Ministry of Higher Education & Scientific Research
Al-Qadisiya University
College of Science
Department of Biology

Effect Of Thymoquinone On Reproductive Potency In Mature Male Rate .

A Thesis
Submitted to the Council of the College of Science, Al-Qadisiya University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science In Biology/ Zoology

BY
Muna Sabah AL-Khafaje
B. Sc.
2009

Supervision

Dr. Wijdan .T. M. AL- Tameemi
Assistant professor

February / 2016 **1437** هـ

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

تأثير الثايموكوينون على الكفاءة التناسلية لذكور الجرذان الناضجة .

رسالة مقدمة الى

قسم علوم الحياة / جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات نيل شهادة

ماجستير علوم حياة / علم الحيوان

من قبل

منى صباح محمود الخفاجي

بكالوريوس علوم حياة

2009

إشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة وجدان ثامر مهدي التميمي

جمادى الأولى /1437 هـ شباط / 2016 م

الخلاصـــــة

تهدف الدراسة الحالية الى التحري عن تأثير تجريع الثايموكوينون على الكفاءة التناسلية في ذكور الجرذان الناضجة ، إذ أجريت الدراسة الحالية في كلية الطب البيطري / جامعة القادسية للمدة الممتدة من 15 /10 - 15 / 4 / 2015 . وقد تم تقييم مدى هذا التأثير لمعلق الثايموكوينون باعتماد بعض المعايير التي اشتملت عليها الدراسة .

تم تقسيم 48 جرذاً ذكراً بالغاً من سلالة الوستر البيضاء نوع *Rattus norvegicus* بعمر60 يوم و وزن 120-122غم عشوائياً الى مجموعتين متساوتين , ضمت كل مجموعة 24 جرذ جرعت الأولى (السيطرة) ماء الشرب وجرعت الثانية (المعاملة) معلق الثايموكوينون بجرعة 50 ملغم / كغم من وزن الجسم . و قسمت كل مجموعة الى ثلاث مجاميع ثانوية بواقع 8 جرذان لكل منها بحسب المدة الزمنية للتجربة التي استمرت ستة أسابيع (كل أسبوعين يتم التضحية بمجموعة من الحيوانات) .

في نهاية كل مرحلة تجريبية تم تخدير الحيوانات باستخدام الكيتامين والزايلازين (0.3 و 0.1 مل/كغم من وزن الجسم ,على التوالي) , مع مراعاة أخذ وزن الجسم لكل جرذ وأخذت منها عينات الدم لإجراء الاختبارات الهرمونية كما أزيلت الخصى والغدة النخامية وتم تسجيل وزنها وأخذت عينات منها لغرض الدراسة النسجية وتقييم مستوى التعبير الكيميائي النسيجي المناعي للهرمونات المدروسة . أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدل الكسب الوزني للجرذان المعاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة وكذلك زيادة معنوية في معدلات أوزان النخامية والخصى النسبية وخصوصاً في المجموعة الثانوية الثالثة بعد مرور ستة أسابيع .

كما أشارت نتائج الاختبارات الهرمونية الى حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في مستوى الهرمون محفز للجريب والشحمون الخصوي وإنخفاض معنوي في مستوى الهرمون اللوتيني في الحيوانات المعاملة في الأسبوع السادس عند مقارنتها مع السيطرة في حين سجل في الاسبوع الثاني والرابع زيادة معنوية بالمقارنة مع السيطرة .

أظهرت نتائج التغيرات النسجية في الخصية وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدل أقطار النبيبات ناقلة المني لحيوانات المعاملة بالمقارنة مع السيطرة , إذا بلغ في الأسبوع السادس (352.87± 2.183) مايكروميتر مقارنة مع السيطرة (303 ±5.255) مايكروميتر في حين كان سمك النبيب في نفس الأسبوع للمعاملة (121.625 ± 1.657) والسيطرة (85.375 ±1.802) مايكروميتر , و زيادة في معدلات إعداد خلايا لايدك وخلايا سرتولي ضمن الخصى التي بلغت معدلاتها (25.12 ± 0.71 , 29.75 ±1.12) خلية على التوالي, مقارنة مع معدلات السيطرة (

19.12 ± 0.35 , 20.12 ± 0.22) خلية . كما أظهرت النتائج تحسن الخلايا الفارزة لمحرضات القند Gonadotrophs في المقاطع النسجية للنخامية علماً إن أغلب النتائج أظهرت تفوق مجموعة الأسبوع السادس على بقية المجاميع .

بينت نتائج الدراسة الكيمائية - النسجية - المناعية لأنسجة النخام الغدي تفاعلاً مناعياً إيجابياً للهرمون اللوتيني وهرمون المحفز الجريب في الخلايا المحرضة للقند , إذ تزداد شدة الكثافة تدريجياً لهرمون المحفز الجريب مع تقدم مدة المعاملة بالمقارنة مع السيطرة التي أعطت تفاعلاً اقل كثافة في الخلايا الفارزة لمحرضات القند . فيما كانت النتائج شدة كثافة التفاعل للهرمون اللوتيني أعلى في الأسبوع الثاني والرابع في حين كان التفاعل ضعيفاً في الأسبوع السادس مقارنة مع مجاميع المعاملة والسيطرة إذ إن الحيوانات المعاملة بمعلق الثايموكوينون أظهرت أعداد عالية من الخلايا المتفاعلة مناعياً مع الصبغة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة . كما وأظهرت نتائج الكيمائية – النسجية – المناعية لأنسجة خصى التفاعل المناعي القوي للهرمون الشحمون الخصوي في خلايا لايدك المنتجة للشحمون الخصوي .

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

1: المقدمة Introduction

يحتوي جسم ذكور اللبائن على غدتين تكاثريتين هما الخصيتان Testes , حيث تعتبر غدة تكاثرية مزدوجة الوظيفة حيث تعتبر غدة خارجية الإفراز من خلال انتاج النطف وداخلية الإفراز من خلال إنتاج الهرمونات الجنسية الذكرية الضرورية للمحافظة على الصفات الجنسية الذكرية الثانوية وتتم السيطرة على وظيفتها بواسطة ميكانيكية التغذية الاسترجاعية السلبيةNegative Feedback من قبل غدة تحت المهاد والغدة النخامية وهذه الالية تنظم تحرر الهرمونات المحفزة للمناسل او المحرضة للقند Gonadotropins وهما الهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني وهما من الهرمونات الرئيسة المنظمة لعملية تكوين النطف في الذكور McLachlan *et al*., 2002; (Sharpe ,1994; Weinbauer &Nieschlag., 1993).

تتضمن خصوبة الذكور إنتاج عدداً كافياّ من النطف ذات الحركة الطبيعية بمساعدة الاعضاء الجنسية الملحقة في إنتاج وتركيز السائل المنوي لتفعيله وجعله مؤهلاً لعيوشية النطف إن عملية نشأة النطف في الخصيتين تتم تحت سيطرة عصبية صمية التي تبدأ بالدماغ من قبل محور المهاد -

النخامي - القندي Hypothalamic - Pituitary- Gonadal Axis (HPG) (Lucio *et al.*, 2005; Tyl, 2001) . حيث يسيطر هذا المحور بشكل رئيس على التكاثر في الذكور , ويبدأ التطور في كل مكونات هذا المحور ليكتمل وينتج وحدة عصبية صمية Neuroendocrinal unit وظيفته تنظم العمل خلال البلوغ للسيطرة على وظائف الخصية المتمثلة بتكوين النطف من خلال بناء الستيرويدات Steroidogenesis وتأثيرها في كل الاعضاء الجنسية (Skinner& , 2006 Ojeda) .

إنَّ السيطرة الصميه لعملية تكوين النطف وإنتاج الستيرويدات في الخصية تعود لعمل هرمونات الغدة النخامية على الخلايا الموجودة ضمن الخصية المتمثلة بخلايا لايدك وخلايا سرتولي (Ivell *et al.*, 2014). ينتج الفص الامامي للغدة النخامية هرمونين هما الهرمون اللوتيني LH والهرمون المحفز للجريب FSH (Plant , 2008) . ان وظيفة الهرمون المحفز للجريب في الذكور يكون ضروري لتحفيز التكاثر , حيث يعمل على خلايا سرتولي بينما يلعب هرمون اللوتيني دوراً مهماً في تحفيز خلايا لايدك لإنتاج الهرمونات الذكرية Androgen وإفرازها والمتمثل بـ هرمون الشحمون الخصوي Testosterone (Silverthron *et al.*, 2010; Melamed , 2010) . يعد هرمون الشحمون الخصوي هرمون المناسل الرئيس المسؤول عن تطور وادامة الخصائص الجنسية الذكرية الثانوية (Forbes & Dahl, 2010; Sisk & Zehr,2005) .

يعد الثايموكوينون Thymoquinone (TQ) مركب كيميائي نباتي طبيعي عزل من زيت بذور الحبة السوداء (حبة البركة) *Nigella sativa* , وهي احدى النباتات الزهرية التي تنتمي للعائلة الشقيقية Ranunculaceae (Ali *et al* ., 2009) . ويعتبر الثايموكوينون المكون الرئيس لحبة السوداء ، يشكل نحو 50 % من الزيوت الطيارة . استخدمت البذور والزيوت العطرية في الطب الشعبي التقليدي لمدة طويلة وكعلاج عشبي للعديد من الأمراض . يمتلك الثايموكوينون خصائص علاجية مهمة مثل : المسكنات ، مضاد للألتهابات ، وحماية الأجهزة ضد ضرر الاجهاد التأكسدي بالإضافة إلى أن له خصائص المضادات الحيوية (Lupidi *et al* ., 2010) . استخرج الثايموكوينون الذي تعود أصوله الى جنوب غرب اسيا لأول مرة عام 1963 على يد EL-Dakhakhany .

ويعمل الثايموكوينون على تنبيه الوظائف الحيوية بواسطة تعديل او تحوير العمليات الحيوية والكيمائية والمتضمنة تولد الأوكسجين الفعال ROS في كل من الخلايا الطبيعية والسرطانية حيث يعمل كمضاد للأكسدة (Dergarabetian *et al*., 2013 ; Salmani *et al*., 2014) . ان فعاليته المضادة للأكسدة Anti - oxidant تحمي الاعضاء من ضرر الأكسدة الناتجة من توليد الجذور

الحرة (Chandra *et al*., 2009; Butt & Sultan , 2010) . كذلك يساعد في إعادة تكوين عملية نشأة النطف Spermatogenesis بعد إصابة الخصية (Kanter, 2011) .

الهدف من الدراسة :

هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن التأثيرات الايجابية التي من الممكن أن يؤديها تناول معلق الثايموكوينون في معايير خصوبة ذكور الجرذان الناضجة من خلال دراسة مستوى التعبير الكيميائي النسجي المناعي للهرمونات المحرضة للقند (الهرمون اللوتيني والهرمون محفز الجريب) في النخام الغدي والشحمون الخصوي في الخصى .

2. استعراض المراجع Review of Literature

1.2. وصف الحبة السوداء *Nigella sativa*

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 (Aftab *et al.*, 2013).

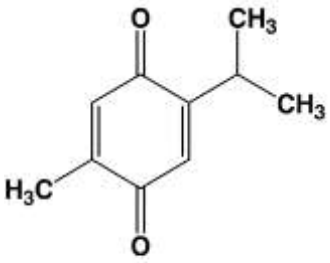
الاسم العلمي لها *Nigella sativa* التي تعود لعائلة الشقيقات *Ranunculaceae* تعرف محليا بالكمون الأسود Black Cumuin أو الحبة السوداء Habbah Al- Sauda والتي استعملت لسنوات عديدة كتوابل Spice أو كمادة حافظة للطعام . أشير حديثاً إلى العديد من الفعاليات الحيوية لحبة البركة إذ تكون مضادات الأكسدة Antioxidant , و مضادات للالتهابات Anti-inflammatory , و مضادات السرطان Anticancer , و مضادات الميكروبات Antimicrobial و مضادات الفطرية Antifungal . نسبت العديد من تأثيرات الدوائية إلى المكونات الفعالة لحبة البركة *N. sativa* والتي تتضمن الثايموكوينون Thymoquinone , و ثايموهايدروكوينون Thymohydroquinone , والداي الثايموكوينون Dithymoquinone , و ثايمول Thymol , الكارفاكرول Carvacrol , و النيجلسين Nigellicine , النيجليدين

Nigellidine و Nigellimine - x- oxide و الفا هيبارين Alpha – Hedrin (*al*.; 2012 Entela *et*) .

2.2. الثايموكوينون Thymoquinone (TQ)

يعد الثايموكوينون TQ المركب الرئيس الفعال في الحبة السوداء *Nigella sativa* ويشكل حوالي 30 % من الزيوت الطيارة Volatile Oil العديد من الآثار الدوائية التي ذكرت في الحبة السوداء تعود للثايموكوينون Thymoquinone (Badary *et al*., 2001) . حيث كشف جهاز (HPLC) عند تحليل الزيوت العطرية للحبة السوداء ان المكونات النشطة الرئيسة كانت داي ثايموكوينون ، و ثايموهيدروكوينون ، و الثايمول وكان من بين المركبات التي تم تحديدها الثايموكوينون TQ هو الأكثر وفرة والذي يشكل 48 - 30 % من إجمالي المركبات .

تعزى بشكل رئيسي معظم الخصائص العلاجية للبذور الكاملة أو مستخلصاتها الى الكوانين Quinine الذي يشكل مركب الثايموكوينون TQ وهو الأكثر وفرة في البذور ويشكل المكون الأكثر فعالية ونشاط دوائيا في الحبة السوداء (Moussa, & Al- Mulhim, 2013) . إذ تحتوي البذور على نوعين من الزيوت هي الزيوت الثابتة Fixed Oils , والزيوت الاساسية Essential Oil , و بروتينات Proteins , و قلويدات Alkaloids وصابونيات Saponin . تحتوي أكثر من 30 % من الزيوت الثابتة Fixed Oils وحوالي 0.45 – 0.40 % (w/w) من الزيوت الطيارة Volatile Oil . شخص حوالي ثمانية من الأحماض الدهنية Fatty Acid , واثنان وثلاثون مركباً مشخصاً في الزيوت الطيارة Volatile Oil والثابتة , و الأحماض الدهنية Fatty Acids الرئيسة من الزيوت الثابتة هي الينولك Linoleic Acid , والأوليك Oleic Acid وحامض البالمتك Palmitic Acid . المكونات الرئيسية للزيوت الطيارة في البذور تكون الثايموكوينون TQ , والفا بينين Alpha pinene , و ليمونين Limonene , و ترانس انيثول Trans Anethole , و بي – سايمن P – Cymen , والكارفون Carvone (Nickavar *et al*., 2003; Hajhashemi *et al*., 2004) . بالإضافة إلى البذور Seeds , الجذور Roots والسيقان Stems من الحبة السوداء تمتلك ايضا مركبات الفينولية Phenolic مثل Vanilic Acid . الا ان الكثير من النشاطات الحيوية Biological Activity للبذور تكون بسبب الثايموكوينون TQ (2- ايزوبروبيل 1-5 مثيل - 1 , 4 حلقة كوينون) 2- Isopropyl - 5- Methyl - 1, 4- benzoquinone الذي يمتلك التركيب الكيمائي C10H12O2 .



Thymoquinone (TQ)

شكل (2-1) التركيب الكيمائي للثايموكوينون (2- ايزوبروبيل 1-5 مثيل – 4,1 بينزوكوينون) (Nagi & Mansour, 2000) .

اما النجيلون Nigellone وهو بوليمرات كاربونية Carbonyl Polymer من الثايموكوينون تم عزله من بذور الحبة السوداء . اما البوليمر Polymer وهو اقل سمية بكثير لكنه يحتفظ بالكثير من الخصائص الدوائية من الثايموكوينون TQ وهو المصدر النشط من النبات ;Bourgou *et al.* (2008) .

ولأهمية هذه المادة تم دراسة سميتها لتحديد الجرعة المميتة على الجرذان Rats إِذ أظهرت نتائج الدراسات ان الجرعة السامة تظهر عند التجريع بجرعة 794.3 ملغم / كغم اما على الفئران Mice كانت 870.9 ملغم / كغم إذ ان الثايموكوينون TQ يستخدم في مختلف الدراسات التي تظهر مضادات الالتهاب , و مضادات الأكسدة , ومضاد للسرطان وتأثيرات الوقاية الخلوية Cytoprotective effect (Al-Ali *et al.*, 2008) . أشار(Randhawa , 2008) في دراسته ان التأثير السمي يظهر عند جرعة 2.4غم /كغم . و له تأثير مضاد للسكر إذ يقلل تركيز الكلوكوز ويزيد من مستوى الانسولين في مصل الدم (Kanter, 2009) . ومضاد للميكروبات الفطرية (Aljabre *et al.*, 2005) . كما يوفر الحماية ضد العوامل الكيمائية المسببة لأَضرار الكبد (Mansour *et al.*, 2001) .

3.2.استخدامات الثايموكوينون

1.3.2. تأثير مضاد للأكسدة Antioxidant Effect

ان إنتاج أنواع الأوكسجين الفعالة Reactive Oxygen Species (ROS) في اجسامنا يكون متوازناً بسبب وجود أنظمة دفاع مضادات الأكسدة الطبيعية . ان الزيادة في ROS يؤدي الى تغيير أنظمة الدفاع وهذا التغير يؤدي الى ظهور العديد من الأمراض و أيضاً تغييرات جزيئة مثل تلف الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA ، والحامض النووي الريبوز RNA و الدهون . Lipids النباتات ومكوناتها هي مصدر غني من مضادات الأكسدة أو مضادات الأكسدة الطبيعة (

الأعشاب) تلعب دوراً مهماً في الحفاظ على التوازن بين نظام الدفاع وأنشطة الاوكسجين الفعالةROS أظهرت دراسة اجريت على الجرذان ان الثايموكوينون يمنع نقص ضخ التروية Ischemia والمنتجة تغيرات في انزيمات المعدة المخاطية Gastric Mucosal Glutathione (GSH) و Superoxide Dismutase (SOD) (El- Abhar *et al*.; 2003) . كما وأظهرت دراسة أخرى أن المعالجة المسبقة بالثايموكوينون له دور في حماية الأجهزة من التلف التأكسدي الناتج عن عوامل تولد الجذور الحرة المنتجة بواسطة رباعي كلوريد الكاربون CCl_4 & Rahmani (Aly, 2015) . ومن الدراسات الهامة الأخرى التي اجريت بالاعتماد على الجرذان تبين الدور النافع للثايموكوينون كمعالجة مسبقة في الحد من التغيرات الكيمائية الحيوية المقترحة من الاجهاد التأكسدي في كريات الدم الحُمْر RBCs التي تسببها 1،2 -dimethylhydrazine (Harzallah *et al*.; 2012) .

