تقييم مستوى التعبير الكيميائي – النسيجي - المناعي لهرمون التستوستيرون في خصى ذكور الجرذان المعاملة بخليط المستخلص الايثانولي الكحولي للحبة السوداء وبذور الفجل والحلبة .

Evaluation Immunohistochemical Expression OF Testecular Testosterone hormone in ethanol alcohol extract mixture of *Nigella sativa* , *Raphanus sativus l* and *Trigonella foenum-graecum*. Seeds Treated Male Rats.

Laila Jasim Shaebth & Samar Sahib Abbas \Technical Institute /Samawa

م. ليلى جاسم شعيبث و م.سمر صاحب عباس - المعهد التقني /السماوة – حي الجامعه – سكن الاساتذة
laylahassan256@gmail.com

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية لغرض التحقق من مستوى التعبير الكيميائي النسيجي المناعي لهرمون الشحمون الخصوي في خصى ذكور الجرذان المعاملة بخليط المستخلص لكل مما يلي مستخلص الحبة السوداء ومستخلص بذور الفجل واخيرا مستخلص الحلبة ، اجريت الدراسة الحالية في المعهد التقني السماوة للفترة من شهر اب الى شهر تشرين الاول ٢٠١٦ .

أستخدم ٤٨جرذاً ذكراً بالغاً من سلالة الوستر البيضاء نوع *Rattus norvegicus* بعمر٩٠ يوم و وزن (١٩٠±١٠غم) قسمت عشوائياً الى مجموعتين متساوتين ، تضم كل مجموعة ٢٤ جرذ وبدورها قسمت على مجاميع ثانوية بواقع 8 جرذ لكل مجموعة بحسب المدة الزمنية للتجربة التي استمرت ستة أسابيع (كل أسبوعين يتم التضحية بمجموعة من الحيوانات) ، مثلت المجموعة الأولى السيطرة إذْ تم اتباع طريقة التجريع الفموي في إعطاء حيوانات مجموعة السيطرة ١ مل من محلول الملحي الفسيولوجي يومياً في حين أعطيت مجموعة حيوانات المعاملة ١ مل من خليط المستخلص بتركيز 50 ملغم / كغم من وزن الجسم .

في نهاية كل مرحلة تجريبية تم تخدير الحيوانات باستخدام الكيتامين والزايلازين (٠,٣ و ٠,١ مل/كغم من وزن الجسم ،على التوالي) ، وأخذت منها عينات الدم لأجراء الاختبارات الهرمونية كما أخذت الخصى لغرض الدراسة النسجية وتقييم مستوى التعبير الكيميائي النسيجي المناعي للهرمونات التي ذكرت سابقاً . أظهرت النتائج ان الاختبارات الهرمونية ادت الى حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى هرمون الشحمون الخصوي في الحيوانات المعاملة في الأسبوع السادس عند مقارنتها مع السيطرة، كما وأثبتت نتائج الدراسة الكيمائية - النسجية - المناعية لأنسجة الخصى تفاعلاً مناعياً قويا في خصى الذكور لهرمون الشحمون الخصوي في خلايا لايدك المنتجة للشحمون الخصوي وخلايا سرتولي المنتجة بصورة ثانوية للهرمون تحت تأثير الهرمون اللوتيني .

نستنتج من نتائج الدراسة الحالية ان تجريع الحيوانات بخليط المستخلص بجرعة 50 ملغم /كغم من وزن الجسم له فعالية واضحة في تحسين خصوبة الذكور من خلال زيادة مستويات الهرمونات الجنسية ومعايير الخلايا المنتجة لها وظهر هذا التحسن في نهاية الأسبوع الثاني و أستمرت لنهاية التجربة وكانت أفضل نتيجة في الأسبوع الأخير من التجربة .

Abstract

The present study has been designed to investigate the level expression immunohistochemical to the testosterone hormone in the testes of male rats treated mixture of *Nigella sativa* , *Raphanus sativus* and *Trigon foenum graecum l.* Seeds The study has been conducted on adult male rats at the Technical institute in Samawa from (8 - 10-2016).

