wistar rats. J Ethnopharmacol 75: 1-4.
- Abdel-Wahhab KG, Mourad HH, Mannaa FA, Morsy FA, Hassan LK, Taher RF (2019) Role of ashwagandha methanolic extract in the regulation of thyroid profile in hypothyroidism modeled rats. Mol Biology Rep 46: 3637-3649.
- Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Rajender S, Madhukar D, Shankhwar SN, Ahmad S (2010) *Withania somnifera* improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. Fertil Steril 94, 3: 989-995.
- Alam N, Hossain M, Khalil MI, Moniruzzaman M, Sulaiman S, Gan SH (2011) High catechin concentrations detected in *Withania somnifera* (ashwagandha) by high performance liquid chromatography analysis. BMC Complem Altern M 11, 65: 1-8.
- Al-Qarawi AA, Abdel-Rahman HA, El-Badry AA, Harraz F, Razig NA, Abdel-Magied EM (2000) The effect of extracts of *Cynomorium coccineum* and *Withania somnifera* on gonadotrophins and ovarian follicles of immature Wistar rats. Phytother Res 14: 288-290.
- Al-Qura'n S (2005) An ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. Toxicon 46: 119-129.
- Ambiye VR, Langade D, Dongre S, Aptikar P, Kulkarni M, Dongre A (2013) Clinical evaluation of the spermatogenic activity of the root extract of ashwagandha (*Withania somnifera*) in oligospermic males: a pilot study. Evid-Based Compl Alt Medicine. Volume 2013, Article ID 571420, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/571420>.
- Arseculeratne SN, Gunatilaka AAL, Panabokke RG (1981) Studies on medicinal plants of Sri Lanka: occurrence of pyrrolizidine alkaloids and hepatotoxic properties in some traditional medicinal herbs. J Ethnopharmacol 4: 159-177.
- Arseculeratne SN, Gunatilaka AAL, Panabokke RG (1985) Studies on medicinal plants of Sri Lanka. Part 14. Toxicity of some traditional medicinal herbs. J Ethnopharmacol 13: 323-335.
- Björnsson HK, Björnsson ES, Khan IA, Avula B, Navarro V (2020) Ashwagandha-induced liver injury: A case series from Iceland and the US Drug-Induced Liver Injury Network. Liver International 40: 825-829.
- Chauhan S, Joshi A, Jain R, Jain D (2019) Estimation of withanolide A in diverse genotypes of ashwagandha *Withania somnifera* (L.) Dunal. Ind J Exp Biol 57: 212-217.
- Chengappa KNR, Bowie CR, Schlicht PJ, Fleet D, Brar JS, Jindal R (2013) Randomized placebo-controlled adjunctive study of an extract of *Withania somnifera* for cognitive dysfunction in bipolar disorder. J Clin Psychiatry 74, 11: 1076-83.

Den Danske Dyrlægeforening (2013) FOLTs lommebog om forsøgsdyr. Sektion for Forsøgsdyr, Lægemidler og Toksikologi (FOLT).

Dhar RS, Verma V, Suri KA, Sangwan RS, Satti NK, Kumar A, Tuli R, Qazi GN (2006) Phytochemical and genetic analysis in selected chemotypes of *Withania somnifera*. *Phytochemistry* 67: 2269-2276.

Duke JA (1985) CRC Handbook of medicinal herbs. CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-3630-9.

EMA (European Medicines Agency) (2013) Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Public statement on *Withania somnifera* (L.) Dunal, radix. Final 9 July 2013.

EU Europa-Parlamentets og Rådets Forordning (EF) Nr. 1925/2006 af 20. december 2006 om tilsætning af vitaminer og mineraler samt visse andre stoffer til fødevarer.

Filipiak-Szok A, Kurzawa M, Szlyk E, Twaruzek M, Błajet-Kosicka A, Grajewski J (2017) Determination of mycotoxins, alkaloids, phytochemicals, antioxidants and cytotoxicity in Asiatic ginseng (ashwagandha, dong quai, panax ginseng). *Chem Pap* 71: 1073-1082.