2. 3. 2. تأثير المضاد للعقم Anti- Infertility Effect

تظهر النباتات الطبية المختلفة ومكوناته دوراً في مكافحة العقم خاصة النباتات الغنية بمضادات الأكسدة Antioxidant . أظهرت الدراسات للثايموكوينون دور في إعادة تكوين الحيوانات المنوية بعد تعرض الخصية للإصابة في الجرذان (Kanter *et al*.; 2011) . وأشارت دراسة أن التجريع الحبة السوداء 300 ملغم/ كغم من وزن الجسم لمدة 60 يوم ادى الى زيادة عدد خلايا لايدك وقطر النبيب ناقلة المني في خصى الجرذان (Mukhalad *et al* .; 2009) . ان المستخلصات الكحولية لبذور الحبة السوداء له نشاط مضاد للعقم (Rahmani & Aly, 2015). بينت دراسات سابقة أن التجريع الفمي للمستخلص الكحولي للبذور الحبة السوداء خاصة في الجرعات العالية يمكن أن يزيد من الخصوبة ، تركيز مستوى هرمون اللوتيني وتركيز هرمون الشحمون الخصوي Parandin *et al* .; 2012) .

4.2. الخصوبة Fertility

الخصوبة Fertility هي القدرة الطبيعية لإنتاج الذرية Offspring وكمقياس لمعدل الخصوبة هو عدد الأطفال الذين يولدون لكل زوجين أو شخصين أو للسكان . والخصية Testis عضو التناسل الرئيس في الذكور لها دور مهم في الجهاز التناسلي الذكري ويتم تنظيم عمل الخصى بصورة رئيسة بواسطة هرمونين من هرمونات الغدة النخامية pituitary Gland تحت سيطرة هرمونات المحررة للقند Gonadotropin - Releasing Hormone (GnRH) التي تتحرر من الغدة تحت المهاد هما هرمون اللوتيني وهرمون المحفز للجريب . يحفز الهرمون اللوتيني خلايا لايدك Leydig's cells للإنتاج هرمون الشحمون الخصوي , اما هرمون المحفز للجريب ;

يعمل على تحفيز خلايا سرتولي Sertoli cells لبدء عملية نشأة النطف Spermatogenesis (Jadalhaq , 2011) .

وتتضمن خصوبة الذكور إنتاج الخصى أعداداً كبيرة من النطف الطبيعية Spermatozoa من خلال ثلاث مراحل معقدة لعملية نشأة النطف هي الانقسام الخيطي لسليفة النطف Spermatgonia Mitosis , الانقسام الاختزالي Meiosis لحصول الخلايا الجرثومية Germ Cells على نصف العدد الكلي للكروموسومات و نضوج أَرومات النطف إلى نطف كاملة (Schlegel &Chang 1997,) . يؤدي الاضطراب في إي مرحلة من مراحل عملية نشأة النطف التأثير على هذه العملية وبتالي على انتاج الحيوان المنوية السليمة , الهرمون اللوتيني والهرمون المحفز للجريب يساعد سليفة النطف للإنتاج النطف (Singh *et al.*, 2011) .

5.2. الخصية The Testis

تتكون الخصية Testis بصورة رئيسة من نبيبات ناقلة المني Seminiferous Tubules متجمعة مع بعضها مكونة 95 % من حجم الخصية . وخلايا بينية Interstitial cells , يتراوح طول الانبوب المنوي من 30 – 70 سم و قطره 200 – 300 مايكرون وهناك حوالي 500 أنبوب في كل خصية . تحتوي النبيبات ناقلة المني على خلايا جرثومية Germ cells التي تنضج إلى نطف Spermatozoa . وكذلك تحتوي خلايا سرتولي وهي خلايا داعمة لنمو الخلايا الجرثومية (Schlegel &Chang , 1997) .

تعد الخصية من أهم أعضاء الجهاز التكاثري الذكري في الحيوانات ، وهي غدة تكاثرية مزدوجة الوظيفة ، تكون ذات إفراز خارجي Exocrine من خلال إنتاجها النطف Sperms من النبيبات ناقلة المني Seminiferous tubules افراز داخلي (صماء) Endocrine من خلال إنتاج وإفراز الهرمونات الجنسية الذكرية وخاصة هرمون الشحمون الخصوي عن طريق خلايا لايدك تحت سيطرة الهرمون اللوتيني تحاط الخصية بطبقتين من الانسجة هي طبقة خارجية او غلاف غمدي vaginal visceral وطبقة وسطى او الغلاف الأبيض Tunica albuginea وكلاهما يكونان المحفظة (Senger , 2003) .

تعد الخصية غدة المناسل Gonad الذكرية في الحيوانات , وهي عضو معقد ولها وظيفتان مهمتان وهما بناء الستيرويدات, وأهمها هرمون الشحمون الخصوي وإنتاج النطف والمسيطر عليها بواسطة هرمون المحرض للقند Gonadotrophins (Saez,1994) . تتأثر الخصية بواسطة هرمونات موجهة للغدد التناسلية Gonadotropic hormone المنتجة بواسطة الجزء الأمامي

للنخامية . ان وجود كلا من هرمون الشحمون الخصوي وهرمون المحفز للجريب ضرورية لدعم عملية تكوين نشأة النطف (Luisi *et al*., 2012) .

و اشارت الدراسات الى ان تطور الخصية يعود للتأثير المشترك للهرمونات والبروتينات مثل هرمونات المحفز للجريب , والانهبين Inhibins , والاكتيفين Activins , والفولستاتين Follistatin (FST) , ووحدة بيتا للانهبين او الاكتفين Activins / Inhibins و الحامض النووي المراسل m RNA و تم كشف هذه المواد في خلايا سرتولي والخلايا الجرثومية Germ cell وخلايا لايدك خلال مراحل تطور الخصية (Barakat *et al* ., 2008) .

6.2. خلايا سرتولي Sertoli Cells

خلايا عمودية الشكل تمتد من طلائية الغشاء القاعدي للأنابيب ناقلة المني إلى تجويف نبيبات ناقلة المني . يمكن تقسيم خلية سرتولي الى قسمين وذلك بالاعتماد على مراحل عملية تكوين النطف هما نوع A و B (Mruk & Cheng , 2004) . خلايا سرتولي نوع A تكون اورمات الناضجة Mature Spermatids مستقرة في الخبايا السايتوبلازميةCytoplasmic Crypts وتكون مسعدة لتحرر داخل تجويف الأنابيب ناقلة المني , إما في النوع B الخبايا السايتوبلازمية اما ان تكون واضحة أو غائبة تماما (Chen, 2008) . تمتلك خلايا سرتولي درجة عالية من الليونة والحركة لدعم عملية نشأة النطف (Kerr *et al*., 2006) . ان الارتباط الموجودة بين خلايا سرتولي يشكل قوة لمنع الحيوانات المنوية من الذهاب لمجرى الدم وتصبح مستضدات ذاتية Autoantigens وبتالي تؤدي الى حث استجابة الجهاز المناعي . يوجد فراغات بين مواقع ارتباط خلية سرتولي بأخرى هذه الفراغات يعتقد انه تكون متضمنة في تنظيم مجموعة خلايا عملية نشأة النطف في الأنابيب ناقلة المني (Fox *et al*., 2001) .

وتعدّ خلايا سرتولي خلايا ساندة في الخصى وجزء من الأنابيب ناقلة المني يتم تنشيطها بواسطة هرمون المحفز للجريب وتمتلك مستقبلات الهرمون على غشائها . والتي تقع تحديداً في الأنابيب ناقلة المني الملتوية (Xiong *et al* ., 2006) . من اهم وظائف خلايا سرتولي هو تطور الخلايا الجرثومية مع الدعم التركيبي والوظيفي (Mruk &Cheng , 2004) . وكذلك دعم ونمو النطف , و إنتاج البروتينات الرابطة للأندروجين Androgen - Binding (ABP) Protein , واساس لعوامل النمو Growth factor و مولد الليف Fibroblast الذي يبدو ضرورياً لتنظيم طلائية البربخ Epididymal Epithelium (Lan *etal*.,1998).

في دراسة اجراها (Xiong *et al* ., 2006) بين ان خلايا سرتولي تفرز العديد من المواد مثل هرمون Anti – Mullerian hormone (AMH) والذي يفرز خلال مراحل مبكرة من حياة الطفل

, الانهبين والأكتفين يفرزان بعد البلوغ , هرمون الشحمون الخصوي المرتبط بالأندروجينات (زيادة تركيز هرمون الشحمون الخصوي في أنابيب ناقلة المني يحفز عملية نشأة النطف) .

7.2. خلايا لايدك Leydig's cells

خلايا كبيرة متعددة الاشكال طلائية المظهر قليلة العدد (Chatani *et al*., 1990) . تدعى أيضا بالخلايا البينية Interstitial Cells لأنها تقع في المسافات البينية الخصى بين فراغات الأنابيب ناقلة المني . وان خلايا لايدك هي الخلايا الوحيدة في الخصية التي تفرز مستقبلات الهرمون اللوتيني . مستقبل هذا الهرمون من عائلة الكوانين G- Protein coupled receptor (Gs) تنشط , أنزيم أدنيل سايكليز Adenylyl cyclase لتحويل مركب أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP إلى مركب الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي (cAMP) , أنزيم الكاينيز نوع A protein (PKA kinase) تنشط مركب الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي كما يقوم انزيم الفوسفورليز ينشط التعبير عن البروتين التنظيمي الحاد الستيرويدي المنشأ Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) و يكون مهم لأنه ينقل الكولسترول الى داخل المايتوكوندريا وفي الوقت نفسه انزيم سايتو كروم Cytochrome p450 يفصل السلسة الجانبية للكولسترول Cholesterol ليحوله ال Pregnenolone في المايتوكوندريا وهي خطوة محددة للخطوات اللاحقة من بناء الستيرويدات والتي تنقل داخل السايتوبلازم (Chen, 2008) . تقوم خلايا لايدك بإفراز وإنتاج هرمون الشحمون الخصوي والهرمونات الجنسية الذكرية المهمة للنمو الجنسي والبلوغ , كذلك لها دور في ظهور الصفات الجنسية الثانوية , والسلوك الجنسي Sexual behavior , و الرغبة الجنسية Libido , ودعم عملية نشأة النطف و وظيفة الانتصاب Erectile Function . كذلك تقوم خلايا لايدك بإنتاج الأندروجين المتطلب لدعم العديد من صفات البربخية Epididymal Features من تشكل التعبير جينات الفردية (Robaire *et al* ., 2006) .

8.2. الغدة النخامية The Pituitary Gland

الغدة النخامية هي عضو صغير من الغدد الصماء Endocrine Glands تقع أسفل الدماغ brain . تحت التصالبة البصرية Beneath The Optic Chiasm تكون أساساً لتطوير أو نمو وظائف العديد من الأعضاء الأخرى في الجسم . تكون الغدة النخامية مؤلفة من قسمين رئيسين هما النخام الغدي Adenohypophysis و النخام العصبي Neurohypophysis, و النخام الغدي Adenohypophysis (الفص الامامي) مكون من الجزء الدرني Pars Tuberalis (جزء الداني Pars Proximalis) , الجزء الوسطي Pars Intermedia (جوف النخامي Cavum (Hypophysis (جزء القاصي Pars Distalis) . أما النخام العصبي Neurohypophysis

الفص الخلفي) مكون من القمع Infundibulum (جزء قاصي Pars Distalis) وجزء عصبي Lobos Nervosus (جزء الداني Pars Proximalis) , الغدة تتعلق من منتصف الخط الوسطي البيني للدماغ Midline Diencephalon عند منطقة تحت المهاد Hypothalamus بواسطة ساق والساق هو امتداد من البروز الوسطي Median Eminence من منطقة تحت المهاد ويشكل الجزء الداني Proximalis portion من النخام العصبي . و الجزء الوسطي من النخام الغدي Adenohypophysis يرتبط مباشرة مع النخام العصبيNeurohypophysis (Mcklveen , 2002) . الغدة النخامية في اغلب اللبائن مكونة من 3 أجزاء مختلفة الفص الأمامي Anterior , الفص الخلفي Posterior , الفص الوسطي Intermediate lobe (Kelberman *et al*., 2009) . وتكون العضو المهم والرئيس في نظام الغدد الصماء (Mcklveen , 2002) .

الجزء الأمامي مكون من 5 أنواع من الخلايا الفارزة للهرمونات هي الخلايا الجسمية Somatotropes وتفرز هرمون النمو Growth Hormone (GH) , وخلايا الحليب Lactotropes تفرز هرمون الحليب prolactin (PRL), و الخلايا القشرية Corticotropes تفرز هرمون قشرة الكظر Adrenocorticotropic Hormone (ACTH) , و خلايا الدرقية Thyrotropes تفرز هرمون الغدة الدرقية Thyroid – Stimulating Hormone (TSH) والخلايا المحرضة للقند Gonadotropes تفرز الهرمون اللوتيني Luteinizing Hormone (LH) و / أو هرمون المحفز للجريب Follicle Stimulating Hormone (FSH) ( ) Wen , 2010 . بعض الخلايا في الجزء الأمامي للنخامية تنتج أكثر من هرمون واحد مثلا تفرز خلايا المحرضة للقند الهرمون اللوتيني بالإضافة إلى هرمون المحفز للجريب في الخلية نفسها . البعض الاخر من الخلايا المحرضة للقند أيضا تنتج هرمون النمو GH بالإضافة إلى هرمون اللوتيني وهرمون المحفز للجريب (Childs *et al*., 1994) .

الفص الخلفي للغدة النخامية مكون من شجيرات محورية Axonal Projection ممتدة من تحت المهاد Hypothalamus وخلايا النخامية Pituicytes , نوع من الخلايا الدبقية ألنجمية Astrcytic Glial Cells . يفرز من الفص الخلفي للنخامية اثنين من الهرمونات غير البيبتدية Nonapeptides هما : الفاسوبرين Vasopressin و الأوكسيتوسين Oxytocin ((Zhu *et al*., 2007 .

كلا الهرمونين تتشكل في الخلايا العصبية الببتيدية peptidergic neurons في النواة الخلوية الكبيرة , النواة فوق البصرية Supra Optic Nuclei (SON) ونواة جنب البطين Para Ventricular Nuclei (PVN) من الغدة تحت المهاد (Hadely &Levine , 2007). لفاسوبرين

دور في أعادة امتصاص الماء في الكلية , تحلل السكر في الكبد والتقليص الوعائي (Ball , 2007) . اما الأوكسيتوسين ; يحفز تقلص العضلات الملساء Smooth Muscle في عملية الولادة Parturition وإفراز الحليب خلال فترة الرضاعة (Wen, 2010) . أما الفص الوسطي Intermediate lobe يحتوي على خلايا الصبغية Melanotropes والتي تنتج هرمون المحفز للخلايا الصبغية Melanocyte –Stimulating Hormone (MSH) الذي يحفز أنتاج وتحرر صبغة الميلانين Melanin في الجلد و الشعر(Slominski *et al.*, 2004).

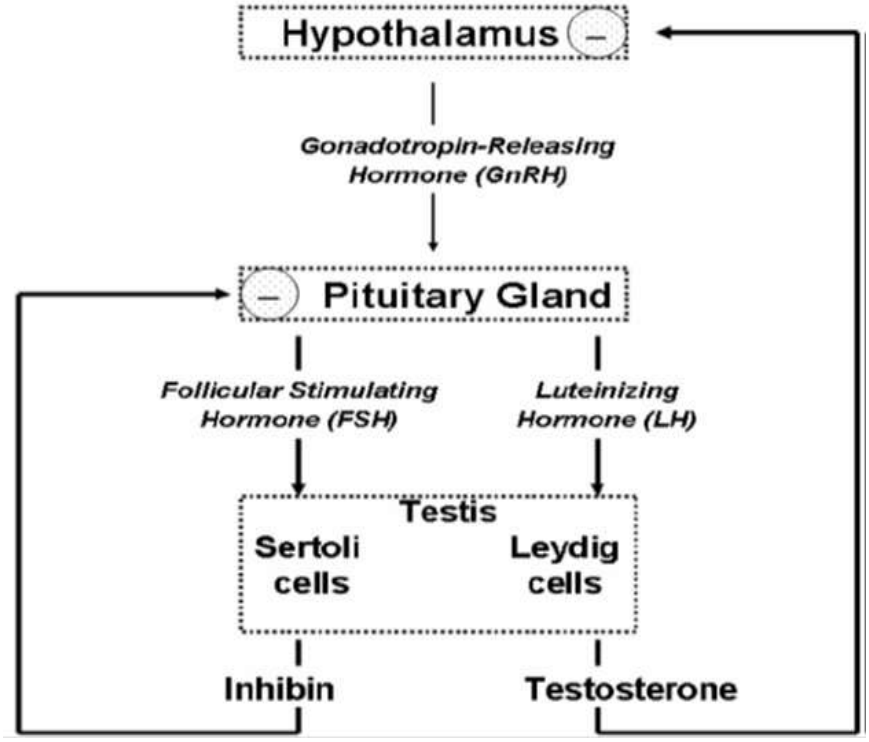
9.2. محور تحت المهاد - النخامي – القندي

Hypothalamo - Pituitary - Gonadal (HPG) Axis : -

ويدعى أيضاً محور المهادي – النخامي – الخصوي Hypothalamo –Pituitary-Testicular (HPT) إذ ان الهرمونات المنتجة من هذا المحور هي هرمونات الجهاز التكاثري الذكري والتي تبنى وتفرز من الغدة تحت المهاد , الفص الامامي للنخامية والخصى لذا يعرف بمحور تحت المهادي النخامي الخصوي والذي يسيطر على وظائف التكاثر (Roser , 2008) . كما انه يدعم انتاج الخلية الجرثومية Germ Cell وتنظيم الخصائص الجنسية الذكرية (Laughlin , 2010) . الهرمونات المتحررة من محور تحت مهاد – النخامي – القندي (HPG) تكون مسؤولة عن مبدأ تنظيم التكاثر والسيطرة على دورات الإنجابية أو التكاثرية للإناث في القوارض Rodents و الإنسان Humans بإيجاز الهرمون المحرر لمحرضات القند Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH) يفرز من الغدة تحت المهاد والتي تحفز النخام الغدي لإفراز هرمون اللوتيني وهرمون المحفز للجريب . يرتبط كلا الهرمونين بمستقبلات في المناسل Gonads ويحفز تحرير الستيرويدات الجنسية Sex Steroids التي تشمل هرمون الشحمون الخصوي في الذكور والاستروجين الجريبي Follicular Oestrogen وبروجسترون الجسم الأصفر Corpus Luteum Progesterone في الاناث (Vadakkadath & Atwood , 2005) .

ينظم هرمونات المحفز للجريب , اللوتيني والشحمون الخصوي في الذكور عملية الإنطاف (نشأة النطف) عن طريق خلايا سرتولي في انابيب ناقلة المني للخصى . هرمونات المحفز للجريب يكون اقل حساسية لتثبيط التغذية الاسترجاعية بهرمون الشحمون الخصوي من تأثير هرمون اللوتيني ويعتقد ان التنظيم يكون بشكل مستقل إذ يتم التثبيط بالأنهبين الببتيدي Peptide Inhibin المنتج بواسطة خلايا سرتولي لان ميكانيكية التغذية السلبية الراجعةNegative Feedback Mechanism تنظم تحرر هرمونات محرضات القند كما مبين في الشكل (2- 2) . حيت ان ارتفاع تراكيز كل من

الهرمون اللوتيني والمحفز للجريب دلالة على فشل عمل المناسل عندما تشترك بتراكيز واطئة من ستيرويدات المناسل Gonadal steroids في الذكور هذه الملاحظات تعد مؤشر على فشل في وظائف الخصية الرئيسية (Jadalhaq , 2011) . إي ضرر أو تعطيل للمحور HPG عند أي مستوى يمكن أن يخل بالتكاثر ويؤدي إلى العقم Infertility أو فشل الحمل Pregnancy Failure (Atwood , Vadakkadath & 2005).