Forty eight mature male Wistar rats (aged 90 days and weighted (190±10g) have been randomly assigned to two equal groups (24 each), control (C) males were orally gavaged with drinking water daily for 6 weeks, treated(T) males were orally gavaged with mixture of

Nigella sativa , *Raphanus sativus* and *Trigon foenum graecum l.* Seeds extract 1ml (50 mg/ kg b. w.) daily for 6 weeks. At the end of each treated and control subgroup period, males were anaesthetized (by injection of 0.3ml ketamine + 0.1 ml of xylazine/ kg b. w. *ip*), dissected of rats and taken of samples (Testes) for histological studies and the study of immunohistochemical and weighted Testes, At the end of each experimental period, results showed a significant increase ($P < 0.05$) in the results of hormonal tests showed to get significantly increase ($P < 0.05$) Testosterone hormone in the treatment of animals in the weeks compared with the control .

The results of the study demonstrated the immunohistochemical to the Testes males showed strong immune reactions Testosterone hormone in leydig's cells and produced by Sertoli byproduct of the hormone under the influence of luteinizing hormone .

It can be concluded that mixture of *Nigella sativa* , *Raphanus sativus* and *Trigon foenum graecum l.* Seeds (50 mg/ kg b. w.) has effective and clear in improving male fertility by increasing sex hormone levels and measurements produced her cellular levels and the appear of this improvement at the end of the (3) weeks and continued for the end of the experiment was the best result in the last week of the experiment.

الكلمات المفتاحية: الحبة السوداء، الحلبة، بذور الفجل، هرمون الشحمون الخصوي.

Key words: *Nigella sativa* , *Raphanus sativus l* , *Trigonella foenum-graecum* , Testosterone.

المقدمة

تعتبر النباتات الطبية من اولى المواد والاشياء التي تستخدم منذ قديم الزمان لغرض علاجات الحالات المستعصية كحالات علاج العقم وغيرها. الحبة السوداء هي بذور صغيرة الحجم كبيرة الفائدة وعظيمة النفع ، بما حباها الله تعالى من خصائص طبية في تكوينها . وقد ارشد رسول الإنسانية محمد (صلى الله عليه واله وسلم) إلى عظيم فضلها وعموم نفعها ، كما عرف قدماء المصريين الحبة السوداء منذ أكثر من 2000 سنة ق . م ، إذ كانوا يعالجون مرضاهم عندما كان العلاج يعتمد على خبرة الإنسان قبل اعتماد الطب التجريبي [1].

نبات زهري عشبي حولي قائم يبلغ طولها 20 – 90 سم ، الأوراق Leaves تكون دقيقة التقسيم ، خيطية دقيقة Threadlike ، مركبة ، مجزأة تجزئة دقيقة ، صغيرة ممدودة وتكون ناعمة ورقيقة ، مفصصة تفصيصاً عميقاً والفصوص خيطية رمادية . الأزهار Flowers نجميه وخنثيه عادة تتلون بألوان الأبيض ، الأصفر، الوردي ، الأزرق الشاحب أو الأرجواني الشاحب ، البتلات Petals تتكون من (5 - 10) . أما الثمار Fruits , فتكون كبيرة وعلى شكل كبسولة مضخمة Inflated Capsule مكونة من (3 -7) حويصلات كل واحدة تحتوي أعداد هائلة من البذور تمتلك البذور رائحة عطرية مميزة وذات مذاق مر ، وهي الجزء المهم من النبات المستعمل طبياً [2].

