تأثير المستخلص الكحولي الخام لبذور الحلبة على الخصوبة في ذكور الفئران البيض Albino Male Mice

إنعام على سلمان الربيعي * صباح عبد الرضا العبيدي *

رسمية حياوي مراد العكيلي *

تاريخ قبول النشر 2006/6/21

الخلاصة

تمت دراسة التغيرات النسجية والفسيولوجية المصاحبة لتجريع المستخلص الكحولي الخام لبذور نبات الحلبة لذكور الفئران البيض بتراكيز مختلفة (0.25 ، 1.25 ، 2.5 ملغم / مل) ولمرة واحدة باليوم (0.1 مل) عن طريق الفم ولمدة 35 يوما . بعد القيام بدراسة الخصى والبرابخ نسيجيا وفسيولوجيا ، تبين حدوث تنكس وتنخر واضحين في النبيبات المنوية للخصى مع حدوث تجاويف ضمن خلاياها وخلايا الأنابيب البربخية أما التأثير على إنتاج النطف فكان جليا حيث سبب المستخلص انخفاضا معنويا في اعداد النطف المنتجة . اما فيما يخص التاثير على اقطار النبيبات المنويه ونبيبات البربخ فلم تكن هناك فروقا معنوية .أما ارتفاع الخلايا الظهارية في كل من راس و ذيل البربخ فلم يتاثر هو الاخر معنويا بالمستخلص .

نستنتج من ذلك ان للمستخلص الكحولي الخام لبذور الحلبة تأثيرا سلبيا على خصوبة ذكور الفئران البيض .

المقدمة

تحتل النباتات الطبية في الوقت الحاضر مكانه متميزه في المجال الدوائي والصناعي والزراعي لما للأدوية والعلاجات الكيماوية من أخطار ناجمة عن تأثيراتها الجانبية لذا نرى تزايد الاهتمام بالاعشاب والنباتات الطبيه في معظم دول العالم .

إن للمركبات العضوية الموجودة في الكثير من النباتات دورا مهما كمواد فعالة طبيا وفسلجيا يمكن استخدامها في العلاج من قبل الانسان والحيوان لكثير من الامراض كما ان معظمها يوفر الجانب الامن من الاستخدام الطبي والعلاجي (1) إن احد النباتات ذات الاستعمال الطبي هو نبات الحلبة Trigonella foenum (fenugreek) الذي يعد من النباتات المهمة لاحتواه على العديد من المركبات الفعالة طبيا مثل القلويات Alkaloids والكلايكوسيدات Glycosides و الصابونينات Saponins .

أن احتواء الحلبة على الصابونينات الستيرويدية Steroidal Saponins ذات التركيب المشابه للهرمونات الجنسية الستيرويدية (1) تجعله ذو دورا ايجابيا في عملية التكاثر.

يستعمل نبات الحلبة لأغراض طبية وصيدلانية عديدة إذ يستعمل لتسهيل الولادة و إدرار الحليب وخفض مستوى السكر في الدم (3) كما يستعمل في علاج الربو ومضادا للالتهابات والأورام وطاردا للطفيليات (4) ، (5) كما ويسبب الإجهاض عند النساء الحوامل (6) ولما للخصوبة من دور كبير وأساسي في إتمام عملية التكاثر فقد كان هذا الدور دافعا كبيرا لأجراء وتصميم هذه التجربة للتعرف على مدى تأثير مستخلص بذور الحلبة الخام على بعض عوامل الخصوبة في ذكور الفئران البيض.

* قسم علوم الحياة ، كلية العلوم للبنات ، جامعة بغداد

المواد وطرائق العمل

الحيوانات المستعملة

شملت الدراسة على استخدام اربعون ذكرا من الفئران البيض البالغة وبعمر ثمانية أسابيع تم الحصول عليها من مركز بغداد لابحاث الأجنة وعلاج العقم الذي كان تابعا الى جامعة بغداد في حينه . وضعت الحيوانات في البيت الحيواني التابع لمركز التقنيات الإحيائية في جامعة النهرين . اما الظروف البيئية التي تعرضت لها الحيوانات فتتلخص بوضعها في اقفاص بلاستيكية مفروشة الأرضية بنشارة الخشب والتي اخضعت الى عناية ونظافة مستمرة . اما التهويه فجيده تحت اضاءه مدتها 12 ساعة في اليوم . درجة حرارة الغرفة كانت تتراوح بين (22 - 28)° م ، اما العليقة الجاهزة والماء فكانا متوفران بشكل حر ad libitum طيلة مدة التجربة.