(2 -2) شكل يوضح عمل المهاد – المحور النخامي – الخصوي لإفراز التستوستيرون من خلايا لايدك في الخصى (Al- Hassan , 2012).

10.2. الهرمونات الجنسية Sex hormone

تسمى الأندروجينات الذكرية Androgens أو هرمونات الذكورة Musculrnicing Hormones تتكون في الخصى Testes وقشرة الغدة الأدرنالين 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 (Regan ,1996) . ركز الباحثين المهتمين 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 حيث 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 يكون مناسب لدخول خلايا الهدف وتنبيه الأفعال الحيوية . اما الشكل الغير المرتبط أو الحر من هرمون الشحمون الخصوي فهو الجزء المناسب للأنسجة الهدف (Itoh *et al.*, 1991) . 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 الأرتباط ليكون الشكل الحر (هرمون الشحمون الخصوي النشط) (Regan , 1999) .

أما الهرمونات الجنسية الأنثوية تسمى الأستروجينات Estrogens أو هرمونات التخنث وتفرز بكميات كبيرة من المبايض Ovaries , بكميات اقل في الخصى , قشرة الغدة الكظرية Adrenal Cortex والأنسجة الطرفية Peripheral Tissues مثل (الدهون , العضلة , الكلية , الكبد وتحت المهاد) . تعتبر المشيمة Placental المصدر الرئيسي خلال فترة الحمل للأستروجينات ويعتبر Estradiol أكثر الهرمونات الأستروجينية قوة والذي يشتق من العمليات الأيضية لهرمون الشحمون الخصوي والذي يكون مرتبط مع بروتين الكلوبيولين SHBG والشكل الحر منه يكون الجزء الذي ينبه الافعال الحيوية (Mounib *et al.*, 1988) . بالرغم من ضعف وقلة فعالية الهرمونات الستيرويدية Estrogenic hormone الأسترون Estrone و الأسترول Estroil ألا أنها تعتبر مهمة في التأثير على الوظائف الجنسية للإنسان (Regan ,1999) .

1.10.2.هرمونات المحفز للجريب Follicle Stimulating Hormone (FSH)

يصنف ضمن عائلة هرمونات البروتينات السكرية Glycoprotein Hormone التي لها دور أساسي ومركزي في التكاثر . هرمونات المحفز للجريب يكون اساسي في وظائف الاعضاء التناسلية , تنظيم الخصوبة , التشخيص ومعالجة الاضطرابات التناسلية Reproduction , له فعاليات مختلفة سواء في النظم الوظيفية وأنواع الفحص المختلفة (Rose *et al.*, 2000). يعد هرمونات المحفز للجريب بروتين سكري Glycoprotein ، ويتكون من وحدة أحادية الشكل هي جزيئه البروتين المرتبطة مع السكر . الجزء السكر من الهرمون يتكون من سكر الجلاكتوز ، المانوز ، الجلوكوز امين Glucosamine ، غالاكتوز امين Galactosamine وحامض السلسيك Salsic

acid . كل وحدتين من هذه الوحدات تعمل على إعطاء شكل الهرمون المتكامل الوظيفي (Ward *et al.*,1991) .

يتكون هرمونات المحفز للجريب من وحدتين مرتبطتين بأواصر غير تساهمية هما الفاα و بيتا β تتكون وحدة الفا α من 92 حامض أميني ويكون مشابه لوحدات الفا α من هرمون اللوتيني , وهرمون المحرض للمشيمة hCG و هرمون المحفز للدرقية TSH . اما وحدة بيتا β من الهرمون المحفز للجريب تكون فريدة من نوعها وتمنح الهرمون خصوصيته المناعية والوظيفية وتكون مختلفة تتكون من 111 حامض اميني ، وهذه الوحدة تضفي خصوصية لعملها الحيوي وتكون مسؤولة عن التفاعل مع مستقبلات هرمونات المحفز للجريب (JadaIlah , 2011) . يمتلك هرمونات المحفز للجريب العديد من الوظائف الحيوية في كلا الجنسين , يرتبط في الذكور مع عمل هرمون الشحمون الخصوي تحت سيطرة هرمون اللوتيني والذي يلعب دوراً في بدأ وصيانة نوعية تكوين النطف الطبيعية وكميتها (Melachian *et al.*, 1996) .

يرتبط هرمونات المحفز للجريب بمستقبلات الموجودة على خلايا سرتولي Sertoli Cells و يحفز عملية نشأة النطف . يؤدي فشل الغدة النخامية في افرز هرمون المحفز للجريب و اللوتيني الى خلل في وظيفة الخصية Testicular Function وبتالي العقم Infertility . إذ ان هرمون الشحمون الخصوي , الأستروديال Estrodial و الانهبين Inhibin تعد من العوامل المسيطرة على إفراز هرمونات المحفزة للقند (Babu *et al.*, 2004) . كما وان هذا الهرمون له دور اساسي في رتبة الرئيسيات Primates أكثر من القوارض Rodents (Rose *et al.*, 2000) .

آما في الإناث Female يكون ضروري لانتخاب ونمو حويصله البيضة وبناء الاستروجين Estrogens من مواد الهرمونات الذكرية Androgen Substrates . قد لوحظ تأثير الهرمونات المحرضة للقند Gonadotropic على الهرمون المحفز للجريب من عدد من الباحثين (Christenson *et al.*, 1997) .

ان الية عمل هرمونات المحفز للجريب تكون داخل الخلايا عبر مسار أو آلية أدينوسين أحادي الفوسفيت الحلقي cAMP كذلك يمكن لهذا الهرمون استعمال آلية اخرى لنقل الاشارة كنظام الكالسيوم Ca^{++} إذ يرتبط بمستقبلات الغشاء البلازمي لخلايا سرتولي ويحفز مسار الرسول الثاني c AMP – Mediated Second Messenger وينشط عوامل مختلفة اخرى ضرورية لنجاح عملية إنتاج ارومات النطف Spermatids (Dharia *et al.*, 2004) . تفرز خلايا Gonadotropes في الغدة النخامية هرمون اللوتيني والمحفز للجريب نتيجة الاستجابة لهرمونات المحررة للقند GnRH أو LHRH التي تفرز من أسفل منتصف الغدة تحت المهاد Medial

Basal Hypothalamus . يفرز بمعدل الطبيعي بطريقة النبضة Pulsatile Manner وتكون هذه طريقة لإفراز هرمون المحفز للجريب اقل وضوحاً من هرمون اللوتيني (Al-Hassan , 2012) . النشاط الحيوي للهرمون يكون مجموع مزيج معقد من العمليات يتحرر من الغدة النخامية ويبقى في جهاز الدوران وينقل إلى مواقع عمل المناسل Gonads إذ يرتبط بمستقبلاتها وينشط مسارات نقل الإشارة . هذه العمليات يمكن تعديلها بواسطة العوامل الأخرى التي قد تؤثر على تردد النبضة Pulse Frequency . كما ان هرمون المحفز للجريب يساعد نمو الحويصلات في المبيض وتكوين الأمشاج في الخصى (Franchimont , 1973) . وهو هرمون موجود في الإنسان و حيوانات الأخرى يبنى ويفرز من خلايا المحرضة للقند من النخام الغدي . ينظم التطور , و النمو , والبلوغ الناضج ، والعمليات التناسلية في الجسم . هرمون المحفز للجريب و هرمون اللوتيني يعمل تآزرياً في التكاثر على وجه التحديد ، و زيادة إفرازه من النخام الغدي تسبب الإباضة Ovulation . (Ward *et al*.,1991) .

2.10.2. الهرمون اللوتيني Luteinizing Hormone (LH)

بروتيني سكري Glycoprotein Hormone يفرز من النخام الغدي بتحفيز من الهرمون المحرر للمحرضات القند GnRH ويعد ضرورياً لعملية نشأة النطف لأنه الهرمون المسؤول عن تحفيز خلايا لايدك للإفراز هرمون الشحمون الخصوي (Ganong, 2005) . وبما أن خلايا لايدك تقع بين ملتقى النبيبات ناقلة المني في الخصى فان الهرمون اللوتيني في الذكور يسمى أيضاً بالهرمون المحفز للخلايا البينية Interstitial Cells (ICSH) Stimulating Hormone . يرتبط هرمون اللوتيني مع مستقبلات الغشاء البلازمي المتخصصة الموجودة على سطح خلايا لايدك وهذا الارتباط يؤدي إلى تحفيز تكوين مركب الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) والذي ينشط بدوره إنزيمات بروتين كاينيز Protein Kinases الذي يعمل على فسفرة انزيمات بروتينية اخرى ضرورية لتخليق هرمون الشحمون الخصوي (Charlton , 2004) .

يسهل مركب cAMP عمل الهرمون اللوتيني اذ يكون الارتباط قوياً بين الهرمون اللوتيني وبين إنتاج مركب الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي الذي يعد من انظمة نقل الاشارة في الخلية كما أن عملية تصنيع الستيرويدات Steroidogenesis تحدث عندما تكون هنالك زيادة وإن كانت قليلة في مستويات cAMP , وإن هذا الفعل الحيوي للهرمون اللوتيني يتضمن تحويل الخلات Acetate إلى سكوالين Sequalen الذي يعد الاساس في تصنيع الكولسترول Cholesterol ثم تحويل

الكولسترول إلى Pregnenolone الذي يعتبر ضرورياً في تصنيع هرمون الشحمون الخصوي (Murray *et al*., 2000) .

يتكون هرمون اللوتيني من وحدتين هما : الفا , وبيتا مشابه لتركيب هرمون المحفز للجريب يرتبط بمستقبلات الخلية الهدف , اسم الهرمون مشتق من تأثيره على الجسم الاصفر Luteinization من الحويصلات المبيضة Ovarian Follicles تكون مستقبلات الهرمون LHR معبرة على الحويصلة الناضجة Maturing Follicle التي تنتج زيادة في كمية Estradiol بواسطة رفع مستوى Estrogens من الحويصلة الناضجة . رفع مستوى Estrogen يؤدي إلى تدفق في مستوى الهرمون اللوتيني لفترة 18-24 ساعة هذا التدفق يحرك الاباضة Ovulation وبدأ تحول بقايا الحويصلة إلى الجسم الاصفر Corpus Luteum وظيفة تنفذ انتاج البروجسترون Progesterone يهيئ بطانة الرحم لغرس البيضة إذ يكون ضروري لإدامة الحمل Pregnancy . الهرمون المحفز للجسم الاصفر ضروري لاستمرار تطور الجسم الأصفر Corpora Lutea و وظيفته. أما في الذكور, فإن مستقبلات الهرمون موجودة على خلايا لايدك في الخصى ويحفز أنتاج هرمون الشحمون الخصوي الذي يساعد في عملية نشأة النطف ومسؤول عن ظهور الصفات الجنسية الثانوية في الذكور (Meng , 2007) . الهرمون اللوتيني والمحفز للجريب هي اشكال متغيرة Heterodimers تتألف كل منها من وحدة بيتا β وحدة الفا α . (Conn &Crowley, 1994) . بينت الدراسات ان السيطرة الهرمونية على الحيوانات المنوية في القردة تكون تحت سيطرة الهرمون المحفز للجريب والهرمون اللوتيني في تنظيم إفراز الخصية للإنهيبين نوع Inhibin B والتعبير عن الجينات التي تشفر وحدة بيتا β إنهيبين (Ramaswamy *et al*., 2003) . كما لوحظ وجود التفاوت الموسمي في مستويات الهرمون اللوتيني وهرمون الشحمون الخصوي ، ولا يوجد في مستويات الهرمونات الأخرى . ويمكن تفسير هذا التفاوت الموسمي في مستويات هرمون الشحمون الخصوي من قبل التباين في مستويات اللوتيني . التفاوت الموسمي في مستويات الهرمون اللوتيني له علاقة بدرجة حرارة الهواء خلال شهر قبل اخذ عينات الدم ، و ليس بطول النهار (Andersson *et al*.,2003) . الهرمون اللوتيني له دور مهم في الأحداث الوظيفية التي تؤدي إلى تطوير الحويصلة المختصة السائدة قبل الإباضة تحت تحفيز الهرمون اللوتيني ، وخلايا الغلالة المبيضة تنتج الاندروجين التي يتم نقلها إلى الخلايا الحبيبية وتحويلها إلى هرمون الاستروجين من خلال عمل نظام انزيم الأروماتيز Aromatase Enzyme System . و يلعب الهرمون اللوتيني دوراً فعال وإيجابي في نظم تحريض الإباضة (Noci *et al*.,1998; Westergaard *et al*.,2000) .

3.10.2. هرمون الشحمون الخصوي Testosterone (T)

هرمون ستيرويدي من مجموعة الاندروجين يوجد في اللبائن Mammals , الزواحفReptiles (Cox & John-Alder, 2005) . والطيورBirds (Reed *et al*., 2006). الأندروجينات تكون هرمونات ستيرويدية مشتقة من ايض الكولسترول . مكونة من 19 ذرة كاربون (Senger , 2003) . يفرز في الذكور بصورة رئيسة في خلايا لايدك في الخصى وكميات صغيرة منه في قشرة الادرنالين , الكبد , و المبايض (Chirs & Moray , 2010) . تنظيم افراز الهرمون يكون من خلال الافراز النبضي من هرمونات تحت المهاد الهرمون المحرر للمناسل GnRH والتي تحفز انتاج هرمون المحرض للقند Gonadotropin من النخام الغدي معدل او تردد هذه النبضات يحدد من افراز الهرمون اللوتيني وهرمون المحفز للجريب (Darryl , 2011) . وهو من الهرمونات الجنسية الذكرية الرئيسة للبائن وينتج بصورة رئيسية بالخصية , وبكميات صغيرة بالغدة الأدرنالية Adrenal Glands في كل من الذكور والإناث (Carlson , 2003). أظهرت الدراسات إن هرمون الشحمون الخصوي له دور في صيانة كتلة العظم و العضلات , كذلك له دور في تصنيع كريات الدم الحُمْر Erythropoiesis , بالإضافة إلى أن هرمون الشحمون الخصوي يلعب دور رئيسي في محافظة على التوازن الجسم الداخلي للسكر Homeostasis وأيض الدهون (Saad & Cooren, 2011) . كما يؤثر على التعبير عن السلوك الجنسي الذكري في مرحلة البلوغ والتمايز قبل الولادة بواسطة اليات الدماغ والتراكيب الجنسية الموجهة للسيطرة على الاداء والدافع الجنسي الذكري (Jill , 2002) . يوجد هرمون الشحمون الخصوي في جهاز الدوران مرتبط بألفة عالية ببروتين الكلوبيولين SHBG واقل ارتباط بالألبومين Albumin . كما توجد كميات صغيرة من هرمون الشحمون الخصوي غير المرتبط او الحر (Vermeulen , 2005& Kaufman) .

يعتبر هرمون الشحمون الخصوي هرمون أبتنائي ينتج من الخصى في الذكور وبواسطة الغدة الأدرنالية والمبايض في الإناث (Brownlee *et al*., 2005) . عملية السيطرة على إنتاج هرمون الشحمون الخصوي تبدأ من تحت المهاد بتحرر هرمون المحرض للقند GnRH . هذا الهرمون بدوره يحفز النخام الغدي لتحرير الهرمون اللوتيني والهرمون المحفز للجريب . في الذكور يحفز الهرمون المحفز للجريب نمو طلائية الجرثومية في الخصية الضرورية لنمو النطف Sperm . اما هرمون اللوتيني يحفز خلايا لايدك من الخصى لإفراز هرمون الشحمون الخصوي , و يتم السيطرة على المستويات العالية من الهرمون بواسطة آلية الاسترجاعية السالبة بعد افراز الشحمون الخصوي من الخصى يتم تثبط تحرر كل من هرمون المحفز للجريب واللوتيني . افراز هرمون

الشحمون الخصوي من الخصى حوالي 97% منه يرتبط ببروتينات البلازما و يكون قليل الارتباط بالألبومين و يرتبط بقوة بالكلوبيولين SHBG واجزاء صغيرة ترتبط بالكورتيزول Cortisol Binding Globulin (CBG) (Morgan , 2009). عندها يصبح هرمون الشحمون الخصوي ثابت لاستهداف النسيج الهدف أو التحلل إلى منتجات غير نشطة التي تفرز في وقت لاحق (Guyton & Hall , 2000) . كما هو الحال مع الهرمونات الستيرويدية الأخرى مستويات الكلوبيولين الرابط وتركيز هرمون الشحمون الخصوي المرتبط يتأثر بالعديد من الوظائف وبعض الحالات المرضية في الانسان . ان تأثير هرمون الشحمون الخصوي يعود الى زيادة معدل تكوين البروتين في خلايا الهدف . لذلك يحفز هرمون الشحمون الخصوي إنتاج البروتينات في كل انحاء الجسم تقريبا ، على الرغم من أن أكثر البروتينات تحديدا تكون في الأجهزة أو الأنسجة الهدف (Morgan , 2009) . يتم استخدم تركيز هرمون الشحمون الخصوي بصورة رئيسة كعلامة للإجهاد الوظيفي ومؤشر للحالة البنائية بسبب تأثيره على زيادة كتلة الجسم النحيف و القوة العضلية لدى الرياضيين (Tremblay *et al.*; 2004) .

بينت الدراسات السابقة تأثير النشاط الفسيولوجي على مستويات هرمون الشحمون الخصوي في الدم واستخدم الهرمون لمراقبة استجابة الرياضي في التدريب والمنافسة (Kraemer *et al* ., 2004; Hoffman *et al* .,2002) . كما أكدت العديد من الدراسات ان هناك علاقة بين مستوى الهرمون , و الاقليمية والعدائية (Book *et al*., 2001) . ودراسات اخرى بينت أن مستويات الهرمون قد يكون لها تأثير على الأداء الرياضي (Doan *et al*., 2007) . هناك العديد من الوظائف لهرمون الشحمون الخصوي في الجسم والتي تشمل تطوير الخصائص الجنسية الأولية والثانوية ، ونمو العظام ، و إنتاج النطف ، و إنتاج خلايا الدم الحُمْر ، تنمية العضلات ، تحلل الدهون, وتخليق البروتين (Morgan , 2009) . كما انه ضروري لصيانة تخزين عملية سليفة النطف و ادامتها واعادتها عنده البلوغ , كذلك يؤثر على الرغبة الجنسية Libido , يحفز الايض Metabolism وله دور في دعم اعضاء الجهاز او القنوات التناسلية في الذكور (Roser , 2001; Martini , 2006) .

الهرمونات الستيرويدية ومنها الشحمون الخصوي يعمل على تنظيم العمليات الخلوية من خلال الارتباط بالغشاء الخلوي او المستقبلات النووية داخل الخلية والتي بدورها تتفاعل بشكل منفصل بتسلسلات النيوكلوتيدية التي تغير التعبير الجيني . ولأن أغلب مستقبلات خلايا الهدف تقع في السايتوبلازم Cytoplasm , الضرورية لتعبير الجيني داخل النواة . هذه العملية تستغرق على الاقل 30- 40 دقيقة . في المقابل الاجراءات التنظيمية الأخرى من الهرمونات الستيرويدية تتجلى في

غضون ثواني الى عدة دقائق هذه الفترات تكون سريعة وبعيدة للتغير في مستوى الجيني ولذلك يطلق مصطلح الافعال السريعة (Cato *et al*., 2002; Simoncini *et al*., 2004) .