Filipiak-Szok A, Kurzawa M, Szlyk E (2018) Simultaneous determination of isoquinoline alkaloids in medicinal Asiatic plants by ultrasound-assisted extraction and High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry with principal component analysis. *Anal Lett* 51, 16: 2575-2585.

Gajbhiye NA, Makasana J, Kumar S (2015) Accumulation of three important bioactive compounds in different plant parts of *Withania somnifera* and its determination by the LC-ESI-MS-MS (MRM) method. *J Chromatographic Sci* 53, 10: 1749-1756.

Gannon JM, Forrest PE, Chengappa KNR (2014) Subtle changes in thyroid indices during a placebo-controlled study of an extract of *Withania somnifera* in persons with bipolar disorder. *J Ayurveda Integr Med* 5: 241-5.

Ganu G, Nagore DH, Rangari M, Gupta H (2010) Pharmacological evaluation of Ayurvedic plants for aphrodisiac activity in experimental animals. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 7, 1, Article 31. DOI: 10.2202/1553-3840.1418.

Gupta GL, Rana AC (2007) Protective effect of *Withania somnifera* Dunal root extract against protracted social isolation induced behavior in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 51, 4: 345-353.

Gupta A, Mahdi AA, Shukla KK, Ahmad MK, Bansal N, Sankhwar P, Sankhwar SN (2013) Efficacy of *Withania somnifera* on seminal plasma metabolites of infertile males: A proton NMR study at 800MHz. *J Ethnopharmacol* 149: 208-214.

Ilayperuma I, Ratnasooriya WD, Weerasooriya TR (2002) Effect of *Withania somnifera* root extract on the sexual behaviour of male rats. *Asian J Androl* 4: 295-298.

Inagaki K, Mori N, Honda Y, Takaki S, Tsuji K, Chayama K (2017) A case of drug-induced liver injury with prolonged severe intrahepatic cholestasis induced by ashwagandha. *Kanzo* 58: 448-454.

Jensen HA, Arnklit F, Jensen J (2003) *Anbefalede plantenavne*. Plantedirektoratet og Gads Forlag. ISBN 87-12-04028-2.

JMPR (1999) Pesticide residues in food - 1998. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO Plant Production and Protection Paper, 148, .

Kalra R, Kaushik N (2017) *Withania somnifera* (Linn.) Dunal: a review of chemical and pharmacological diversity. *Phytochem Rev* 16: 953-987.

Kiasalari Z, Khalili M, Aghaei M (2009) Effect of *Withania somnifera* on levels of sex hormones in the diabetic male rats. *Iran J Reprod Med*. 7, 4: 163-168.

Klenow S, Latté KP, Wegewitz U, Dusemund B, Pötting A, Appel KE, Großklaus R, Schumann R, Lampen A (2012) Risikobewertung von Pflanzen und pflanzlichen Zubereitungen. 4 *Withania somnifera* (Schlafbeere). Bundesinstitut für Risikobewertung Abteilung Risikokommunikation Berlin. BfR-Wissenschaft 01/2012 ISSN 1614-3841 (Internet): 83-99.

Kumar A, Kalonia H (2007) Protective effect of *Withania somnifera* Dunal on the behavioral and biochemical alterations in sleep-disturbed mice (rid over water suspended method). *Ind J Exp Biol* 45: 524-528.

Kumar A, Abrol E, Koul S, Vyas D (2012) Seasonal low temperature plays an important role in increasing metabolic content of secondary metabolites in *Withania somnifera* (L.) Dunal and affects the time of harvesting. *Acta Physiol Plant* 34: 2027-2031.

Kushwaha S, Roy S, Maity R, Mallick A, Sonia VK, Singh PK, Chaurasiya ND, Sangwan RS, Misra-Bhattacharya S, Mandal C (2012) Chemotypical variations in *Withania somnifera* lead to differentially modulated immune response in BALB/c mice. *Vaccine* 30: 1083-1093.