تحضير المستخلص الكحولي الخام :

تم الحصول على بذور الحلبة من معشب كلية الصيدلة / جامعة بغداد. بعد تنظيفها من الغبار والشوائب العالقة بها طحنت باستعمال مطحنة كهربائية نوع motar مصرية المنشا . تم اخذ 10 غم من مسحوق البذور ومزجها بـ (100) مل من الكحول الاثيلي تركيز 70% (شركة BDH) لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة الغرفة (حوالي 25°م) مع الهز المستمر وذلك من خلال وضع الخليط في حاضنة منضدية هزازة ألمانية الصنع لمدة 10 ساعات حتى تجانس المزيج . بعدها تم ترشيح النقيع عبر أوراق ترشيح نوع (Whitman 1). ثم طرد الراشح مركزيا لمدة 10 دقائق تحت سرعة 2000 دوره / دقيقة . بعد ذلك تم تبخير الكحول بدرجة 45 م باستخدام جهاز المبخر الدوار rotary evaporator الألماني المنشأ ولوقت مفتوح حتى تم التخلص من الكحول بـ صوره تامة . المستخلص المتبقي من التبخير تم وزنه وتعليقه بـ (10) مل من الماء المقطر ثم عقم وحفظ تحت درجة 4 °م تحت الصفر لحين الاستعمال.

التجريع وجمع النماذج :

قسمت الحيوانات الى أربعة مجاميع تجريبية بواقع 10 فئران للمجموعة الواحدة (مجموعة 1، مجموعة 2 ، مجموعة 3 ، مجموعة 4 والمتخذة كمجموعة سيطرة) تم تجريع حيوانات المجموعات الثلاثة الأولى عن طريق الفم باستخدام ماصة دقيقة micropipette بحجم واحد ولكن بتراكيز مختلفة من المستخلص انف الذكر (المحلول القياسي stock solution) يوميا ولمدة 35 يوم وكالاتي : المجموعة 1 – 0.1 مل من المستخلص بتركيز 0.25 ملغم / مل المجموعة 2 – 0.1 مل من المستخلص بتركيز 1.25 ملغم / مل المجموعة 3 – 0.1 مل من المستخلص بتركيز 2.5 ملغم / مل المجموعة 4 – 0.1 مل من المحلول الفسيولوجي كونها مجموعة سيطره .

بعد انتهاء مدة التجريع البالغة 35 يوما سجل وزن الجسم ثم قتلت الحيوانات بطريقة خلع الرقبة neck dislocation ثم فتح كيس الصفن لاستخراج الخصى والبرابخ . بعد ازالة النسيج الدهني والأنسجة الرابطة الأخرى العالقة بالخصية نشفت باستعمال الورق النشاف ثم وزنت وثبتت في محلول بوين لمدة 24 ساعة لحين إجراء وعمل المقاطع النسيجية الضرورية . تمت هذه العملية بأتباع طريقة الطمر بشمع البارافين مع التصبيغ بصبغتي الهيماتوكسلين والايوسين (7) أجريت هذه العملية لكل من الخصى والبرابخ كل على حدة لنماذج من كل مجموعة من المجاميع التجريبية الأربعة .

فحصت كافة الشرائح النسيجية تحت المجهر الضوئي المركب بهدف قياس اقطار النبيبات المنوية والبرابخ باستعمال المقياس الدقيق العيني بعد معايرته بالمقياس الدقيق المسرحي . وتم ايضا قياس ارتفاع الخلايا الظهارية المبطنة لكل من انبوب رأس البربخ في 20 مقطعا مستعرضا لكل حيوان.