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3. المواد Materials

1.1.3. الأجهزة والأدوات Instruments and Equipments

(3 -1) جدول يوضح الأجهزة والمواد المختبرية المستعملة في الدراسة :

ت	اسم الجهاز	الشركة	المنشأ
1	جهاز نبذ المركزي Centrifuge	Hettich	Germany
2	مجهر ضوئي Microscopic (MEIJI)	MT	Japan
3	حمام مائي Water bath	Memert	Germany
4	Elisa Reader	Biochrom	England
5	Elisa Shaker	Consort	Belgium
6	حامل أنابيب بارد Cold rack tubes	BIO BASIC INC.	USA
7	ماصة دقيقة سعة (1- 50) مايكرو لتر Micropipette	CYAN	Belgium
8	ماصة دقيقة سعة (1 - 100) مايكرو لتر Micropipette	CYAN	Belgium
9	ماصة دقيقة سعة (1- 1000) مايكرو لتر Micropipette	CYAN	Belgium
10	مازج Mixture	Exispin	Korea
11	ميزان حساس Sensitive balance	Sartorius MeterAE200	Germany
12	ميزان للوزن الحيوانات	Savories BL 3100 s	Germany
13	حاضنة Incubator	Memert	Germany

2.1. 3 العدد Kits

1.2.1.3. عدة فحص الأليزا ELISA Kits

جدول (3-2) يبين عدة فحص الأليزا المستخدمة في الدراسة الحالية :

ت	اسم عدة القياس	الشركة	المنشأ
1	عدة قياس هرمون FSH	ABO	Switzerland
	Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisastripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stopp solution: 6ml x 1bottle Standard (48 IU/L): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle		
2	عدة قياس هرمون LH	ABO	Switzerland
	Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisastripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stopp solution: 6ml x 1bottle Standard (80 ng/L): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle		
3	عدة قياس هرمون الشحمون الخصوي Testosterone	ABO	Switzerland
	Wash solution: 20ml x 1bottle HRP-Conjugate reagent: 6ml x 1bottle Microelisastripplate: 12well x 8strips Sample diluent: 6ml x 1bottle Chromogen solution A: 6ml x 1bottle Chromogen solution B: 6ml x 1bottle Stopp solution: 6ml x 1bottle Standard (320 nmol/L): 0.5ml x 1bottle Standard diluent: 1.5ml x 1bottle		

2.2.1.3. عدة تقنية الكيمياء النسجية المناعية

الجدول (3-3) العدد المستعملة في تقنية الكيمياء النسجية المناعية في الدراسة الحالية

ت	نوع العدة	الشركة	المنشأ
1	Anti- Follicle Stimulating Hormone FSH	US Biological	USA

		Monoclonal mouse (5900) to FSH Reacts with : mouse, rat , human at -20 c 0.2mg/ml	
USA	**US Biological**	**Anti- Luteinizing Hormone LH**	**2**
		Monoclonal mouse (7500) to LH Reacts with : mouse, rat , human at -20 c 0.1mg/ml	
USA	**US Biological**	**Anti - Testosterone**	**3**
		Rabbit polyclonal to Testosterone 0.2mg/ml at -20 c	
USA	**US Biological**	**Immunohistochemistry Detection Kit**	**4**
		Normal goat serum **Biotinylated anti - IgG** **Streptavidin** **Biotinlated HRP** **Liquid DAB** **DAB** **DAB buffer** **Detoxification buffer**	

3.2.1.3. المواد الكيميائية Chemical Material

جدول (3-4) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة :

ت	المادة الكيمائية	الشركة المصنعة	المنشأ
1	الثايموكوينون Thymoquinone	Sigma-Aldrich	UK
2	كيتامين Ketamine	Elsaadpharma	Syria
3	أيثانول Ethanol 100%	Sigma-Aldrich	UK
4	شمع بارافين Paraffin wax	Merk	Germany
5	فورمالين Formalin 10%	Labort	India
6	هيماتوكسلين Hematoxylin	Merk	Germany
7	ايوسين Eosin	Merk	Germany
8	زايلين Xyline	Milpharm	England

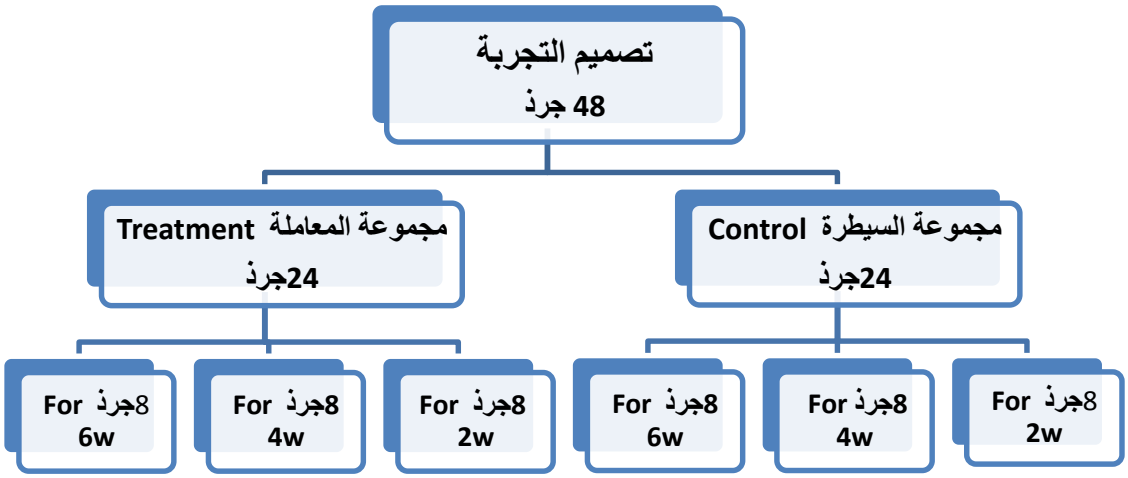
9	زايلازين Xylazine 2%	Alfasan	Holland

2.3 . حيوانات التجربة Experimental Animals

اجريت الدراسة الحالية في جامعة القادسية كلية الطب البيطري استخدمت ذكور الجرذان البيض Wester Rats في هذه الدراسة بوصفها عينة تمثل الحيوانات اللبونة . وتم الحصول على 48 ذكراً سوياً من البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري . وزعت الحيوانات على اقفاص بلاستكية بصورة عشوائية في ظروف مختبرية و مناسبة مجهزة بمقياس لتنظيم حرارة الغرفة ، إذ وضعت في أقفاص بلاستيكية بأبعاد 50 × 35 × 15 سم مغطاة بأغطية معدنية مشبكه ، ومجهزة بقناني خاصة لشرب الماء ذات سعة 500 مليلتر نهايتها مزودة بحلمة . فُرشت الأقفاص بنشارة الخشب وتمت العناية بنظافة الأقفاص وتبديل الفرشة وتعقيمها بالمطهرات بشكل دوري كل ثلاثة أيام . كانت درجة حرارة الغرفة التي وضعت فيها الحيوانات ما بين 23 –27 درجة مئوية ورطوبة 40 % و عرضت الحيوانات جميعها الى مدة الاضاءة نفسها بمعدل 12 ساعة تقريبا طول مدة الدراسة . وأعطيت الحيوانات العليقة الغذائية المختبرية القياسية (نسبة 19% من البروتين و 3000 سعره حرارية للطاقة) (الملحق-1) والماء بصورة حرة . وتركت الحيوانات لمدة أسبوع لتأقلم قبل بدأ التجربة .

3.3.تصميم التجربة Experimental Design

أستخدم في هذه التجربة 48 جرذ , ذكور البالغة بعمر 56 يوم , وكانت أوزانها تتراوح ما بين 120 - 122 غم , قسمت عشوائياً على مجموعتين كل مجموعة تشمل 24 جرذاً , الأولى تمثل السيطرة Control وجرعت محلول الملحي الفسيولوجي والثانية تمثل مجموعة المعاملة Treatment والتي جرعت بمعلق الثايموكوينون لمدة 42 يوم (ستة أسابيع) وقسمت بعد ذلك الى ثلاثة مجاميع متساوية بالاعتماد على مدة التجريع 2,4, 6 أسابيع تشمل كل مجموعة 8 جرذان وكما موضح في المخطط الآتي :



شكل (3-1) مخطط يوضح تصميم التجربة حسب مدة التجربة 2 , 4 , 6 أسبوع في المجاميع التجربة .

4.3. التضحية وسحب الدم

تمت التضحية بالمجموعة الاولى من الحيوانات بعد مرور أسبوعين من التجربة إذ تم التخدير بأستخدام مزيج من 0.3 مل من الكيتامين 0.1 مل من الزايلازين لكل كغم من وزن الجسم تحت

البريتون *I.P* , بعدها تم سحب عينات الدم من الوريد البطني Abdominal Vein مباشرة . ثم وضعت في أنابيب لا تحتوي على مانع التخثر EDTA ووضعت بصورة مائلة ثم وضعت بجهاز الطرد المركزي لغرض الحصول على مصل الدم وحفظت الانابيب بدرجة -20مْ لحين إجراء الاختبارات الهرمونية وذلك لقياس مستويات هرمون المحفز للجريب , والهرمون اللوتيني وهرمون الشحمون الخصوي (التستوستيرون) . كما استأصلت الخصى والنخامية وعزلت كل منها على حدة وأزيلت الأجزاء المتصلة بالعضو المستأصل ثم نشفت بواسطة ورق ترشيح بعدها تم قياس وزن العضو باستعمال ميزان حساس . و لغرض أجراء الدراسات النسجية والكيمياء النسجية المناعية Immunohistochemical (IHC) تم حفظ الاعضاء في الفورمالين بتركيز 10 % .

5.3.تحضير معلق الثايموكوينون Preparation of Thymoquinone Solution

حضر معلق الثايموكوينون Thymoquinone (TQ) بجرعة 50 ملغم / كغم من وزن الجسم Body Weight بحسب طريقة Kanter عام 2009 إذ تم اذابة 5 ملغم من الثايموكوينون في1 مل من ماء الشرب (5 ملغم / 100غم من وزن الجسم نحتاج معلق 1 مل من الثايموكوينون TQ) .

6.3 . المعايير المدروسة

1.6.3. الأختبارات الهرمونية Hormonal Test

1.1.6.3. تقدير تركيز هرمونFSH (IU/L) في المصل

يتم تقدير تركيز هرمون المحفز للجريب في المصل باستخدام جهاز Elisa حسب العدة المصنّعة من شركة (ABO, Switzerland) إذ تعتمد الطريقة على استخدام لوحة الخانات الحاوية على الجسم المضاد الخاص بهرمون المحفز للجريب , وتضاف العينات الى الخانات إذ يتحد الجسم المضاد للهرمون الموجد في الخانة والذي يعلم مع انزيم HRP مع المستضد الموجود في العينة ليتكون معقد انزيم الجسم المضاد للمستضد وبعد اكمال الغسل يضاف TMB والذي يصبح لونه ازرق عند التفاعل المحفز بالأنزيم HRP والذي ينتهي بإضافة محلول حامض الكبريتيك ويقاس تغير اللون بواسطة المطياف الضوئي عند الطول الموجي 450 نانومتر , ويحدد تركيز الهرمون في العينة من خلال مقارنة امتصاصية العينة مع المنحني القياسي وهذا المبدأ الذي يتم تحديد تركيز بقية الهرمونات . وحسب الطريقة الآتية :

1- ثبت العدد المناسب من الخانات على المسند الخاص بها والمجهز مع عدة الهرمون .

2- إضافة العينة Sample addition : يضاف 40 مايكروليتر من محلول تخفيف العينة و 10 مايكروليتر من العينة الى خانة عينة الاختبار وبالنهاية تخفف العينة خمس مرات . تبقى الخانة السوداء Blank على حدة إذ لا يضاف اليها العينة او HRP- Conjugate reagent , و يتكرر هذا في كل خطوة .

3- الحضن Incubation : بعد أن يتم تغطية اللوحة الحاوية على الخانات بغطاء اللوحة تُحضن اللوحة لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 م°.

4- نبذ السائل Configurate liquid : بعد كشف الغطاء عن اللوحة يتم اضافة محلول الغسل Washing لكل خانة ولمدة 30 ثانية في كل مرة , وتكرر خمس مرات ثم تترك لتجف.

5- إضافة الإنزيم Add Enzyme : تم إضافة 50 مايكروليتر من HRP-Conjugate reagent لكل خانة well , عدا الخانة السوداء .

6- تحضن Incubate العينات : مرة ثانية لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 م°.

7- ثم تغسل مرة ثانية لمدة 30 ثانية في كل مرة وتكرر خمس مرات وتترك لتجف .

8 - اللون Color : إضافة 50 مايكروليتر من محلول Chromogen Solution A ومحلول Chromogen Solution B الى كل خانة ، والابتعاد عن الضوء لمدة 15 دقيقة وفي37 م°.

9 - إيقاف التفاعل Stop Reaction : إضافة 50 مايكروليتر من محلول التوقف Stop solution لكل خانة ، إذ أنَّ توقف التفاعل يحصل عن تحول اللون الأزرق الى اللون الأصفر.

10- الفحص Assay : يتم التصفير مقابل الخانة السوداء Blank well ، تُقرأ الامتصاصية على طول موجي 450 نانوميتر بعد إضافة محلول التوقف بـ 15 دقيقة.
11- يرسم المنحني وذلك بوضع تراكيز المحاليل القياسية على المحور الأفقي وقيم الامتصاصية للعينات على المحور العمودي ويحدد مستوى الهرمون بناءً على ذلك .

2.1.6.3. تقدير تركيز هرمون LH (ng/L) في المصل

تم تقدير تركيز هرمون اللوتيني في المصل باستخدام جهاز Elisa وحسب العدة المصنعة من شركة (ABO, Switzerland) وكما يأتي :
1- ثبت العدد المناسب من الخانات على المسند الخاص بها والمجهز مع عدة الهرمون .
2- اضافة العينة Add Sample : تترك الخانة السوداء بدون اضافة العينة والانزيم في جميع الخطوات اللاحقة . يضاف 40 مايكروليتر من محلول تخفيف العينة و 10 مايكروليتر من العينة الى خانات عينة الاختبار وبالنهاية تخفف العينة خمس مرات .
3- الحضن Incubation : بعد تغطية اللوحة الحاوية على الخانات بغطاء اللوحة تُحضن اللوحة لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مº.
4- نبذ السائل Configurate liquid : بعد كشف الغطاء عن اللوحة يتم اضافة محلول الغسل Washing لكل خانة ولمدة 30ثانية في كل مرة , وتكرر خمس مرات ثم تترك لتجف .
5- إضافة الإنزيم Add enzyme : إضافة 50 مايكروليتر من HRP- Conjugate reagent لكل خانة well , عدا الخانة السوداءBlank .
6- تحضن Incubate العينات : مرة ثانية لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مº.
7 - ثم تغسل مرة ثانية لمدة 30 ثانية في كل مرة وتكرر خمس مرات وتترك لتجف .
8 - اللون Color : إضافة 50 مايكروليتر من محلول Chromogen Solution A ومحلول Chromogen Solution B الى كل خانة ، والابتعاد عن الضوء لمدة 15 دقيقة وفي 37 مº.
9 - إيقاف التفاعل Stop reaction : إضافة 50 مايكروليتر من محلول التوقف Stop solution لكل خانة ، إذ أنَّ توقف التفاعل يحصل عن تحول اللون الأزرق الى اللون الأصفر.
10- الفحصAssay : يتم التصفير مقابل الخانة Blank well ، تُقرأ الامتصاصية على طول موجي 450 نانوميتر بعد إضافة محلول التوقف بـ 15 دقيقة.
11- يرسم المنحني وذلك بوضع تراكيز المحاليل القياسية على المحور الأفقي وقيم الامتصاصية للعينات على المحور العمودي ويحدد مستوى الهرمون بناءً على ذلك .

3.1.6.3.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 (ABO, Switzerland) كما يأتي :
1- ثبت العدد المناسب من الحفر على المسند الخاص بها والمجهز مع طقم الهرمون .
2- اضافة العينة Add Sample : تترك الخانة السوداء بدون اضافة العينة و الانزيم في جميع الخطوات اللاحقة . يضاف 40 مايكروليتر من محلول تخفيف العينة و 10 مايكروليتر من العينة الى خانة عينة الاختبار وبالنهاية تخفف العينة خمس مرات .
3 – الحضن Incubation : بعد تغطية اللوحة الحاوية على الخانات بغطاء اللوحة تُحضن اللوحة لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 مº.
4- نبذ السائل Configurate liquid : بعد كشف الغطاء عن اللوحة يتم اضافة محلول الغسل Washing لكل خانة ولمدة 30ثانية في كل مرة , وتكرر خمس مرات ثم تترك لتجف.
5- إضافة الإنزيم Add enzyme : إضافة 50 مايكروليتر من HRP-Conjugate reagent لكل خانة well , عدا الخانة السوداء Blank .

6- تحضن Incubate : مرة ثانية لمدة 30 دقيقة بدرجة 37 م°.
7- ثم تغسل مرة ثانية لمدة 30 ثانية في كل مرة وتكرر خمس مرات وتترك لتجف .
8- اللون Color : إضافة 50 مايكروليتر من محلول Chromogen Solution A ومحلول Chromogen Solution B الى كل خانة ، والابتعاد عن الضوء لمدة 15 دقيقة وفي37م.°
9- إيقاف التفاعل Stop Reaction : إضافة 50 مايكروليتر من محلول التوقف Stop solution لكل خانة ، إذ أن توقف التفاعل يحصل عن تحول اللون الأزرق الى اللون الأصفر.
10- الفحص Assay : يتم التصفير مقابل الخانة Blank well ، تُقرأ الامتصاصية على طول موجي 450 نانوميتر بعد إضافة محلول التوقف بـ 15 دقيقة.
11- يرسم المنحني وذلك بوضع تراكيز المحاليل القياسية على المحور الأفقي وقيم الامتصاصية للعينات على المحور العمودي ويحدد مستوى الهرمون بناءً على ذلك .

7.3. الدراسة النسجية Histological Study

1.7.3. تحضير الشرائح النسجية

حضرت المقاطع النسجية اعتمادا على طريقة (1972) Humason , والتي تضمنت :

1 - التثبيت Fixation :

إبقاء النسيج على حالة التي كانت عليها في لحظة اقتطاع النموذج اي إبقاء تراكيب النسيج المجهرية في تلك الوضعية التي كانت علية أثناء الحياة واستخدم الفورمالين تركيز 10% للتثبيت .

2- الغسل Washing :

لإزالة اثأر المثبت الزائد الموجود في النسيج وكذلك التخلص من الرواسب التي يخلفها المثبت بواسطة ماء الحنفية لمرات عدة .