Lopresti AL, Drummond PD, Smith SJ (2019) A randomized, double-blind placebo-controlled, crossover study examining the hormonal and vitality effects of ashwagandha (*Withania somnifera*) in aging, overweight males. *American Journal of Men's Health*, March-April: 1-15.

Mahdi AA, Shukla KK, Ahmad MK, Rajender S, Shankhwar SN, Singh V, Dalela D (2011) *Withania somnifera* improves semen quality in stress-related male fertility. *Evid-Based Compl Alt*. Volume 2011, article ID 576962, doi:10.1093/ecam/nep138.

Mahrous RS, Fathy HM, EL-Khair RMA, Omar AA (2018) Validated thin-layer chromatographic method for the identification and monitoring of the effect of the extraction method on the yield and phytochemical constituents of Egyptian *Withania somnifera* leaves. *J Sep Sci* 41: 518-524.

Mali PC, Chouhan PS, Chaudhary R (2008) Evaluation of antifertility activity of *Withania somnifera* in male albino rats. *Fertil Steril* 90: S18.

Malik F, Singh J, Khajuria A, Suri KA, Satti NK, Singh S, Kaul MK, Kumar A, Bhatia A, Qazi GN (2007) A standardized root extract of *Withania somnifera* and its major constituent withanolide-A elicit humoral and cell-mediated immune responses by up regulation of Th1-dominant polarization in BALB/c mice. Life Sci 80: 1525-1538.

Nielsen E, Østergaard G, Larsen JC (2008) Toxicological risk assessment of chemicals: a practical guide. s. 142. Informa Health Care USA, Inc. ISBN 978-084937265-0.

OECD (2008) OECD Guideline for testing of chemicals 407. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents.

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070684-en.pdf?expires=1523970741&id=id&accname=guest&checksum=9881D2B51AFC96A36E9657C372AC7AED>

OECD (2008) OECD Guideline for testing of chemicals 425. Acute oral toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP) <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071049-en.pdf?expires=1543486175&id=id&accname=guest&checksum=4D6A47B3437D6BB9645CE740004FD438>

OECD (2018) OECD guideline for the testing of chemicals 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en

OECD (2018) OECD guideline for testing of chemicals 414. Prenatal developmental toxicity study <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070820-en.pdf?expires=1543499147&id=id&accname=guest&checksum=43678A9787BFFCA1C815513315A506AF>

Panda S, Kar A (1997) Effects of root extract of aswgandha *Withania somnifera*, on fuction of thyroid in cockerel. Indian J Animal Sci 67: 575-576.

Panda S, Kar A (1998) Changes in thyroid hormone concentrations after administration of ashwagandha root extract to adult male mice. J Pharm Pharmacol 50: 1065-1068.

Panda S, Kar A (1999) *Withania somnifera* and *Bauhinia purpurea* in the regulation of circulating thyroid hormone concentrations in female mice. J Ethnopharmacol 67: 233-239.

Patel SB, Rao NJ, Hingorani LL (2016) Safety assessment of *Withania somnifera* extract standardized for withaferin A: Acute and sub-acute toxicity study. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine 7: 30-37.

Pati PK, Sharma M, Salar RK, Sharma A, Gupta AP, Singh B (2008) Studies on leaf spot disease of *Withania somnifera* and its impact on secondary metabolites. Indian J Microbiol 48: 432-437.

Prabu PC, Panchapakesan S (2015) Prenatal developmental toxicity evaluation of *Withania somnifera* root extract in Wistar rats. Drug Chem Toxicol 38, 1: 50-56.

Prabu PC, Panchapakesan S, Raj CD (2013) Acute and sub-acute oral toxicity assessment of

the hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* roots in Wistar rats. *Phytother Res*.27: 1169-1178.

Rasool M, Varalakshmi P (2006) Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An *in vivo* and *in vitro* study. *Vascular Pharmacology* 44: 406-410.

Regev A, Seeff LB, Merz M, Ormarsdottir S, Aithal GP, Gallivan J, Watkins PB (2014) Causality assessment for suspected DILI during clinical phases of drug development. *Drug Safety* 37 (Suppl 1): S47-S56 DOI 10.1007/s40264-014-0185-4.