كذلك تمتلك بذور الفجل خصائص طبية كثيرة، ويتم زراعة بعض الأصناف من أجل بذورها، يحتوي الفجل على مجموعة كبيرة من العناصر الغذائية الهامة للصحة، مثل: الكربوهيدرات، والسكريات، والبروتينات، والألياف الغذائية، والفيتامينات

مثل فيتامين ج، ومجموعة فيتامين ب، والريبوفلافين، وحمض البانتوثنيك، والمعادن مثل الحديد، والفسفور، والمغنيسيوم والزنك، والبوتاسيوم، والفلوريد، وكمية قليلة من الدهون كذلك تعالج العقم عند الرجال وذلك بزيادة إنتاج الحيوانات المنويّة عند الرجال.. تنشط المبايض، وتنظم إفراز هرمونات الحمل. كذلك اوصى قدماء العرب باستخدام نبات الحلبة في التداوي من كثير من الامراض لما تحتوي الكثير من المواد المهمة في عمليات المساعدة في تنشيط الحيوانات المنوية وتنشيط الخلايا المنتجة لها [3,4].

الهرمونات الجنسية تسمى الأندروجينات الذكرية Androgens أو هرمونات الذكورة Musculrnicing Hormones تتكون في الخصى Testes وقشرة الغدة الكظرية Adrenal cortex وبكميات اقل في المبايض Ovaries التراكيب الرئيسة للأندروجينات هي الشحمون الخصوي(التستوستيرون) Testosterone ، الأندروستيرون Androstenedion و ديهايدرو- 3 بيتا – اندروستيرون Dehydro-3B-Androsterone في الظروف العادية يحتوي دم الذكور على تراكيز كبيرة من هذه الهرمونات أكثر من دم الإناث [5]. ركز الباحثون المهتمون في العلاقة بين الهرمونات الجنسية الذكرية Androgens والرغبة الجنسية Sexual Desire بصورة اساسية على هرمون الشحمون الخصوي لأنه أكثر قوة من الهرمونات الجنسية الذكرية الأخرى إذ يوجد بشكلين هما غير المرتبط او الحر Free والشكل المرتبط Bound وكلا الشكلين يوجد في الدم والإدرار . النسبة الكبيرة من هذا الهرمون يوجد بالشكل المرتبط حوالي 96 - 98 % يكون مرتبط مع بروتين الكلوبيولين Sex Hormone - Binding Globulin (SHBG) والألبومين لذا لا يكون مناسب لدخول خلايا الهدف وتنبيه الأفعال الحيوية . اما الشكل الغير المرتبط أو الحر من الهرمون فهو الجزء المناسب للأنسجة الهدف[6]. هرمون الشحمون الخصوي الحر Free Testosterone Hormone من المركبات الهرمونية الأكثر فائدة لتقيم التأثيرات للأندروجينات أو علاقة الاستجابة الجنسية . الجزء المرتبط من الشحمون الخصوي ببروتين الألبومين Albumin يستطيع فك الارتباط ليكون الشكل الحر (هرمون الشحمون الخصوي النشط)[7].

المواد وطرائق العمل

تحضير المستخلصات Preparation Of Ethanolic extracts

اخذ ٢٠ غم من المسحوق لكل نبات وتم استخدام جهاز الساكسوليت باستخدام الايثانول ٧٠% لمدة ٢٤ ساعة ، ثم اخذ المستخلص ووضع في اطباق بتري وجففت في الفرن ٤٠ م لمدة ٤٨ ساعة بعد ذلك يحفظ المستخلص بدرجة حرارة ٤ م لحين الاستخدام[8].

الأختبارات الهرمونية Hormonal Test

تقدير تركيز هرمون التستوستيرون(nmol/L) نانومول /لتر في المصل

تم تقدير تركيز هرمون الشحمون الخصوي في المصل باستخدام جهاز Elisa وبحسب العدة المُصنّعة من شركة (US Biological, USA).

تحضير الشرائح النسجية : - حضرت المقاطع النسجية اعتمادا على طريقة[9] .