3- انتزاع الماء Dehydration :

وتتم عبرة سلسلة من التراكيز المتصاعدة للكحول الأثيلي (70 % , 80% , 90 %, 95 % , 100 %) , لسحب الماء من العينات .

4- الترويق Clearing :

لإزالة محلول الأنكاز واستبدالها بمحلول يمتزج مع شمع البارافين المنصهر , وتتم عملية الترويق بواسطة الزايلين Xylene لجعل النسيج شفافا رائقا .

5- الارتشاح والطمر Infiltration and Embedding :

تتم هذه العمليتين على التوالي باستعمال شمع البارا فين الذائب بدرجة حرارة 56 – 58 مئوية بتكرار مرتين لمدة زمنية تتراوح ما بين الساعة إلى الساعتين .

حضرت المقاطع النسجية باستخدام المشراح اليدوي Rotary Microtome بسمك 5 مايكرومتر للمقطع الواحد . وقد ثبتت مقاطع الشريط على الشرائح الزجاجية باستعمال ألبومين ماير Mayer's albumin المحضر اعتماداً على (1985) Vacca , ثم صبغت جميع المقاطع النسجية بصبغة هيماتوكسلين – ايوسين , ثم أجريت عملية الإرساء Mounting إذ تمت تغطية الشرائح النسجية بالغطاء الزجاجي باستعمال مادة كندا بلسم Canada Balsam .

2.7.3 . التغيرات النسجية في الخصية

تم فحص الشرائح النسجية للأعضاء (الخصى والغدة النخامية) بأَستخدام المجهر Olympus إذ أخذت شريحتان لكل حيوان عشوائياً لغرض دراسة المعايير الآتية :

1.2.7.3 . أقطار النبيبات ناقلة المني في الخصية

أستعمل المقياس العيني الدقيق Ocular micrometer بعد معايرته بالمقياس المنضدي الدقيق Stage micrometer لحساب متوسط القطرين الأفقي والعمودي لخمسة نبيبات منتظمة الشكل من كل شريحة (Al-Ahmed , 2013).

2.2.7.3 . سمك بطانة النبيب ناقل المني

أستعمل المقياس العيني الدقيق في قياس سمك بطانة النبيب إبتداءً من الحافة الداخلية للغشاء القاعدي للنبيب وحتى بداية التجويف المركزي , وقد تم الاعتماد على معدل قراءتين ضمن النبيب الواحد باستعمال قوة التكبير 40 x (Al-Ahmed , 2013) .

3.2.7.3. معدل خلايا لايدك

تم حساب أعداد خلايا لايدك الواقعة بين ثلاث نبيبات منوية وعدها في مواقع عدة بالنسبة للنموذج باستخدام المقياس العيني الدقيق Ocular micrometer إذ حددت بواسطة المسطرة واخذ معدل الخلايا بالعدسة الشيئية بقوة تكبير 40x (Alwachi &Balash,1988) .

4.2.7.3. معدل خلايا سرتولي

تم حساب أعداد خلايا سرتولي الموجودة داخل النبيب المنوي ومن ثم عدها في مواقع عدة من النبيب المنوي لكل حيوان إذ يتم تحديدها باستخدام العدسة العينية والحساب على قوة 40x واخذ المعدل لها (Alwachi *et al*,.1986) .

8.3. تقنية الكيميائية – النسجية – المناعية :

Immunohistochemistry – Paraffin protocol (IHC)

طبقاً لتعليمات الشركة المصنعة(US Biological ;www.Biological.com/technical) 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 بأَستعمال كواشف التحقق اللوني ، والتي فيها يرتبط الإنزيم بتجويف الجسم المضاد Antibody لإنتاج الرواسب اللونية في موقع البروتين , أو الكشف الفلورسنت , ويمكن أن تكون الأجسام المضادة Antibody مصورة بأَستخدام المجهر فلورسنت . الخطوات الأساسية للبروتوكول IHC هي على النحو الآتي :

اليوم الاول

A . تحضير الشرائح

1 . ازالة الشمع : تتم بواسطة وضع الشرائح بالزايلين Xylene مرتين لمدة 15 دقيقة لكل مرة .

2 . استرجاع الماء: وذلك بتمرير الشرائح بترا كيز متتالية تنازلية من الكحولات 100 % I , II%100 , 95 % , 90% , 80 % , 70% لمدة 5 دقائق لكل تركيز . فيما بعد تحضن في الماء لمدة 5 دقائق .

B . بروتكول التصبيغ

1. توضع الشرائح في بيروكسيد الهايدروجين H_2O_2 بتركيز 3.0 % يخفف بالماء المقطر لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة .

2 . تغسل بالماء المقطر ثم بواسطة المحلول الملحي المنظم فوسفيت بفر سلاين PBS ,الاس الهايدروجيني PH له 7.4 . ثم يحوط نسيج بواسطة قلم خاص للمناعة Pan pen .

3 . تحضن الشرائح بتركيز1% من مصل الطبيعي Normal serum المخفف بواسطة PBS (ويحضر التركيز بخلط 3.5 مل x 1 PBS , PH = 7.4 مع 35 ul من محلول A (مصل الطبيعي) في انبوبة لمدة 30 دقيقة) , 35 ul مايكروليتر تقريبا قطرة .

4 . يزال المصل من الشرائح.
5 . تحضن الشرائح مع الجسم المضاد المخفف ب PBS (يعتمد على الباحث في تحديد التخفيف الامثل) وبعد ان يتم معايرته قبل الاستخدام يتم الحضن في غرفة رطبة من ساعة الى طول الليل بدرجة حرارة الغرقة . المقاطع النسجية المأخوذة من الغدة النخامية تغلي مع محلول سترات بفر Citrate buffer , الاس الهايدروجيني له PH 6.0 لمدة ربع ساعة , بعد ذلك تترك لتبرد بدرجة حرارة الغرفة لاسترجاع المستضد قبل المعاملة مع الاجسام المضادة .

اليوم الثاني

6 . تشطف الشرائح3 مرات بواسطة PBS لمدة 5 دقائق .
7. تحضن الشرائح مع محلول B IGg (Biotin) المخفف بواسطة PBS لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة .
8. تغسل 3 مرات مع PBS لمدة 5 دقائق .
9. تحضير محلول التحقيق (يخلط 1.3 مل من PBS , 35 ul من محلول A , 35 ul من محلول B في انبوبة ويحضن المخلوط بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة قبل الاستعمال .
10. إضافة محلول التحقق المحضر بالخطوة السابقة للمقاطع النسجية . وتحضن بدرجة حراة الغرفة لمدة 30 دقيقة .
11. نغسل الشرائح3 مرات مع PBS x 1لمدة 5 دقائق لكل مرة .
12. تحضير محلول التنمية (يحضر بخلط 1.6مل من بفر DAP و 35 ul من محلول DAP F) في انبوبة .
13. يتم اضافة محلول Development ليغطي النسيج لمدة 5 – 30 دقيقة .
14. يوقف التفاعل بوضعة في الماء .
15. تصبغ الأرضية اذا تتطلب (بأستعمال الهيماتوكسين للتصبيغ النواة والايوسين للتصبيغ السايتوبلازم cytosol) . ثم تغطى الشرائح بواسطة غطاء الشريحة وتفحص الشرائح تحت المجهر .

9.3. التحليل الاحصائي

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي بهدف معرفة الفروق المعنوية بين معدلات المعايير المدروسة وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى احتمال ($P<0.05$) باستخدام برنامج SPSS, الإصدار (2010) كما شمل التحليل الإحصائي استخراج المعدل Mean والخطأ القياسي Standard Error (SE).

4. النتائج

1.4. المشاهدات السريرية Clinical Observations

أظهرت ذكور الجرذان المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم/كغم من وزن الجسم) نشاطاً طبيعياً أثناء مدة التجربة التي امتدت الى 42 يوماً (ستة أسابيع) , اذ كان اقبالها على تناول ماء الشرب والعلف طبيعياً بالمقارنة مع حيوانات السيطرة.

2.4. المعايير الوزنية

1.2.4. الكسب الوزني للجسم Body Weight gain

بينت النتائج المبينة في الجدول (4-1) عن وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدل الكسب الوزاني لذكور الجرذان المعاملة بمعلق الثايموكوينون بالمقارنة مع السيطرة خلال أسابيع التجربة

الست , فقد بدأت معنوية الفروق تظهر إعتباراً من نهاية الأسبوع الثاني والتي بلغت (44.89± 1.39) غم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (17.37±0.73) غم أستمرت الزيادة في فرق الوزن خلال الأسبوع الرابع والتي بلغت (62.25± 1.08)غم في حين بلغ معدل السيطرة (34± 1.0) ووصلت الزيادة ذروتها في الأسبوع السادس والتي بلغت (78.25 ± 3.55) اما السيطرة (49± 0.08) غم .

جدول (4-1) تأثير المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم/ كغم من وزن الجسم) لمدة 6 أسابيع على معدل الكسب الوزني لذكور الجرذان الناضجة .

مجموعات / وزن الجسم	السيطرة			المعاملة		
	$2w^{nd}$	$4w^{th}$	$6w^{th}$	$2w^{nd}$	$4w^{th}$	$6w^{th}$
الوزن الابتدائي غم	± 121 0.378 a	± 120.11 0.295 a	± 122 0.626 a	± 120 0.422 a	±121 0.368 a	± 120 0.327 a
الوزن النهائي غم	± 138.37 2.14 a	±156 2.179 a	± 170 2.099 a	±165 2.672 b	±182.25 2.32 b	± 198.25 1.287 b
معدل الكسب الوزني غم	± 17.37 0.73 a	± 34 1.0 a	± 49 0.08 a	± 44.89 1.39 b	± 62.25 1.08 b	± 78.25 3.55 b

- **النتائج تمثل المعدلات ±الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة الصغيرة تشير إلى وجود فروق معنوية (P< 0.05) بين المجموعتين لكل مدة .**
- **حيوانات السيطرة تناولت ماء المقطر يومياً لمدة 6 أسابيع .**
- **حيوانات المعاملة تناولت معلق الثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم يومياً لمدة 2, 4 ,6 أسبوع .**

2.2.4. أوزان الاعضاء

1.2.2.4. الوزن النسبي للخصية Relative weight Testes

يوضح الجدول (4-2) معدل أوزان الخصى النسبية (ملغم/100غم من وزن الجسم) على مدة التجربة في الحيوانات المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم / كغم من وزن الجسم) ومجموعة السيطرة إذ أظهر التحليل ٱلإحصائي وجود فروق معنوية (P<0.05) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة في مراحل الدراسة الثلاث ومجموعة المعاملة , اذ بلغت المعدلات لمجموعتي التجربة في الأسبوع

الثاني (0.705±0.01) و (0.638±0.007) غم/100غم في الأسبوع الرابع (0.859±0.014) و (0.641±0.002) غم/ 100غم وفي الأسبوع السادس (0.868±0.004) و(0.699 ± 0.014) غم / 100غم كما و بينت النتائج التحليل الإحصائي ان هنالك زيادة معنوياً ($P<0.05$) بين الفترات لكل مجموعة معاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة .

3.2.2.4. الوزن النسبي للنخامية Relative weight Pituitary

أدت معاملة الحيوانات بمعلق الثايموكوينون الى زيادة معدل أوزان النخامية النسبية معنوياً ($P<0.05$) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة في مراحل الدراسة الثلاث , اذ بلغت المعدلات لمجموعتي التجربة في الأسبوع الثاني للسيطرة والمعاملة على التوالي (2.7±0.14) و (3.86 ± 0.03) و وفي الأسبوع الرابع (3.15±0.02) و (4.71±0.02) وفي الأسبوع السادس (3.47±0.02) و(4.81±0.02) ملغم / 100غم وعند اجراء المقارنة بين الفترات لكل مجموعة , بينت النتائج ان هنالك زيادة معنوياً ($P<0.05$) للمدة الزمنية نفسها لكل مجموعة معاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة (جدول 4-2) .

جدول (4-2) تأثير المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم/ كغم) من وزن الجسم لمدة 6 أسابيع على معدلات أوزان الخصى والنخامية /100غم من وزن الجسم .

المجاميع / المعاير	السيطرة			المعاملة		
	2wnd	4wth	6wth	2wnd	4w^{h}	6wth
وزن الخصية النسبي (غم/100 غم)	± 0.638 0. 007 Aa	± 0.641 0.002 Aa	± 0.699 0.014 Ab	± 0.705 0.010 Ba	± 0.859 0.014 Bb	± 0.868 0.004 Bc
وزن النخامية النسبي (ملغم/100غم)	± 2.7 0.14 Aa	±3.15 0.02 Ab	±3.47 0.02 Ac	±3.86 0.04 Ba	±4.71 0.02 Bb	±4.81 0.02 Bc

- **النتائج تمثل المعدلات ±الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة الصغيرة تشير إلى وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين المدد لكل مجموعة .**

- **الحروف المختلفة الكبيرة تشير إلى وجود فروق معنوية (P<0.05) بين المجموعتين لكل مدة .**
- **حيوانات السيطرة تناولت ماء المقطر يومياً لمدة 6 أسابيع .**
- **حيوانات المعاملة تناولت معلق الثايموكوينون بتركيز 50 ملغم/ كغم من وزن الجسم .**

3.4. التغيرات الهرمونية

1.3.4. هرمون المحفز للجريب

أدت معاملة الحيوانات بمعلق الثايموكوينون الى زيادة معنوية (P<0.05) بمعدل مستوى تركيز هرمون المحفز للجريب بالمقارنة مع مجموعة السيطرة في مراحل الدراسة الثلاث , اذ بلغت المعدلات لمجموعتي التجربة في الأسبوع الثاني (0.833 ±0.003) اما مجموعة السيطرة (0.619 ±0.007) وفي الأسبوع الرابع (0.999±0.003) اما مجموعة السيطرة (0.824± 0.011) وفي الأسبوع السادس (1.757±0.021) اما مجموعة السيطرة (1.434±0.012) وحدة دولية /مل . وعند اجراء المقارنة بين الفترات لكل مجموعة بينت النتائج ان هنالك زيادة معنوية (P<0.05) بين الفترات لكل مجموعة معاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة (جدول 4-3).

2.3.4. الهرمون اللوتيني

أدت معاملة الحيوانات بمعلق الثايموكوينون الى وجود زيادة معنوية (P<0.05) بمعدل مستوى تركيز الهرمون اللوتيني بالمقارنة مع مجموعة السيطرة في مراحل الدراسة الاولى والثانية , اما بالنسبة للمجموعة الثالثة فقد ادى الى انخفاض معنوياً (P>0.05) , اذ بلغت المعدلات لمجموعتي التجربة في الأسبوع الثاني (0.688±0.003) اما مجموعة السيطرة (0.595±0.07) نانوغرام /مل وفي الأسبوع الرابع (1.241±0.019) في حين كانت مجموعة السيطرة (0.813±0.043) , وفي الأسبوع السادس(1.324±0.021) اما مجموعة السيطرة (0.951 ±0.081) نانوغرام /مل . وعند اجراء المقارنة بين الفترات لكل مجموعة بينت النتائج ان هنالك ارتفاعاً معنوياً (P<0.05) بين الفترات لكل من الأسبوعين الثاني والرابع مقارنة مع مجموعة السيطرة ما عدا الأسبوع السادس حيت اظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً (P>0.05) في مجموعة المعاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة لنفس الفترة (جدول 4-3) .

3.3.4. هرمون الشحمون الخصوي

أدت معاملة الحيوانات بمعلق الثايموكوينون الى زيادة معنوية (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 (0.820 ±0.014) اما مجموعة السيطرة

(0.01±0.381) وفي الأسبوع الرابع (0.185±1.018) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة اذ بلغت (0.016±0.466) وفي الأسبوع السادس (0.014±1.961) اما مجموعة السيطرة (0.012±0.541) نانوغرام /مل . وعند اجراء المقارنة بين الفترات لكل مجموعة بينت النتائج ان هنالك زيادة معنوية ($P<0.05$) بين الفترات لكل مجموعة معاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة (جدول 4-3).

جدول (4-3) تأثير المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم/ كغم) من وزن الجسم لمدة 6 أسابيع على مدة أسبوعين , اربعة , ستة أسابيع في مستوى بعض الهرمونات في ذكور الجرذان .

المجاميع / الهرمونات	السيطرة C			المعاملة T		
	2wnd	4wth	6wth	2wnd	4wth	6wth
تركيز هرمون الشحمون الخصوي نانوغرام / مل	± 0.381 0.01 Aa	± 0.466 0.016 Ab	± 0.541 0.012 Ac	± 0.820 0.014 Ba	± 1.018 0. 185 Ba	± 1.961 0.014 Bb
تركيز الهرمون اللوتيني ng/ml	± 0.595 0.07 Aa	±0.813 0.043 Ab	±1.326 0.021 Ac	±0.688 0.013 Ba	±1.241 0.019 Bb	± 0.951 0.018 Bc
تركيز الهرمون المحفز للجريب U/ml	±0.619 0.007 Aa	±0.824 0.011 Ab	±1.434 0.012 Ac	± 0.883 0.003 Ba	±0.999 0.003 Bb	±1.757 0.021 Bc

- **النتائج تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة الصغيرة تشير الى وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين المدد لكل مجموعة .**
- **الحروف المختلفة الكبيرة تشير الى وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين المجموعتين لكل مدة**
- **حيوانات السيطرة تناولت ماء المقطر يومياً لمدة 6 أسابيع .**
- **حيوانات المعاملة تناولت معلق الثايموكوينون 50 ملغم / كغم من وزن الجسم .**

4.4. الدراسة النسجية

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تغيرات ايجابية في معايير انسجة الخصى والغدة النخامية لذكور الجرذان المعاملة بمعلق الثايموكوينون بجرعة (50 ملغم /كغم من وزن الجسم) , وقد كانت النتائج اكثر وضوحاً في مرحلة 6 اسابيع بالمقارنة مع مرحلتي الأسبوعين والاربعة اسابيع , الا ان تلك التغيرات كانت أفضل مما ظهر لذكور السيطرة .

1.4.4. التغيرات في التركيب النسجي للخصية

1.1.4.4. أقطار النبيبات ناقلة المني وسمك جدرانها

أظهرت النتائج النسجية لأنسجة الخصى كما في الجدول (4 - 6) وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات أقطار النبيبات ناقلة المني وسمك جدرانها في ذكور الجرذان مجموعة المعاملة لأسبوعين و أربعة وستة , مقارنة مع مجموعة السيطرة كما كانت هناك زيادة معنوية عند المقارنة ما بين مجموعة المعاملة والسيطرة إذ بلغ معدل قطر النبيب ناقل المني بالمقارنة مع مجموعة السيطرة في الأسبوع الثاني (311.25 ± 1.77) مايكروميتر وفي مجموعة السيطرة كان (282.5 ±3.937) مايكروميتر , اما في الأسبوع الرابع والسادس كان قطر النبيب المنوي (327.625 ±1.668, 352.875± 2.183) مايكروميتر على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة في الأسبوع الرابع (290.625±3.196) و الأسبوع السادس (303 ±5.255) .