Sahin K, Orhan C, Akdemir F, Tuzcu M, Gencoglu H, Sahin N, Turk G, Yilmaz I, Ozercan IH, Juturu V (2016) Comparative evaluation of the sexual functions and NF- κ B and Nrf2 pathways of some aphrodisiac herbal *extracts* in male rats. *BMC Complement Altern M* 16:318. DOI 10.1186/s12906-016-1303-x.

Sangwan RS, Chaurasiya ND, Misra LN, Lal P, Uniyal GC, Sharma R, Sangwan NS, Suri KA, Qazi GN, Tuli R (2004) Phytochemical variability in commercial herbal products and preparations of *Withania somnifera* (ashwagandha). *Curr Sci India* 86, 3: 461-465.

Sharma S, Dahanukar S, Karandikar SM (1986) Effects of long-term administration of the roots of ashwagandha (*Withania somnifera*) and shatavari (*Asparagus Racemosus*) in rats. *Indian Drugs* 23, 3: 133-139.

Sharma AK, Basu I, Singh S (2018) Efficacy and safety of ashwagandha root extract in subclinical hypothyroid patients: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *J Altern Complem Med* 24, 3: 243-248.

Sidhu OP, Annarao S, Chatterjee S, Tuli R, Roy R, Khetrapal CL (2011) Metabolic alterations of *Withania somnifera* (L.) Dunal fruits at different developmental stages by NMR spectroscopy. *Phytochem Analysis* 22: 492-502.

Siddiqui NA, Singh S, Siddiquei MM, Khan TH (2012) Immunomodulatory effect of *Withania somnifera*, *Asparagus racemosus* and *Picrorhiza kurroa* roots. *Int J Pharmacol* 8, 2: 108-114

Singh AR, Singh K, Shekhawat PS (2013) Spermicidal activity and antifertility activity of ethanolic extract of *Withania somnifera* in male albino rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21, 2, 41: 227-232.

Sreerekha MV, Patel KV, Bhatnagar R, Sriram S (2004) Distribution of total withanolides in various plant parts of ashwagandha (*Withania somnifera*) accessions as influenced by light and dark reaction cycle. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 26: 681-683.

Srivastava P, Tiwari N, Yadav AK, Kumar V, Shanker K, Verma RK, Gupta MM (2008) Simultaneous quantification of withanolides in *Withania somnifera* by a validated high-performance thin-layer chromatographic method. *J AOAC Int* 91: 1154-1161.

Srivastava A, Gupta AK, Shanker K, Gupta MM, Mishra R, Lal RK (2018) Genetic variability, associations, and path analysis of chemical and morphological traits in Indian ginseng [*Withania somnifera* (L.) Dunal] for selection of higher yielding genotypes. *J Ginseng Res* 42: 158-164.

USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System (2019). Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=102407>. Hjemmesiden blev besøgt 20. februar 2019.

Van der Hooft CS, Hoekstra A, Winther A, de Smet PA, Stricker BH (2005) Thyrotoxicosis following the use of ashwagandha. *Ned Tijdschr Geneesk* 149, 47: 2637-8.

Vinutha B, Prashanth D, Salma K, Sreeja SL, Pratiti D, Padmaja R, Radhika S, Amit A, Venkateshwarlu K, Deepak M (2007) Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* 109: 359-363.

Visweswari G, Christopher R, Rajendra W (2014) Dose-dependent effect of *Withania somnifera* on the cholinergic system in scopolamine-induced Alzheimer's disease in rats. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5, 10: 4240-4248.

Wankhede S, Langade D, Joshi K, Sinha SR, Bhattacharyya S (2015) Examining the effect of *Withania somnifera* supplementation on muscle strength and recovery: a randomized controlled trial. *J Int Soc Sport Nutr* 12: 43.

WHO (2009) Radix Withaniae. WHO monographs on selected medicinal plants. Volume 4: 373-394. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/m/abstract/Js16713e/>