التحليل الاحصائي

كما هو متبع تم التعبير عن النتائج بشكل المعدل ± الخطأ القياسي من خلال تحليل النتائج إحصائيا باستعمال اختبار Anova test لتحليل التباين ، بعدها اختبرت

معنوية الفروق بين المعدلات باستعمال اختبار دنكن Duncan test (8).

النتائج والمناقشة :

أظهرت النتائج المبينة في جدول (1) حصول زيادة معنوية ($P < 0.05$) في معدل وزن الجسم لفئران المجموعة 3 مقارنة بمجموعة السيطرة، وهذا يوضح تاثير المستخلص حيث يزيد من معدلات الاستهلاك الغذائي (9) ، (10) عن طريق زيادته لشهية الحيوانات للغذاء اذ وجد ان لمستخلص الحلبة تأثيرا ايجابيا على معدل الايض الغذائي لاحتواءه على بعض المواد الأساسية مثل الأحماض الامينية التي تتحول بدورها الى بروتينات (11) أو من خلال تنظيمه لافراز الغده الدرقية للثيروكسين (12). فضلا عن ذلك فقد بينت العديد من التقارير من ان لمستخلص الحلبة تأثيرا في عملية تنظيم الكلوكوز في الدم من خلال تنظيمه لافراز الانسولين في كل من الانسان و الجرذان (13) ، (14).

فيما يخص وزن الخصى فكما هو مبين في جدول (1) سجلت النتائج ارتفاعا معنويا ($P < 0.05$) في وزن خصى فئران المجموعة 3 المجرعة بتركيز 2.5 ملغم/مل من المستخلص الكحولي الخام للحلبة مقارنة بمجموعة السيطرة . قد يعود السبب في ذلك الى وجود الكومارين في المستخلص أذ وجد ان هذه الماده تسبب تجمع السوائل في انسجة الخصى (15).

لم تظهر النتائج أي فروق معنوية في وزن البربخ لحيوانات المجاميع المعاملة بالمستخلص مقارنة بمجموعة السيطره (جدول 1) . قد يعود السبب في ذلك الى انخفاض تراكيز المستخلص المجرع فضلا عن وظيفة العضو وتركيبه ودوره المحدود في عمليات نقل وانضاج النطف و خزنها.

يبين الجدول (2) أقطار النبيبات المنوية في الخصى وأقطار نبيبات البرابخ لذكور الفئران البيض المجرعة بتراكيز مختلفة من المستخلص الخام لبذور الحلبة قياسا بحيوانات مجموعة السيطرة. اظهر التحليل الإحصائي لهذه النتائج عدم وجود فروق معنوية في أقطار النبيبات المنوية ونبيبات البربخ بين كافة المجاميع التجريبية مقارنة بمجموعة السيطرة . إن السبب في عدم ظهور التأثير المعنوي قد يعزى إلى التراكيز المتدنيه لمستخلص الحلبة الخام المستخدمة في هذه الدراسة على النقيض من النتائج المعنوية التي حصلت عليها (16) عند استعملها لمادة الصابونين الموجودة في مستخلص بذور الحلبة الأكثر نقاوة .

أما فيما يخص تأثير المستخلص الخام لبذور الحلبة على سمك أو ارتفاع الخلايا الظهارية المبطنة لانيبيبات رأس البربخ وذيله فقد كان هو الآخر غير معنويا كما هو الحال لتأثيره على أقطار النبيبات المنوية والبربخية كما هو موضح في الجدول (2) وقد أوعز السبب أيضا إلى عدم نقاوة المستخلص فضلا عن انخفاض التراكيز المستخدمة في الدراسة .

من خلال فحص المقاطع النسيجية المستعرضة لخصى فئران مجموعة السيطرة (الشكل 1) ومقارنتها مع خصى الفئران المجرعة بتراكيز مختلفة لمستخلص بذور الحلبه الخام (الأشكال 2 ، 3 ، 4) ، يمكن ملاحظة التاثيرات الواضحة التي أحدثها المستخلص في نسيج الخصية والتي تتلخص بتضرر النبيبات المنوية بحدوث تنكس Degeneration وتنخر Necrosis واضحين فيها علاوة على تساقط الخلايا المبطنة للنبيب المنوي وانفصال الغشاء القاعدي عن الخلايا المكونة للنطف في بعض النبيبات . اما تركيز النطف فقد انخفض داخل النبيب مع حصول فجوات خالية من الخلايا في طبقات الخلايا المكونة للنطف .