اما سمك جدران النبيب المنوي, فبلغ في الأسبوع الثاني والرابع والسادس (41.375 ± 1.252 , 54.25±1.346 , 85.375 ±1.802) على التوالي مايكروميتر اما المعاملة فبلغ فيها سمك الجدار على التوالي (73.375±3.479 , 97.875±1.042 , 121.625 ± 1.657) مايكروميتر كما في جدول (4-4) والشكل (4-1) .

2.1.4.4. معدل خلايا لايدك وسرتولي

بينت الدراسة الحالية حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) ايجابية في كل من خلايا لايدك وخلايا سرتولي في المجاميع المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم/كغم من وزن الجسم) , مقارنة مع مجاميع السيطرة . في حين لم تسجل فروق معنوية في معدلات أعداد خلايا لايدك بين المجاميع المعاملة إذ بلغت على مدد التجربة (21.5 ± 0.26 , 25.37 ± 0.32 , 25.12± 0.71) خلية

على التوالي , في كانت في مجموعة السيطرة (15.75 ± 0.25 , 17.25 ± 0.25 , 19.12 ±0.35) خلية على التوالي .

كذلك الحال بالنسبة لخلايا سرتولي إذ نلاحظ الزيادة المعنوية ($P<0.05$) في معدلات أعداد خلايا سرتولي عند مقارنة كل من مجموعة المعاملة والسيطرة إذ ارتفعت من (15.62 ± 0.3 , 18.75 ±0.4 , 20.12 ± 0.2) الى (21.25± 0.7 , 26.5 ± 0.6 , 29.75 ±1.1) خلية على التوالي بحسب مدة التجربة , ومن جانب اخر يلاحظ الفروق المعنوية بين المجموعة المعاملة ومجموعة السيطرة عند المقارنة فيما بينها (الجدول4-4) والشكل (4-2) .

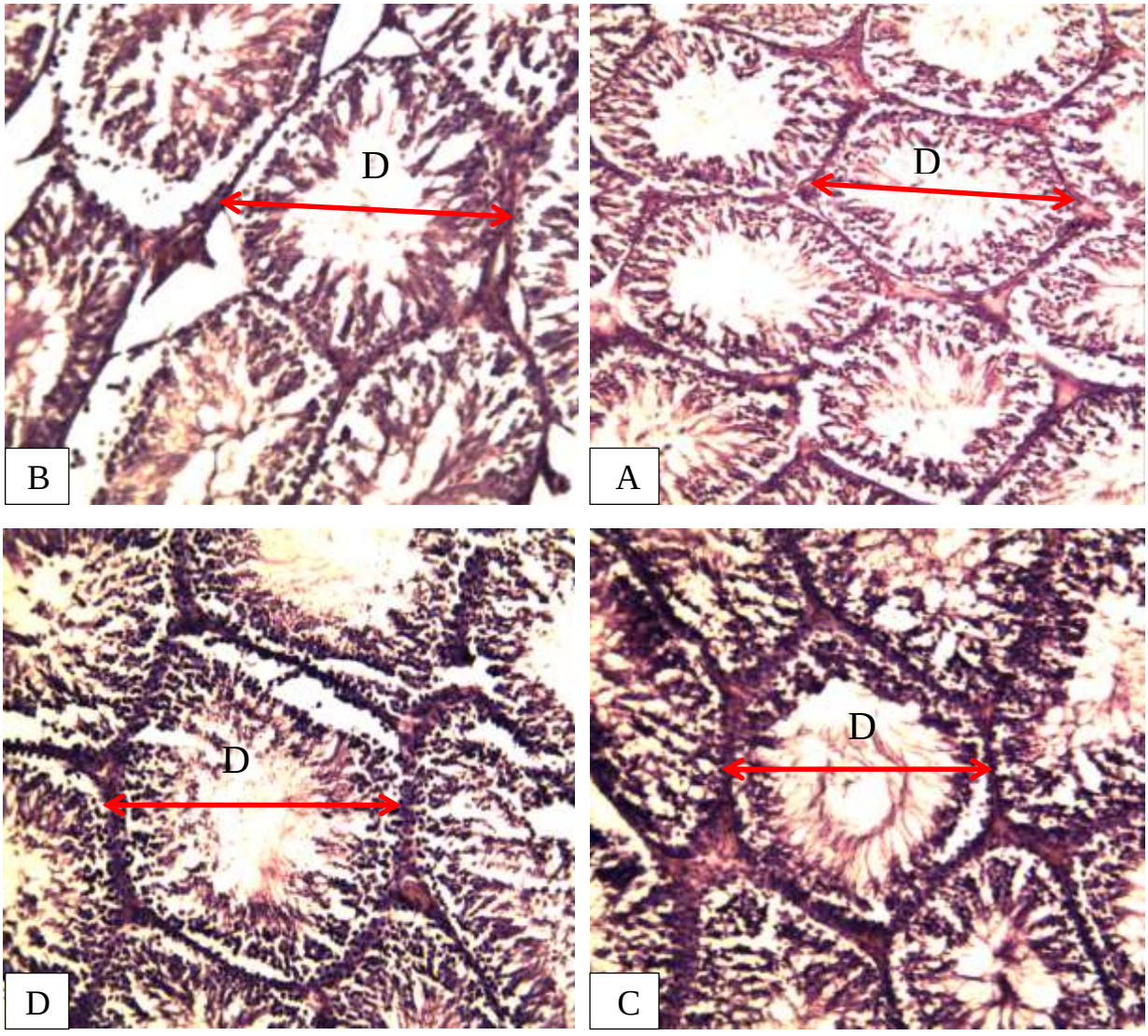
جدول (4- 4) تأثير المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم/ كغم) من وزن الجسم لمدة 6 أسابيع على مدة أسبوعين , اربعة , ستة أسابيع في بعض المعايير النسجية في خصى ذكور الجرذان الناضجة .

المجاميع / المعايير	السيطرة			المعاملة		
	2wnd	4wth	6wth	2wnd	4wth	6wth
قطر النبيب المنوي (مايكروميتر)	±282.5 3.937 Aa	±290.62 3.196 Ab	±303 5.255 Ac	±311.25 1.77 Ba	±327.62 1.668 Bb	±352.87 2.183 Bc
سمك جدار النبيب المنوي (مايكروميتر)	±41.375 1.252 Aa	±59.25 1.346 Ab	±85.375 1.802 Ac	±73.375 3.479 Ba	±97.875 1.042 Bb	±121.625 1.657 Bc
معدل أعداد خلايا لايدك	±15.75 0.25 Aa	±17.25 0.25 Ab	±19.12 0.35 Ac	± 21.5 0.26 Ba	±25.37 0.32 Bb	±25.12 0.71 Bc
معدل أعداد خلايا سرتولي	±15.62 0.32 Aa	±18.75 0.41 Ab	± 20.12 0.22 Ac	±21.25 0.7 Ba	±26.5 0.65 Bb	±29.75 1.12 Bc

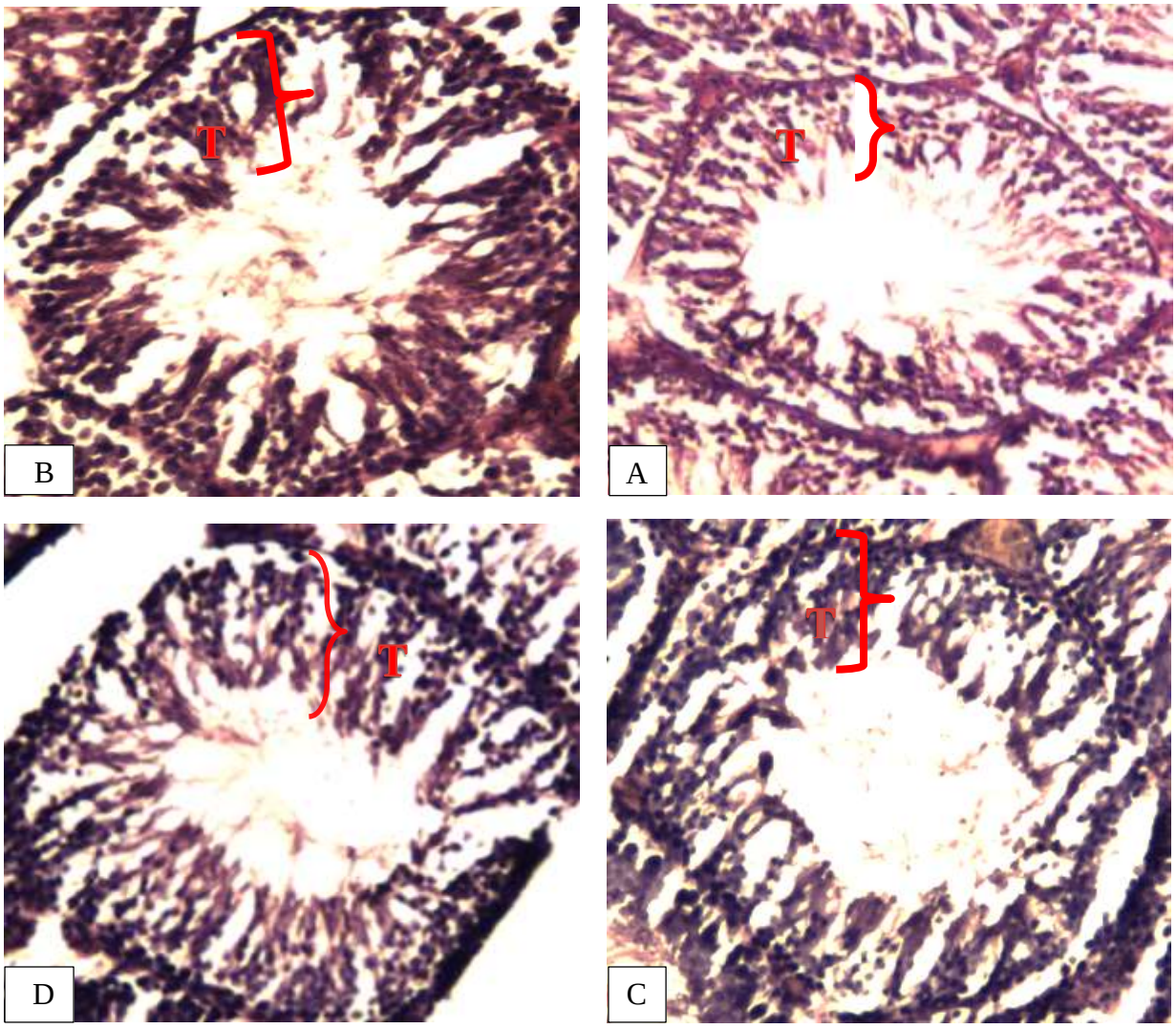
- **النتائج تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة الصغيرة تشير الى وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين المدد لكل مجموعة .**
- **الحروف المختلفة الكبيرة تشير الى وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين مدد المجموعتين لكل مدة .**
- **حيوانات السيطرة تناولت ماء المقطر يومياً لمدة 6 أسابيع .**
- **حيوانات المعاملة تناولت معلق الثايموكوينون 50 ملغم / كغم من وزن الجسم .**

2.4.4. التغيرات النسجية للنخامية

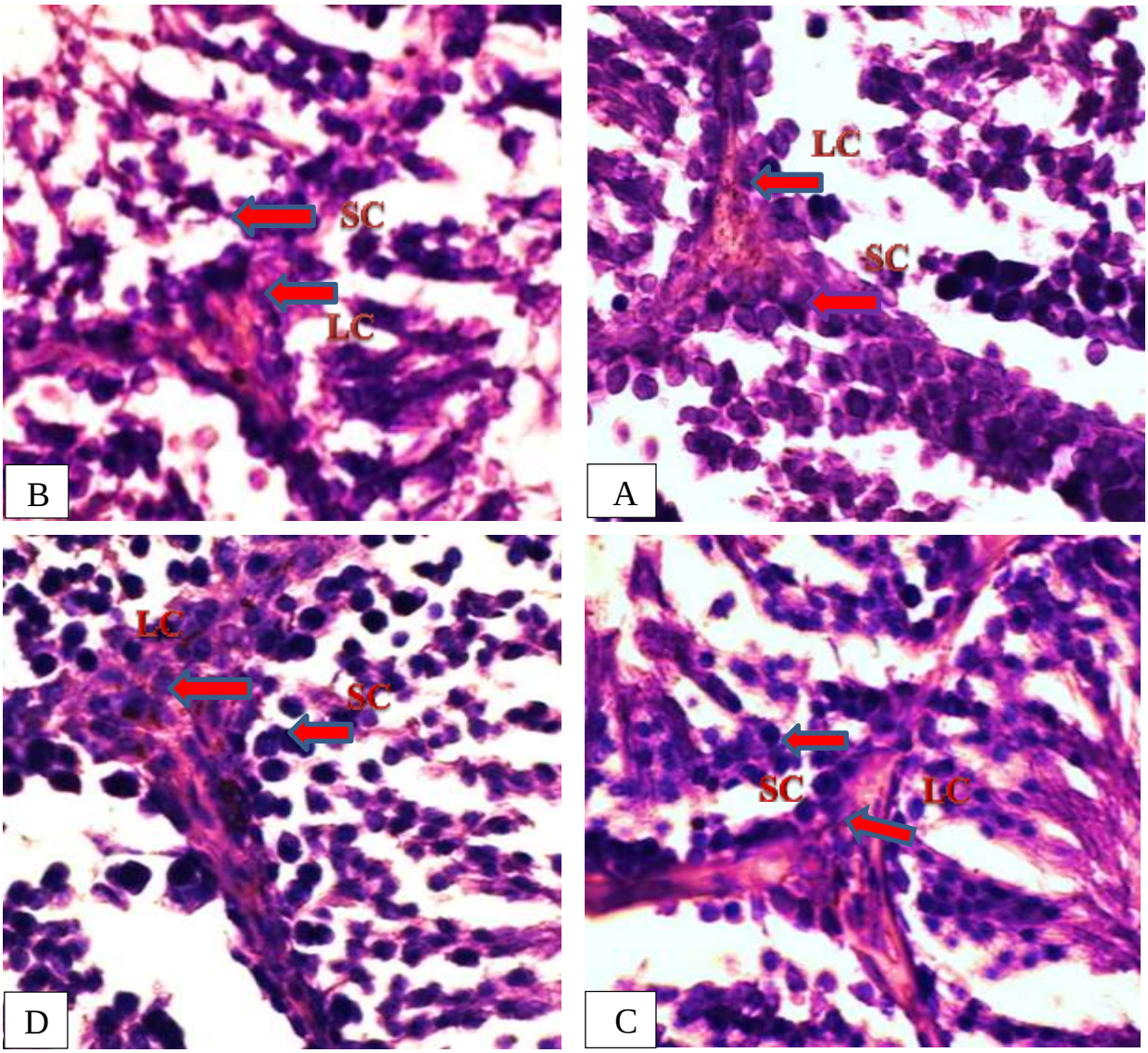
أظهرت المقاطع النسجية للغدة النخامية للمجاميع المعاملة بمعلق الثايموكوينون (50 ملغم/كغم من وزن الجسم) , ان هنالك تحسناً إيجابياً في الخلايا محرضة للقند Gonadotrophs المنتجة لهرموني المحفز للجريب والهرمون اللوتيني في كل من مجاميع السيطرة والمعاملة في الأسبوع الثاني والرابع والسادس مقارنة مع مجموعة السيطرة وبحسب ما هو موضح في الشكل (4-3) .



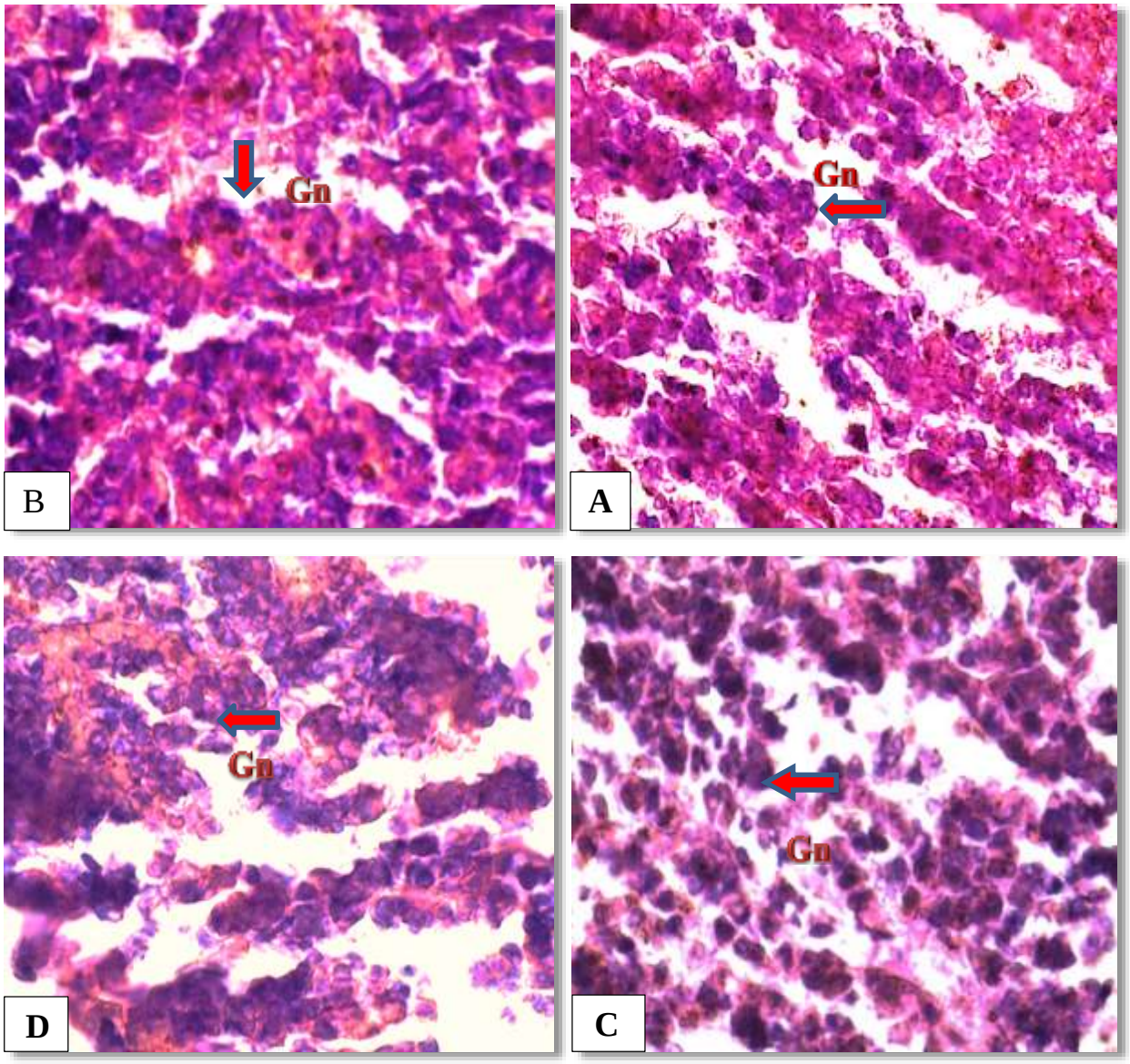
شكل (4 – 1) يوضح قطر النبيب ناقل المني Diameter في خصى الذكور السيطرة (A) والمجاميع المعاملة (B-C-D) لمدد التجربة (2-4-6) أسبوع من التجريع بمعلق الثايموكوينون TQإذ نلاحظ تزايد في قطر النبيب في انسجة الخصى هيماتوكسلين _ايوسين X125 .