تقنية الكيميائية – النسجية – المناعية : Immunohistochemistry – Paraffin protocol (IHC)

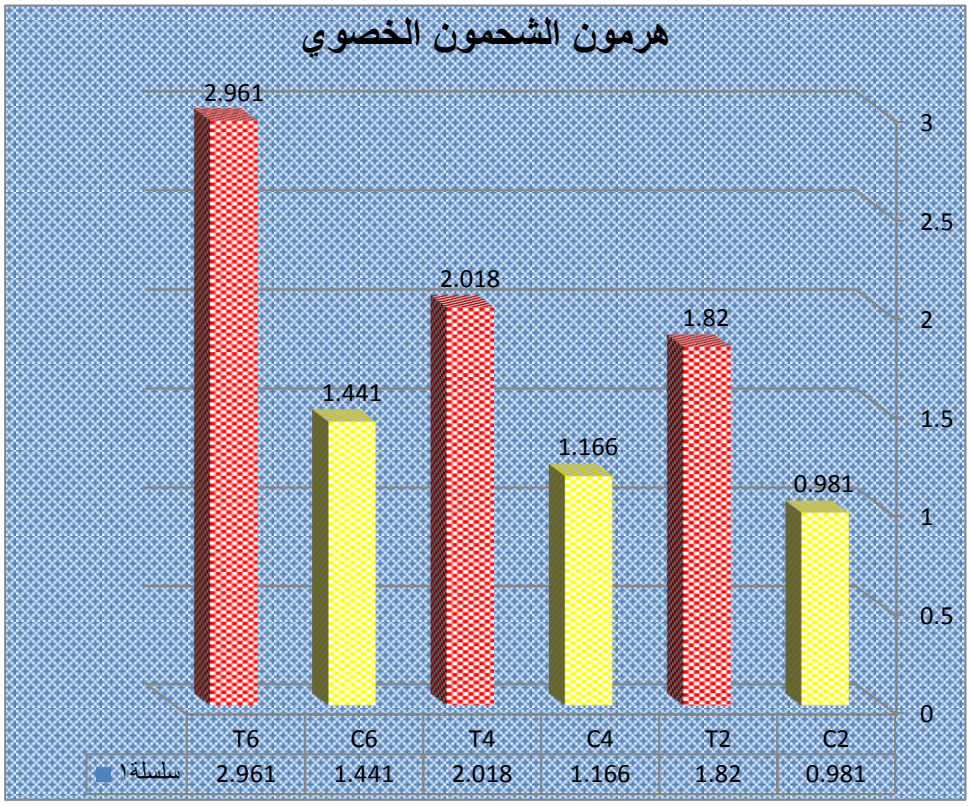
طبقاً لتعليمات الشركة المصنعة (US Biological ; [www.Biological.com/technica]) تعد تقنية الكيمائية النسجية المناعية أو (IHC) طريقة لإثبات مواقع تواجد البروتينات في المقاطع النسجية Tissue Section .على الرغم من قلة حساسيتها من الناحية الكمية مقارنةً مع المقاسات المناعية مثل Western Blotting أو ELISA ، الا انها تتمكن من مراقبة العمليات في سياق الأنسجة السليمة ، بشكل عام النتائج التي يتم الحصول عليها من IHC مع نتائج المجهر المختبري يوفر الصورة التي تساعد على فهم البيانات التي تم الحصول عليها . يتم اجراء التصبيغ المناعي Immunostainingمع الأجسام المضادة Antibodies التي تتعرف على البروتين الهدف المستضد ، لان الأجسام المضادة تكون عالية التخصص للغاية ، تفاعل الجسم المضادة مع المستضد Antibodies - Antigen يكون أكثر

وضوحيه بأستعمال كواشف التحقق اللوني ، والتي فيها يرتبط الإنزيم بتجويف الجسم المضاد Antibody لإنتاج الرواسب اللونية في موقع البروتين ، أو الكشف الفلورسنت ، التي يتم تصريفها في Fluorophore إلى الضد ، ويمكن أن تكون الأجسام المضادة Antibody مصورة بأستخدام المجهر فلورسنت.