إن السبب في هذه التغيرات النسيجية قد يعزى الى تاثير مادة الفلافونويد Flavonoid glycosides والتي حصل عليها الباحث (17) إذ يعتقد أنها تسبب التنكس والتنخر في النبيبات المنوية. فضلا عن ذلك تأثيرها السلبي على خلايا لايدك مؤدية إلى انخفاض تركيز التستوستيرون و من انخفاض معدل الانقسامات الخلوية للخلايا المكونة للنطف والتي قد ينسحب تاثيرها على التلف في النبيبات المنوية عموما (17). وقد يعود السبب ايضا الى تأثر خلايا سرتولي والخلايا المكونه للنطف بمادة القلويدات Alkaloids في المستخلص سلبيا والذي يؤدي الى تلفها وقلة اعدادها الامر الذي يؤدي إلى

حدوث التنكسات والتنخرات والفجوات . لاحظ ذلك العديد من الباحثين عند اعطاء هذه المادة إلى الجرذان (18) ، (19).

فيما يخص النسيج الخلالي interstitial tissues فمن الملاحظ في الشكلين (2 ، 3) حدوث الوذمة Edea فيها مع وجود العديد من الفجوات فيها . قد يعود سبب ذلك الى تجمع الماء والسوائل داخل انسجة الخصى والذي يعتقد حدوثه بتاثير مادة الكومارين Coumarin في مستحلب الحلبة (15) . أما (20) فأعزى السبب في ذلك إلى زيادة المسافات بين النبيبات المنوية نتيجة انخفاض أعداد خلايا لايدك مما يؤدي الى زيادة نضوح السوائل الى داخل الأنسجة البينية للنبيبات المنوية ، بينما لم يلاحظ مثل هذه التغيرات السلبية على خصى فئران مجموعة السيطرة كما هو موضح في الشكل (1) .

عند ملاحظة المقاطع النسيجية لرأس وذيل البربخ للحيوانات المجرعة بالمستخلص الكحولي الخام لبذور الحلبة نرى إن هناك تأثيرا كبيرا للمستخلص في هذه الأنسجة الشكل (6 ، 8) مقارنة بمجموعة السيطرة الشكل (5 ، 7) إذ لوحظ تفكك الخلايا الظهارية المبطنة للنبيب البربخي علاوة على قلة النطف في تجاويفها . يمكن تفسير هذه التغيرات على اساس الخلل في مستوى هرمون التستوستيرون المسؤول عن وظيفة وديمومة خلايا البربخ ومن ثم فان انخفاض مستواه يؤدي ألى الاضرار في الخلايا الظهارية المبطنة للبربخ وعدم قيامها بوظيفتها بالوجه الصحيح مما يؤثر على نضج واعداد النطف (20)

في ضوء نتائج هذه الدراسة يتجلى لنا ان للمستخلص الكحولي الخام لبذور الحلبة تأثيرا سلبيا على خصوبة ذكور الفئران البيض عن طريق تاثيره السلبي على عملية تكوين النطف من خلال تاثيره على الأنسجة المتعلقة بنشؤها.

جدول (1) : المعدل ± الخطأ القياسي لأوزان الجسم (غم) و الخصى و البربخ (ملغم) لذكور الفئران البيض المعاملة بالمستخلص الكحولي الخام لبذور الحلبة.

الوزن	المعاملة			
	مجموعة السيطرة	مجموعة 1	مجموعة 2	مجموعة 3
الجسم قبل التجريع	2.10 ± 22.80	0.76 ± 21.20	0.76 ± 21.20	1.35 ± 21.50
الجسم بعد التجريع	1.95 ± 26.00	1.37 ± 28.70	2.27 ± 31.00	1.15 ± 35.00 *
الخصية	10.00 ± 70.00	4.94 ± 76.66 *	2.10 ± 93.33 *	1.94 ± 98.33 *
البربخ	2.10 ± 23.33	2.10 ± 32.33	2.23 ± 25.00	1.66 ± 21.66

* = فروق معنوية ($P < 0.05$).