شكل (4 – 2) توضح سمك Thickness البطانة في النبيب ناقل المني لخصى الذكور السيطرة (A) والمجاميع المعاملة بمعلق الثايموكوينون TQ (B-C-D) لمدد التجربة (2-4-6) أسبوع من التجريع إذ نلاحظ تزايد سمك النبيب في انسجة الخصى هيماتوكسلين _ايوسين X500 .



شكل (4 - 3) توضح خلايا لايدك LC وسرتولي SC في خصى الذكور السيطرة (A) والمجاميع المعاملة (B-C-D) لمدد التجربة (2-4-6) أسبوع من التجريع بمعلق الثايموكوينون TQإذ نلاحظ تزايد في اعداد خلايا لايدك وسرتولي في انسجة الخصى هيماتوكسلين _ايوسين X 500 .



شكل (4 -4) يوضح الخلايا محرضة للقند Gn في انسجة النخام الغدي للنخامية لذكور الجرذان . السيطرة (A) والمعاملة (B-C-D) خلال مدة (2 - 4 – 6) أسبوع إذ نلاحظ تزايد في اعداد الخلايا المحرضة للقند المنتجة للهرمون اللوتيني LH والمحفز للجريب FSH هيماتوكسلين _ايوسين X 500 .

4.5. الدراسة النسجية الكيميائية المناعية Immunohistochemical Study

1.4.5. تعبير هرمون المحفز للجريب FSH في انسجة النخام الغدي للنخامية

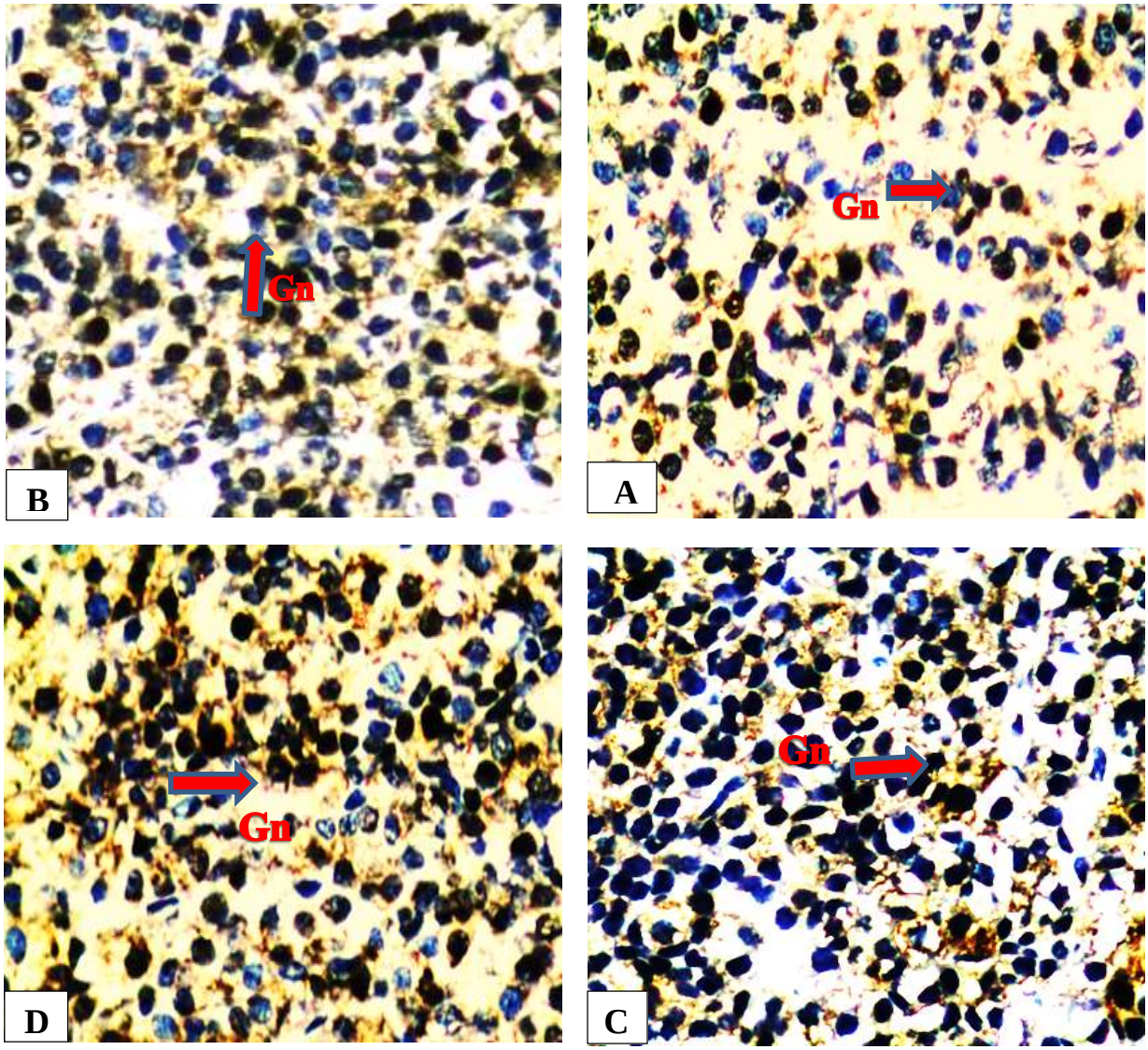
أظهرت نتائج الدراسة الحالية للتفاعل المناعي لدراسة الكيمياء النسجية المناعية لهرمون المحفز للجريبات في انسجة النخام الغدي للنخامية لذكور الجرذان كثافة التفاعل المناعي الايجابي وقُوته للهرمون المحفز للجريب في الخلايا المحرضة للقند Gonadotrophs والتي تعتمد على عدد الخلايا محرضة للقند والمنتجة للهرمون , إذ ظهرت قوة التفاعل الايجابي في الأسبوع الثاني والرابع والسادس في المجاميع المعاملة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي اظهرت ضعفاً واضحاً في التفاعل المناعي للخلايا المنتجة للهرمون المحفز للجريب (الشكل 4-5).

2.4.5. تعبير هرمون اللوتيني LH في انسجة النخام الغدي للنخامية

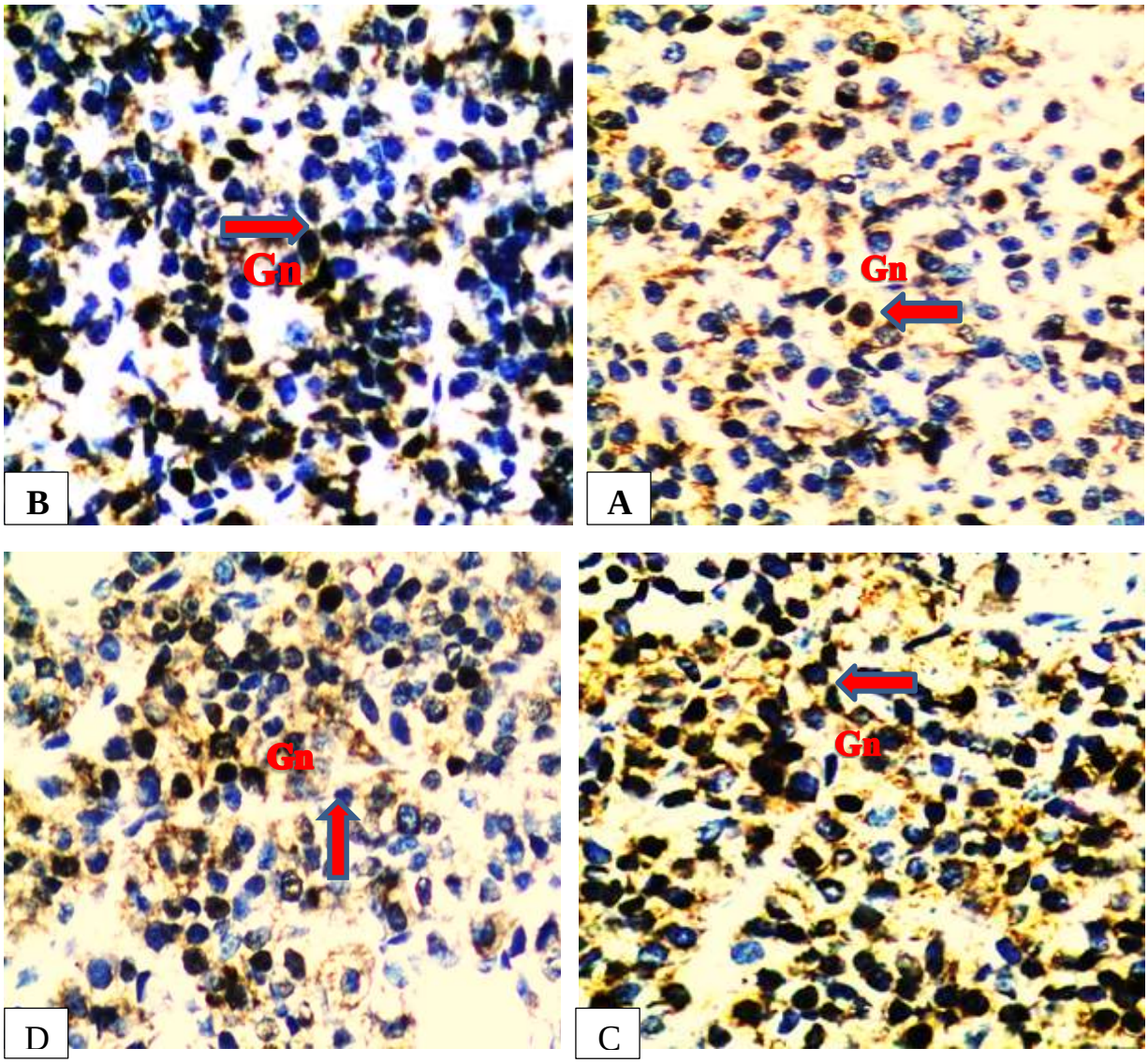
أظهرت نتائج الدراسة الحالية للتفاعل المناعي لدراسة الكيمياء النسجية المناعية للهرمون اللوتيني في انسجة النخام الغدي للنخامية لذكور الجرذان كثافة التفاعل المناعي الايجابي وقُوته للهرمون المحفز للجريب في الخلايا محرضة للقند Gonadotrophs والتي تعتمد على عدد الخلايا محرضة للقند والمنتجة للهرمون , إذ ظهرت قوة التفاعل الايجابي في الأسبوع الثاني والرابع اما في الأسبوع السادس فقد بينت النتائج ضعف في قوة وكثافة التفاعل المناعي للخلايا المنتجة للهرمون اللوتيني في المجاميع المعاملة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي اظهرت ضعفاً واضحاً في التفاعل المناعي للخلايا المنتجة للهرمون اللوتيني (4 - 6).

3.4.5. تعبير هرمون الشحمون الخصوي T في انسجة الخصى

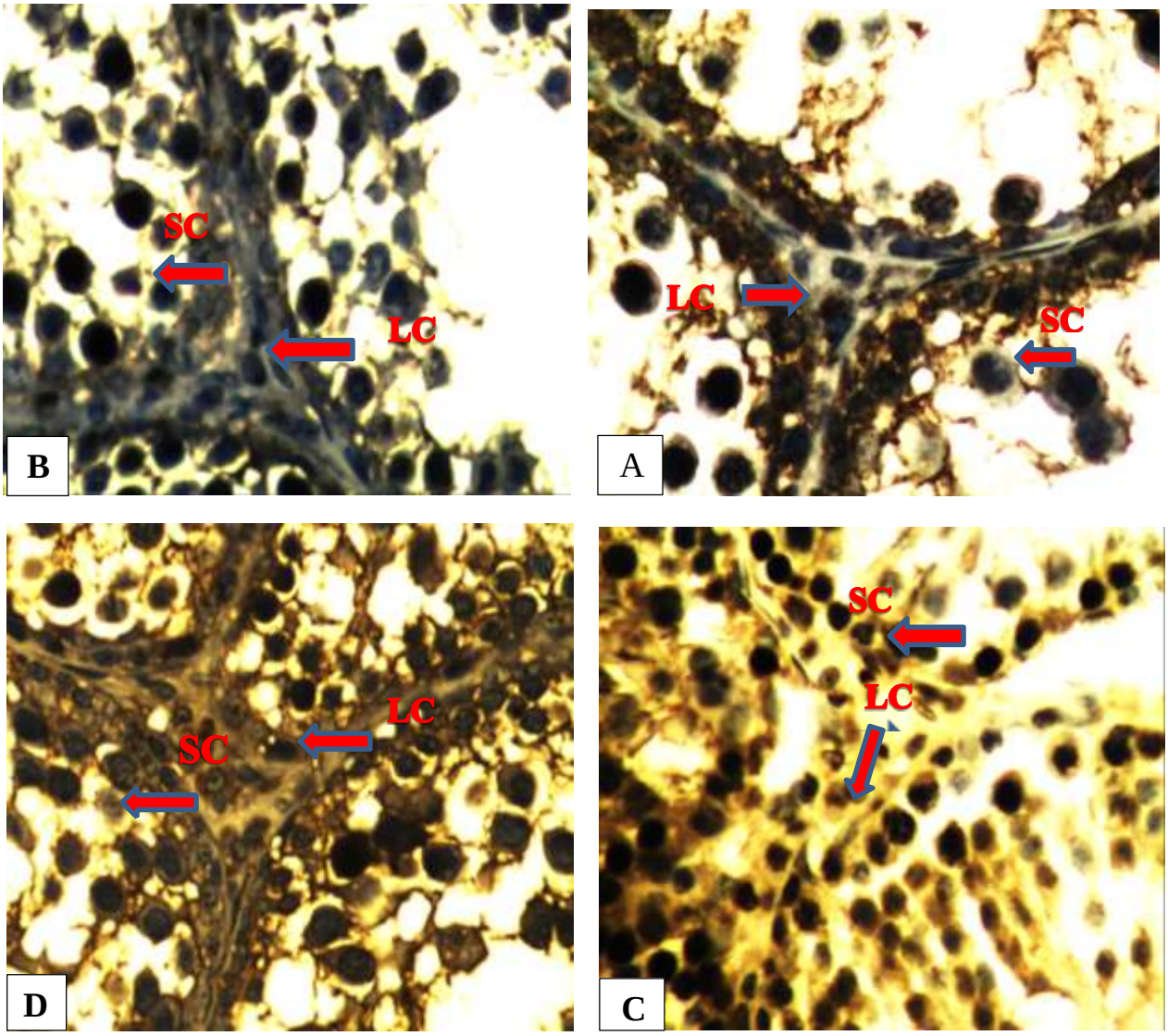
أظهرت النتائج الكيميائية النسجية المناعية لهرمون الشحمون الخصوي في انسجة الخصى لذكور الجرذان المعاملة بمعلق الثايموكوينون والذي يتركز في خلايا لايدك وخلايا سرتولي . وقد ظهرت قوة وكثافة التفاعل المناعي الايجابي لخلايا لايدك في الأسبوع الثاني والرابع والسادس للمجاميع المعاملة ,بالمقارنة مع مجموعة السيطرة 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 ضعفاً في قوة وكثافة التفاعل المناعي في الخلايا المنتجة لهرمون الشحمون الخصوي (الشكل 4 - 6).



شكل (4-5) التفاعل المناعي لـ FSH في انسجة النخام الغدي لذكور الجرذان مجموعة السيطرة (A) و مجموعة المعاملة (B-C-D) للمدد (2 – 4 –6) أسبوع يوضح وجود التفاعل المناعي للهرمون المحفز للجريب FSH في الخلايا الفارزة خلايا المحرضة للقند Gn ويكون التفاعل اكثركثافة في (D وC) مقارنة مع بقية المجاميع ومجموعة السيطرة (IHC 500X) .



شكل (4- 6) يبين التفاعل المناعي لـ LH في انسجة النخام الغدي لذكور الجرذان مجموعة السيطرة(A) و مجموعة المعاملة (D-C-B) لمدد (2– 4 –6) أسبوع في الخلايا الفارزة خلايا المحرضة للقند Gn ويكون التفاعل اكثر كثافة في (C وB) مقارنة مع بقية المجاميع ومجموعة السيطرة (IHC 500 X) .



شكل (4-7) يبين التفاعل المناعي لهرمون الشحمون الخصوي T في انسجة خصى ذكور جرذان مجموعة السيطرة (A) و مجموعة المعاملة (D-C-B) لمدد (2- 4 - 6) أسبوع في الخلايا الفارزة خلايا لايدك LC وخلايا سرتولي SC و يكون التفاعل اكثر كثافة في المجاميع المعاملة مقارنة مع السيطرة وبقية المجاميع (IHC 500X) .

5. المناقشة

1.5. المعاير الوزنية

1.1.5. وزن الجسم

اثبتت نتائج الدراسة الحالية الدور الايجابي للثايموكوينون في مجمل العمليات الأيضية داخل الجسم , إذْ أظهرت النتائج حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في الكسب الوزني لأجسام الحيوانات المعاملة

بالمقارنة مع السيطرة , وظهرت هذه الزيادة في نهاية الاسبوع الثاني واستمرت الى نهاية مدة التجربة وكانت اعلى زيادة مسجلة في الاسبوع السادس من التجربة وهذا يتماشى مع ما اشار له الباحث Rastad وجماعته (2015) ان الثايموكوينون له قدرة على تحسين اداء فروج الدجاج مع وبدون التعرض للإجهاد الحراري , فقد اشارت نتائجهم الى ان المعاملة بالثايموكوينون تزيد من وزن الجسم والاوزان النسبية للأعضاء فضلاً عن زيادة تراكم الشحوم البطنية والاعضاء على فترات زمنية من التجربة وكانت النتيجة الافضل من 22 - 42 يوم . وتعزى هذه الزيادة الى دور الثايموكوينون في زيادة كمية الدهون المخزونة في الجسم وكذلك زيادة اوزان اعضاء الجسم . كما أن الثايموكوينون له قدرة من تقليل تركيز السكر في الدم وتحوله الى دهون مخزونة في الجسم والدهون البطنية Abdominal Fat عند الاستخدام لمدة طويلة (Khan *et al*., 2012) .

كما وجد ان للثايموكوينون دوراً في تحسين امتصاص المواد الغذائية في الأمعاء ويتفق هذا مع ما اشارت اليه دراسة Farah وجماعته (2005) التي اجريت على الجرذان لمعرفة تأثير الثايموكوينون في تقليل مستوى السكر في الكبد إذْ اشارت الدراسة الى ان الثايموكوينون يعزز من امتصاص السكر والمواد المغذية , كما ان الثايموكوينون يزيد من معدل ايض Catabolism الكلوكوز وانتاج الطاقة وفي النهاية يودي الى تحسين النمو وزيادة الوزن (Passos & zglinicki, 2006) .