النتائج

هرمون الشحمون الخصوي

أدت معاملة الحيوانات بخليط المستخلصات النباتية الى ارتفاع معنويا ($P<0.05$) بمعدل مستوى تركيز هرمون الشحمون الخصوي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة في مراحل الدراسة الثلاث ، اذ بلغت المعدلات لمجموعتي التجربة في الأسبوع الثاني (1.820 ±0.014) اما مجموعة السيطرة (0.981±0.01) وفي الأسبوع الرابع (2.018±0.185) اما مجموعة السيطرة (1.166±0.016) وفي الأسبوع السادس (2.961±0.014) اما مجموعة السيطرة (1.441±0.012) نانوغرام /مل . وعند اجراء المقارنة بين الفترات لكل مجموعة بينت النتائج ان هنالك ارتفاعاً معنوياً ($P<0.05$) بين الفترات لكل مجموعة معاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة (الشكل١).



شكل رقم ١ يبين مستوى هرمون الشحمون الخصوي في مجاميع الدراسة في ثلاثة مراحل زمنية

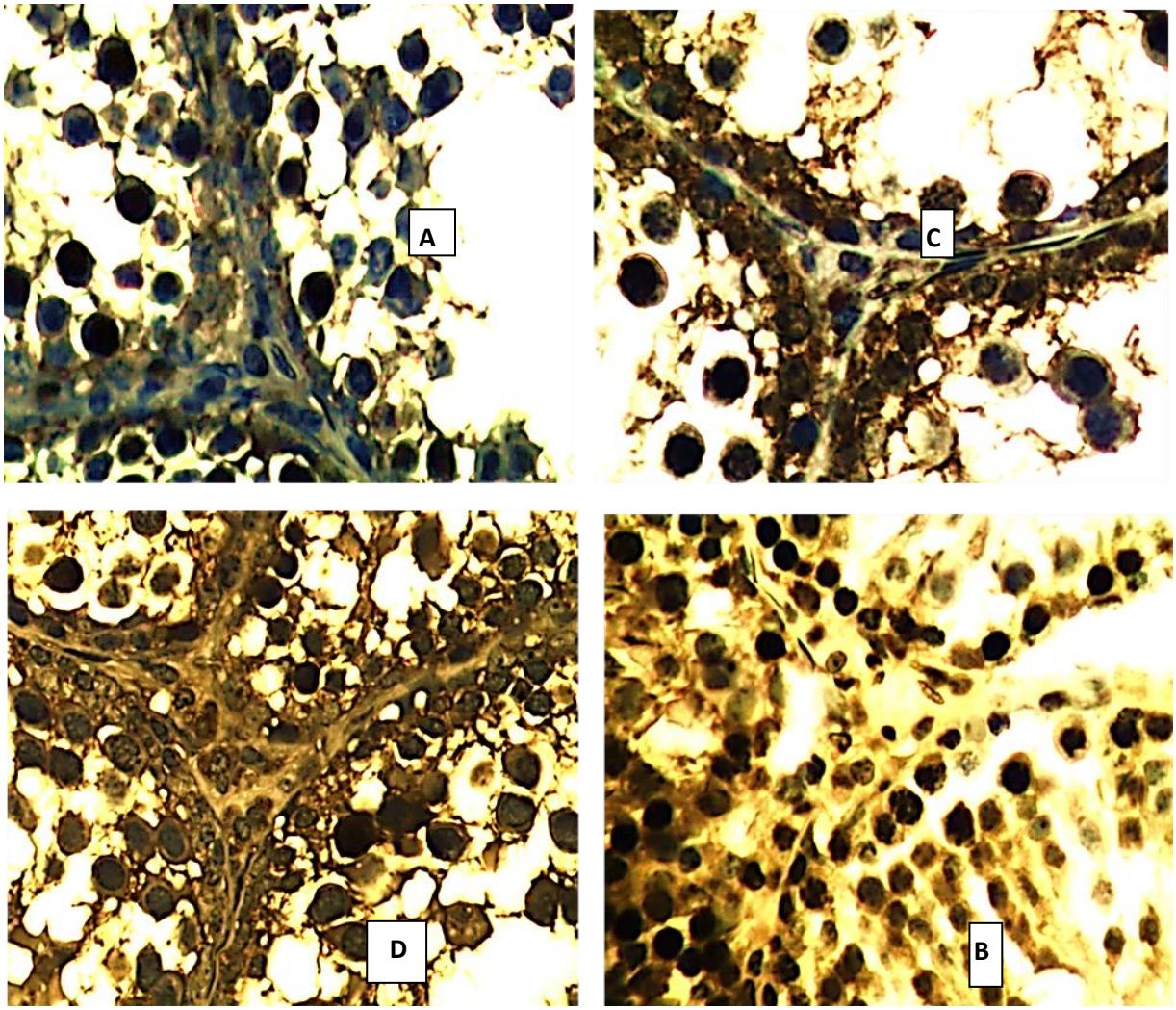
الدراسة النسجية الكيميائية المناعية Immunohistochemical Study