أن الزيادة الحاصلة في وزن الجسم هي دليل عام عن مستوى التحسن الحاصل في الصحة العامة وما يترتب عليه من تحسن في الاداء الانتاجي ومقاومة الامراض , اذ ان التحسن في التحويل الغذائي والاستفادة القصوى من المواد الغذائية ينعكس على وزن الجسم . من جهة اخرى يعد التحسن الحاصل في مناعة الحيوانات احد الدلائل على التحسن الحاصل في الصحة العامة فقد اشارت بعض الدراسات الى ان استخدام الثايموكوينون يزيد من وزن الطحال ويزيد من الاستجابة المناعية الجهازية Systemic Immune Response أذ يزداد تمايز خلايا الطحال و الخلايا البلعمية ونشاط الخلايا القاتلة المضادة للأورام عند استخدام الحبة السوداء . كما ان استخدام الثايموكوينون يقلل من اعداد الخلايا المتعادلة Neutrophils وزيادة عدد خلايا اللمفية Lymphocytes والاحادية Monocytes في الجرذان وبما ان هذه الخلايا تهاجر للطحال لاكتمال نضوجها وتخصصها وان هذه الهجرة تسبب زيادة وزن الطحال ونشاط أنسجته (Khan *et al*.,2012) .

من جانب اخر , ان دور الثايموكوينون في تحسين وزن الجسم ربما يأتي من دوره بوصفه مضادا بكتيرياً او فطرياً مما يساعد جهاز المناعة في إداء عمله لمحاربة الاجسام الغريبة وبالتالي تقليل الطاقة المستخدمة من قبله لإتمام عمله وهذا ما أكدته دراسة Saeid & Mohamed (2013) إذ ذكرا ان الثايموكوينون له دوراً مضاداً للبكتريا والذي سوف يؤدي الى قلة استهلاك الطاقة من قبل الجهاز

المناعي عند أستخدم مستخلص بذور الحبة السوداء في عليقة فروج الدجاج إذْ أظهر دوراً مضاداً للبكتيريا والفطريات , وتحسين وزن الجسم .

2.1.5. أوزان الاعضاء

1.2.1.5. وزن الخصية

أظهرت نتائج الدراسة الحالية حصول ارتفاع معنوي في معدل أوزان الخصى في المجاميع المعاملة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة أو مع بعضها البعض خلال مدة التجربة وكانت الزيادة متزامنة مع زيادة وزن الجسم إذ لاحظ Murrey وجماعته (1990) في دراسة اجريت لمعرفة تأثير التغذية على نمو الخصية وجدوا ان هناك علاقة بين زيادة وزن الجسم ونمو الخصية وبالتالي زيادة وزنها . وان زيادة وزن الخصية يؤدي الى زيادة تركيز النطف ومن ثم الى تحسين الخصوبة لدى الذكور كما ان زيادة وزن الخصية يؤدي الى زيادة في مستقبلات هرمون النمو في الخصية (Martin &Walkden-Brown ,1995) . وجاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع Al-Sa'aidi وجماعته (2009) عند دراسة تأثير المستخلص الكحولي لبذور الحبة السوداء في خصوبة ذكور الجرذان إذْ ادى الى زيادة وزن الخصى وتحسين الخصوبة .

2.2.1.5. وزن الغدة النخامية

تشير نتائج الدراسة الحالية الى حصول زيادة في وزن الغدة النخامية وصل لدرجة المعنوية ($P<0.05$) بين مجموعتي المعاملة و السيطرة في مدد التجربة وذلك نتيجة للزيادة الحاصلة في وزن الجسم وكذلك تزايد اعداد الخلايا الداخلة في تركيب هذا العضو من خلال ملاحظة المقاطع النسجية و ربما تعود هذه الزيادة لتأثير الثايموكوينون على إنزيمات نقل الإشارة Phosphorylation Enzyme وهي الإنزيمات الضرورية في عملية إنتاج الهرمونات وهذا يتفق مع Rastad وجماعته (2015) الذين ذكروا ان الثايموكوينون يؤثر على مسارات نقل الاشارة بين الخلوية ويزيد من افراز الانسولين .

3.5. الدراسة الهرمونية

1.3 .5 هرمون محفز الجريب FSH

اشارت النتائج الى حصول زيادة معنوية في المجاميع المعاملة مقارنة مع مجموعة السيطرة وتعزى هذه الزيادة المعنوية في المستويات لتأثير المادة على مسارات تخليق الهرمونات من الغدة النخامية والهرمون محفز الجريب دور رئيسي ووظيفي في تحفيز عملية نشأة النطف من خلال زيادة حساسية خلايا لايدك المنتجة للشحمون الخصوي من خلال تأثيره على الهرمون اللوتيني المحفز له

(Turek , 2005) . وكما أشارت الدراسات إلى أهمية هرمون محفز الجريب في الفئران المعدلة وراثياً إذْ يكون لا غنى عنه في خصوبة الذكور وعملية نشأة النطف لا تكتمل طبيعيا بغياب هرمون المحفز للجريبات كما ان هذا الهرمون مهم في وظائف الاعضاء التناسلية منها تنظيم الخصوبة , التشخيص ومعالجة الاضطرابات التناسلية والحالات المرضية إذْ استخدم في تشخيص وعلاج حالات العقم (Rose *et al*., 2000) . وهذا يؤيد التحسن في خصوبة الذكور الملاحظة في نتائج الدراسة الحالية.

3.5. 2 . الهرمون اللوتيني LH

تشير نتائج الدراسة الحالية حصول زيادة في تركيز الهرمون اللوتيني في المجموعة الاولى والثانية ونقص التركيز في المجموعة الثالثة ويعود ذلك الى زيادة تركيز هرمون الشحمون الخصوي إذْ انه يؤثر وفق ميكانيكية التغذية السلبية الرجعية (Charlton, 2004) . وهذا يتفق مع ما جاء به *et* Al-Sa'aidi *al*.,2009) عند دراسة تأثير المستخلص الكحولي لبذور الحبة السوداء في خصوبة ذكور الجرذان إذْ اشار الى ان تركيز الهرمون يقل عنده المعاملة بالحبة السوداء لمدة 50 يوم وذلك لزيادة تركيز هرمون الشحمون الخصوي . ويعتقد ان هذه الزيادة تعود لتأثير المادة على الهرمون المحرر للمناسل في خلايا الغدة النخامية المنتجة للهرمون بعض المواد لها القدرة على تحفيز انتاج الهرمون إذْ ان المركبات الصابونية لها تأثير على انتاج الهرمون اللوتيني فيمكن أن يؤدي الى زيادة معنوية في تركيز الهرمون اللوتيني بواسطة التأثير على خلايا النخامية الأمامية وتحفيزها لإفراز الهرمون وبتالي زيادة تركيزه في مصل الدم وهذا يتفق مع دراسة Francis وجماعته (2002) .

3.3.5. هرمون الشحمون الخصوي T

أظهرت الدراسة وجود زيادة معنوية في مستوى هرمون الشحمون الخصوي في المجاميع المعاملة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة كما في الجدول (4-3) 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 (Turek , 2005; Ganong , 2005) . وهذا يتفق مع ما اشار اليه Juma & Abdulrahman (2011) إذْ لاحظ وجود زيادة معنوية في مستويات الهرمون اللوتيني و المحفز للجريب والشحمون الخصوي للذكور عند دراسة تأثير التجريع بزيت الحبة السوداء في بعض المعايير الفسلجيه والتكاثرية والنسجية للجرذان .

4.5. التغيرات في التركيب النسجي للخصية

1.4.5. أقطار النبيبات ناقلة المني وسمك جدرانها

أظهرت نتائج الدراسة الى حصول زيادة معنوية في معدل أقطار النبيبات ناقلة المني لخصى مجموعة المعاملة بالمقارنة مع السيطرة والتي ازدادت مع تقدم مدة المعاملة , ويمكن أن تعزى هذه الزيادة الى افراز هرمونات النخامية التي لها دوراً في عملية نشأة النطف وهذا يتفق مع (El-Sayed & El-Hashem , 2000) عند حقن الجرذان المستأصلة النخامية بـ 100 مايكرو غرام من الهرمون اللوتيني إضافة الى 15 مايكرو غرام الهرمون محفز الجريبات , ادى الى زيادة معنوية في معدل أقطار النبيبات ناقلة المني . اذ يبين أن الارتفاع الحاصل في مستوى الهرمونات التي اشتملت عليها الدراسة الحالية قد ساهم في زيادة أقطار النبيبات الناقلة للمني إذْ ان لهذه الهرمونات تأثير مهم وأساسي على الخصى وكفاءة عملها , فقد أشار Anderson & Baird (2002) . اما زيادة سمك النبيب فقد جاءت متوافقة مع Al-Sa'aidi وجماعته (2009) الذي ذكر ان هناك زيادة في سمك النبيب ناقل المني عند دراسته لتأثير المستخلص الكحولي لبذور الحبة السوداء في خصوبة ذكور الجرذان . كما ان لهرمون الشحمون الخصوي دور في إدامة أقطار النبيبات ناقلة المني وزيادة معدلات أقطارها من خلال تأثيره على زيادة فعالية انقسام الخلايا المبطنة لها فقد ذكر Javed وجماعته (2001) أن نقص هذا الهرمون يسبب انخفاضاً في أقطار النبيبات ناقلة المني وعزى ذلك إلى اضمحلال الخلايا النطفية وقلة أعدادها ومن ثم انكماش النبيب .

2.1.4.5. معدل أعداد خلايا لايدك وسرتولي

أظهرت نتائج الدراسة النسجية حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات خلايا لايدك المنتجة لهرمون الشحمون الخصوي في خصى الحيوانات مجموعة المعاملة خلال مدة التجربة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وقد تعزى هذه الزيادة في اعداد خلايا لايدك الى التأثير الايجابي للثايموكوينون بفعل خصائصه المضادة للأكسدة وتتفق هذه النتيجة مع (Mahdavi *et al* ., 2015) إذْ اشاروا الى ان للحبة السوداء تأثير ايجابي على اعضاء الجهاز التناسلي (مراحل نشأة النطف و خلايا لايدك والهرمونات الجنسية) وذكروا ان هذا التأثير ربما يعود لفعل المكون الرئيسي للحبة السوداء وهو الثايموكوينون الذي له تأثير في تحسين معايير خصوبة الذكور من خلال تعزيز دفاعات مضادات الاكسدة . وبما ان الثايموكوينون من مضادات الاكسدة والذي يعمل على معادلة الجذور الحرة المتحررة في الجسم والتي تعمل على ضرر النطف جاءت نتيجة الدراسة متفقة مع ما قدمه Menzo وجماعته (2014a), (2014b) إذ اشارت تلك الدراسات الى ان لمكونات مضادات

الاكسدة تأثير في تحسين عملية نشأة النطف وانتاج الستيرويدات Steroidogenesis و منها الشحمون الخصوي إذْ ان زيادة هذا الهرمون ينتج عنه زيادة في اعداد خلايا لايدك المنتجة له تحت سيطرة الهرمون اللوتيني المحرر من النخامية ومن ثم تطور عملية نشأة النطف و تحسين كفاءة الخصوبة الذكرية (Spaliviero *et al*., 2004) .

أن الزيادة الحاصلة في اعداد خلايا سرتولي لذكور مجموعة المعاملة بالمقارنة مع ذكور مجموعة السيطرة من المرجح يعود الى فعل هرمون المحفز للجريب الذي ازدادت معدلاته بفعل المعاملة بمعلق الثايموكوينون , اذ كانت الزيادة متوافقة مع زيادة مدة المعاملة . فقد أشارت الدراسات الى ان اعداد هذه الخلايا يعتمد بالدرجة الاساس على تراكيز هرمونات الغدة النخامية (المحفزة للجريب واللوتيني . اذ ان خلايا سرتولي هي خلايا غير مولدة في نبيبات ناقلة المني للخصية وتزايد اعدادها يعتمد على تزايد اعداد الخلايا الموجودة داخل النبيبات ناقلة المني في الخصية Sharpe وجماعته (2000) . وتتفق نتائج الدراسة مع ما توصله اليه Al- Sa'aidi وجماعته (2009) عند دراسته لدور المستخلص الكحولي لبذور الحبة السوداء في تحسين معاير الجهاز التناسلي الذكري ومنها اعداد خلايا سرتولي و خلايا لايدك ومستويات هرمونات الشحمون الخصوي والهرمون محفز الجريب.

2.4.5 . التغيرات النسجية للنخامية

أظهرت المقاطع النسجية للغدة النخامية تزايدا في اعداد خلايا المغذية للمناسل وتعد هذه الزيادة اشارة الى التأثير الايجابي للثايموكوينون على زيادة إنتاج الغدة النخامية للهرمونات وهذا يتماشى مع ما أشاره اليه الباحثان Juma &Abdulrahman , (2011) اللذان وجدا زيادة ايجابية في تركيز البروجسترون والاستروجين في المجاميع المعاملة بزيت الحبة السوداء ويعود هذا التأثير الى الثايموكوينون بوصفه المركب الرئيس الفعال في الزيت اذ ان عملية تحرر البروجسترون والاستروجين من المبايض يكون عن طريق سيطرة الغدة النخامية عن طريق هرموني المحفز للجريب واللوتيني لذا يعتقد ان التأثير يكون على الخلايا المحررة للمناسل Gn والذي بدوره يحفز المبايض للتحرير الهرمونين المذكورين إذ ان الثايموكوينون يدخل في مسارات نقل الاشارة لإنتاج الهرمونات و يؤثر على انزيمات الفوسفورليز phosphorylation Enzyme والتي تقوم بفسفرة البروتينات داخل الخلية وان نشاط هذه الانزيمات اما ان يزيد او يثبط نتيجة الفسفرة . ان الزيادة والتثبيط في نشاط هذه الانزيمات تؤثر على مقدار الاستجابة التي تحدث في الخلايا الهدف ومن هذه الهرمونات التي تتأثر بهذه الانزيمات هي الهرمون المحفز للجريبات والهرمون اللوتيني .

5. 5. الدراسة الكيميائية – النسجية – المناعية

1.5.5. تعبير الهرمون المحفز للجريب واللوتيني في انسجة النخام الغدي للنخامية

أظهرت نتائج الدراسة الكيميائية – النسيجية – المناعية لأنسجة النخام الغدي للهرمون محفز الجريب في الاسبوع الثاني والرابع والسادس لذكور مجموعة المعاملة تفاعلاً مناعياً اكثر كثافة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي اظهرت أقل للتفاعل المناعي . وهذا يتفق مع (2014 Hassanin & Safwat) . إذ لاحظا ان المعاملة بزيت الحبة السوداء يؤدي الى زيادة معدلات تراكيز الهرمونات الجنسية ومعالجة الالتهابات لذكور الجرذان المعاملة بالكاديوم . ان كثافة تعبير الهرمون محفز الجريب والهرمون اللوتيني في انسجة الغدة النخامية يعد أشاره واضحة الى فعل الثايموكوينون , اذ يمكن الاستدلال على زيادة اعداد الخلايا المنتجة لهما او زيادة انتاجها, علاوة على دور الثايموكوينون على مستوى هرمون النمو في النخامية ضمن الفص الامامي لها . فقد وصف Hull &Harvey , (2002) ان الثايموكوينون يعتبر من العوامل المساعدة في النمو إذْ أشارت الدراسة الى ان هرمون النمو له اهمية في السيطرة على وظيفة الخلايا المغذية للمناسل وتحسين عملها إذْ ان هرمون يعمل كمرافق لهرمون مغذيات المناسل Co - gonadotropin وإن هرمون النمو والخلايا المغذية للمناسل لها أهمية في عملية النمو والنضج الجنسي .

تشير نتائج الدراسة الحالية الى زيادة أعداد خلايا الفص الامامي للنخامية لذكور المعاملة من خلال ملاحظة كثافة التصبيغ المناعي لخلايا المغذية للمناسل Gonadotrophs وهذه الزيادة قد تعود ايضاً لتأثير الثايموكوينون على غدة تحت المهاد المسؤولة عن تحرر هرمون المحرر لمحرضات للمناسل والذي يسيطر على عمل الغدة إذ ان السيطرة عليها تكون بواسطة السيطرة الهرمونية من تحت المهاد , وبالتالي السيطرة على تحرير الهرمون محفز الجريب والهرمون اللوتيني من الخلايا المغذية للمناسل . وهذا يتوافق مع الدراسة التي اجريت على الجرذان الناضجة المعاملة بزيت الحبة السوداء إذْ اظهرت النتائج ان هناك زيادة معنوية في مستويات الهرمون اللوتيني والهرمون محفز الجريبات وهذه الزيادة تعود للتأثير المباشر للزيت على تحت المهاد والتي بدورها تزيد من هرمونات المحررة للمناسل و التي تستطيع ان تحفز المسارات المحررة للمناسل والتي تبدا بالتغيرات في وظائف الغدة التناسلية (Boukhliq *etal.*,1997).

2.5.5. تعبير هرمون الشحمون الخصوي في انسجة الخصى

أظهرت نتائج الدراسة الحالية تعبيراً عالياً لهرمون الشحمون الخصوي المنتج من خلايا لايدك للذكور المعاملة بالثايموكوينون 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 Sasso-cerri وجماعته (2005) 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 (Sasso - cerri *et al.*, 2005) . كما ان نتائج الدراسة الحالية كانت متوافقة مع ما أشار اليه Haseena وجماعته (2015) الذي اكد على تأثير الثايموكوينون في تحسين ووقاية المعاير الخصوية ورفع مستوى الهرمون الشحمون الخصوي في الجرذان .

6. الاستنتاجات والتوصيات

1.6. الاستنتاجات Conclusions

أظهرت نتائج الدراسة الى ان اعطاء الثايموكوينون بجرعة 50ملغم / كغم من وزن الجسم له تأثير فعال في تحسين الكفاءة التكاثرية ذكور الجرذان وذلك من خلال تحسن المعايير الاتية :

1. زيادة في معدل الكسب الوزني , والوزن النسبي للخصى والنخامية .
2. ارتفاع في مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone,هرمون المحفز للجريب و إنخفاض معنوي في مستوى هرمون اللوتيني LH في نهاية التجربة .
3. حصول تغيرات إيجابية في المقاطع النسجية للخصية شملت زيادة في اعداد خلايا ليدك وسرتولي وخلايا المبطنة للنبيب .
4. حصول تغيرات إيجابية في تركيب النسيجي للنخامية شملت زيادة في اعداد الخلايا المحرضة للقند .

2.6 . التوصيات Recommendations

في ضوء ما تقدم من نتائج الدراسة الحالية , يمكن ان نوصي باستخدام الثايموكوينون TQ كمنشط جنسي في العلاج التقليدي . الى جانب عن اجراء المزيد من الدراسات المستقبلية لأهمية الثايموكوينونTQ دوائياً ومنها ما يأتي :

1. دراسة الكفاءة التناسلية في الاناث البالغة بعد المعاملة بمعلق الثايموكوينون TQ .
2. استخدام معلق الثايموكوينون TQ لحيوانات المزرعة لتنشيط التناسل ولزيادة الوزن وتحسين الاداء الوظيفي لها من خلال استخلاص المادة من بذور الحبة السوداء .
3. اجراء المزيد من الدراسات لمعرفة تأثير الثايموكوينون TQ على فعالية الغدة النخامية .
4. اجراء دراسة الريل تايم Rt- PCR لمعرفة دور معلق الثايموكوينون TQ في مستوى التعبير الجيني لكل من الهرمون المحفز للجريب , والهرمون اللوتيني وهرمون الشحمون الخصوي .