تعبير هرمون الشحمون الخصوي T في انسجة الخصى

أظهرت النتائج الكيميائية النسجية المناعية لهرمون الشحمون الخصوي في انسجة الخصى لذكور الجرذان المعاملة بخليط المستخلصات الثلاثة والذي يتركز في خلايا لايدك وخلايا سرتولي .وقد ظهرت قوة وكثافة التفاعل المناعي الايجابي

لخلايا لايدك في الأسبوع الثاني والرابع والسادس لمجاميع المعاملة ،بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي أظهرت ضعف في قوة وكثافة التفاعل المناعي بالمقارنة مع المجاميع المعاملة، اما بالنسبة لخلايا سرتولي فقد اظهرت قوة وكثافة التفاعل المناعي الايجابي في المجاميع المعاملة بالمقارنة مع مجاميع السيطرة التي اظهرت ضعفا في قوة وكثافة التفاعل المناعي ،إذ ان الخلايا المنتجة لهرمون الشحمون الخصوي تكون تحت تأثير الهرمون اللوتيني والذي يفرز بشكل ثانوي من خلايا سرتولي (الشكل٢).

شكل ٢ يبين شدة التفاعل الكيميائي النسيجي المناعي لهرمون الشحمون الخصوي في مجموعة السيطرة مع المجاميع الاخرى المجرعة بخليط المستخلص النباتي لثلاثة فترات زمنية.



المناقشة :

أظهرت الدراسة وجود زيادة معنوية في مستوى هرمون الشحمون الخصوي في المجاميع المعاملة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة كما في الشكل (١) وان هذه الزيادة تعود لتأثير المادة المستخدمة في الدراسة على مسارات تخليق الهرمونات الستيرويدية إذْ يعتقد ان لها دور في بناء الكولسترول الذي يعتبر وحدة البناء الاساسية لهرمون الشحمون الخصوي . ان عملية انتاج هرمون الشحمون الخصوي تتم في خمس خطوات تبدا بتحويل جزيئة الكولسترول وهي الوحدة الاساسية في تركيب هذا الهرمون الى Pregnenolone والذي يتحول في نهاية الخطوات الى هرمون الشحمون الخصوي[10,11]. وهذا يتفق مع ما اشار اليه [12] إذْ لاحظ وجود زيادة معنوية في مستوى هرمون الشحمون الخصوي للذكور عند دراسة تأثير التجريع بخليط المستخلص النباتي(الحبة السوداء) في بعض المعايير الفسلجيه والتكاثرية والنسجية

للجرذان كذلك هذا ماشار اليه العالم[13] واخرون حيث بين ان بذور الفجل تعمل كمضاد اكسدة قوي جدا مماتساعد في اعادة تكوين الانسجة والخلايا المتضررة وبالتالي زيادة نشاط الخلايا المنتجة للنطف وبالتالي زيادة هرمون الشحمون الخصوي. اما بالنسبة لمستخلص الحلبة فانه يعتبر من اهم المستخلصات التي تستخدم في تحسين الكفاءة التناسلية في الذكور والاناث لما تحتويه من مواد فعالة ، حيث اثبت العالم [14] ان نبات الحلبة ذات تأثير فعال في زيادة مستويات هرمون الشحمون الخصوي لما تحتويه من مواد فعالة تعمل على تثبيط الانزيمات المسؤولة عن تحطيم هرمون الشحمون الخصوي وبالتالي ارتفاع مستواه في الدم وكذلك في منطقة الانتاج.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تعبيراً عالياً لهرمون الشحمون الخصوي المنتج من خلايا لايدك للذكور المعاملة بخليط المستخلص انباتي على مدد التجربة وبدأت الزيادة في الاسبوع الثاني واستمرت الى نهاية التجربة. ان كثافة التفاعل المناعي ازدادت في الاسبوع السادس إذ كانت كمية هرمون الشحمون الخصوي المنتجة اكبر من كميته في باقي المجاميع وان قوة هذا التفاعل تعود الى ارتباط الجسم المضاد للشحمون الخصوي مع المستضد (هرمون الشحمون الخصوي) الموجود في خلايا لايدك بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي تظهر التصبيغ المناعي لكن بصورة اقل . وهذا يتماشى مع ما جاء به [15] عند دراسته التصبيغ المناعي لهرمون الشحمون الخصوي والخلايا الجرثومية الاولية في خصى الضفادع *Rana catesbeiana* اذ أكد ان هرمون الشحمون الخصوي يفرز من قبل الخلايا البينية للخصية في كل الحيوانات ولاحظ عند استخدام التفاعل المناعي لخلايا لايدك وجود تفاوت في شدة التفاعل . إذ وضح ان قوة التفاعل المناعي تزداد حسب مواسم السنة إذْ تكون قوة التفاعل في موسم التناسل (الصيف) قوية للخلايا البينية المنتجة للهرمون بالمقارنة مع الشتاء التي تكون قوة التفاعل فيه ضعيفة لقلة كمية الهرمون وكذلك في موسم الربيع والخريف [15] كما ان نتائج الدراسة الحالية كانت متوافقة مع ما أشار اليه[16] الذي اكد على تأثير الحبة السوداء في تحسين ووقاية المعاير الخصوية ورفع مستوى الهرمون الشحمون الخصوي في الجرذان كما وقد بين العالمين [17, 8]ان بذور الفجل تعمل كمضاد اكسدة قوي لما تحتوية من انزيم الكلوتاثايون الذي يعتبر مضاد اكسدة قوي ويعتبر خط الدفاع الاول ضد ال MDA الذي يعتبر من اهم العلامات على وجود ضرر في الخلايا من هذا نلاحظ ان بذور الفجل ذات مفعول قوي جدا في تحسين فعالية الخلايا وكثرتها في مناطق الجسم وخاصة منطقة الخصى والتي تؤدي الى زيادة فعالية الخلايا المنتجة لهرمون الشحمون الخصوي.

اما بالنسبة لمستخلص الحلبة فانه يعتبر من اهم المستخلصات التي تستخدم في تحسين الكفاءة التناسلية في الذكور والاناث لما تحتويه من مواد فعالة ، حيث اثبت العالم [14] ان نبات الحلبة ذات تأثير فعال في زيادة مستويات هرمون الشحمون الخصوي لما تحتويه من مواد فعالة تعمل على تثبيط الانزيمات المسؤولة عن تحطيم هرمون الشحمون الخصوي وبالتالي ارتفاع مستواه في الدم وكذلك في منطقة الانتاج.

الاستنتاجات :

نستنتج مما سبق ان لكل مستخلص نباتي من خليط التجريع له تأثير معين وفعالية مهمة في زيادة مستوى هرمون الشحمون الخصوي في الجرذان وبالتالي زيادة الكفاءة التناسلية فيها وكذلك زيادة فعالية الخلايا المنتجة لهذا الهرمون المهم في العملية التناسلية.

المصادر

1-The Ancient Elixir. (2003) . The Blessed Seed , *Nigella sativa* , Black Cumin . www.Nigella sative.com .

2- Aftab, **A.; Asif, H.; Mohd, M.; Shah, A.K.; Abul , K.N.; Nasir, A.S.; Zoheir, A.D.; & Firoz , A. (2013) .** A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb . Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine , 3 Suppl.(5) : 337-352 .

3- Murakami, A. ; Ohigashi, H. ; Tanaka, S. ; Tatmatsu, A. & Koshimizu,K. (1993). Bitter cyanoglycosides from Lophiraalata . phytochemistry, 32 : 1461 – 1466 .

4- Yoshikawa, M. ; Murakami, T. ; Kamatsu, H. ; Murakami, N. ; Yamahara, J. & Mastuda, H. (1997). Medicinal food stuffs. IV. Fenugreek seeds .(1): structures of trigoneosides Ia , Ib , IIb , IIIa and IIIb , new furosanol saponins from the seeds of Indian *Trigonella foenum graecum* L. Chem. Pharm. Acol. Bull. 45 : 81 – 87.

5- Regan, P.C. (1996). Rhythms of desire : The association between menstrual cycle phases and female sexual desire . the Canadian Journal of Sexuality , 5, 145-156.

6- Itoh, N.; Kumamoto, Y.; Akagashi, K.; Maruta, H.; Tsukamoto, T.; Umehara, T.; Mikuma, N.; Yamaguchi, Y.; Nanbu, A.; & Suzuki, N. (1991) . The assessment of bioavailable androgen levels from the serum free testosterone level. Nippon Naibunpi Gakki Zasshi, 67, 23-2 2 .

7-Regan, P.C.; & Berscheid, E. (1999). Lust: What We Know About Human Sexual Desire . Newbury Park , CA: Sage.

8-Halliwell, B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human diseases:curiosity, cause or consequence. Lancet 344, 721-724.

9-Luna, L.G.(1968)Manual of histologic staining methods for the armed force institute of Toronto, London, pathology 3rd ed .,Mc Graw Hill book Company , NY, 12-31.

10- Turek , P. J.(2005). Endocrine evaluation: Hypothalamic – Pituitary Gonadal (HPG) Axis and control of spermatogenesis. Available awww.urology.ucsf.edu.

11- Ganong, W.F. (2005) . Review of Medical Physiology. 22 ed. Langg medical Book / Mc Graw Hill . University of California. Sanfrancisco.

12- Juma , F.T.; & Abdulrahman , H.M.A.(2011) . The effects of *Nigella Sativa* oil administration on some physiological and histological values of reproductive aspects of rats , Iraqi J. Vol . Med . 35 (2): 52- 60.

13-Sipos, P. Hagymasi, K. Lugasi, A., Feher, E., Blazovics, A.2002. Effects of black radish root (*raphanus sativus* l. var niger) on the colonmucosa in rats ted a tat rich diet. Phy. Res. 19, 677-679.

14-Steels E, Rao A, Vitetta L. 2011. Physiological aspects of male libido enhanced by standardized Trigonella foenum-graecum extract and mineral formulation. Sep;25(9):1294-300.

15-Sasso-Cerri , E.; Freymüller, E. ; Miraglia. S . M . (2005). Testosterone – immunopositive primordial germ cells in the testis of the bullfrog Rana, catesbeiana. Anatomical Society of Great Britain and Ireland .206 pp519–523.

16- Haseena, S.; Aithal ,M.; Das, K.K.; Saheb. H.S.(2015). Effect of *Nigella Sativa* seed powder on Testosterone and LH levels in Sterptozotocine induced diabetes male *Albino* Rats. J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 7(4), 234-237.

17-Chance, B. sies,H., Boveris,A. 1979. Hypodroperoxide metabolism in mammalian organs. Phy. Rev.59, 527-605.