جدول(2):المعدل ± الخطأ القياسي بالميكرون (µ) لأقطار النبيبات المنوية و البرابخ و كذلك ارتفاع خلايا كل من رأس و ذيل البربخ لذكور الفئران البيض المعاملة بالمستخلص الكحولي الخام لبذور الحلبة.

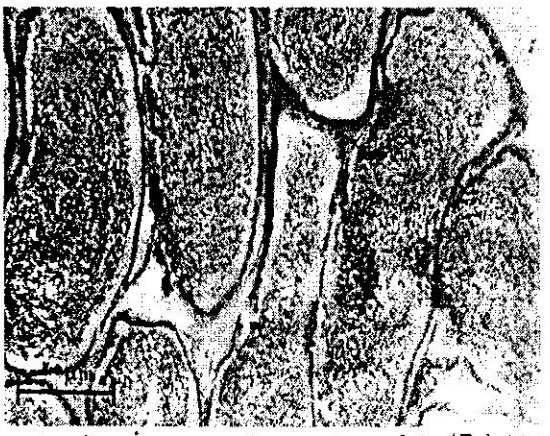
المعاملة	أقطار النبيبات المنوية	أقطار نبيب رأس البربخ	أقطار نبيب ذيل البربخ	ارتفاع خلايا رأس البربخ	ارتفاع خلايا ذيل البربخ
السيطرة	2.92 ± 108.20	6.09 ± 127.64	0.99 ± 65.44	0.58 ± 9.18	0.49 ± 10.54
0.25 ملغم/لتر	2.83 ± 107.25	6.40 ± 130.60	1.36 ± 69.11	0.63 ± 8.20	1.02 ± 10.53
1.25 ملغم/لتر	4.10 ± 110.25	2.40 ± 131.60	3.16 ± 72.02	0.75 ± 9.72	0.68 ± 11.42
2.5 ملغم/لتر	5.21 ± 105.25	2.02 ± 139.64	[illegible]	[illegible]	[illegible]

شكل (1) : مقطع مستعرض في نسيج الخصية لمجموعة السيطرة (هيماتوكسلين + أيوسين).

شكل (2) : مقطع مستعرض في نسيج الخصية للحيوانات المعاملة بمستخلص الحلبة الخام بتركيز 1.25 ملغم / مل يظهر فيه التنخرات (a)، التنكسات (b) والوذمة (c) (هيماتوكسلين + أيوسين).

شكل (3) : مقطع مستعرض في نسيج الخصية للحيوانات المعاملة بمستخلص الحلبة الخام و بتركيز 2.5 ملغم/مل يظهر فيه:الوذمة(a)،ابتعاد الخلايا الجرثومية عن الغشاء القاعدي(b)(هيماتوكسلين + ايوسين).

شكل (4) : مقطع مستعرض في نسيج الخصية للحيوانات المعاملة بمستخلص الحلبة الخام و بتركيز 1.25 ملغم/مل يظهر فيه : الفجوات بين الخلايا الجرثومية (هيماتوكسلين + ايوسين).



شكل(5):مقطع مستعرض في نسيج رأس البربخ مجموعة السيطرة (هيماتوكسلين+ايوسين).

شكل (6) : مقطع مستعرض في نسيج رأس البربخ للحيوانات المعاملة بمستخلص الحلبة الخام و بتركيز 1.25 ملغم/مل يظهر فيه : قلة أعداد النطف (a) ، تفكك الخلايا الظهارية المبطنة للبربخ (b)(هيماتوكسلين + ايوسين).

شكل(7): مقطع مستعرض في نسيج ذيل البربخ لمجموعة السيطرة (هيماتوكسلين + ايوسين).

شكل (8) : قطع مستعرض في نسيج ذيل البربخ للحيوانات المعاملة بمستخلص الحلبة الخام و بتركيز 2.5 ملغم/مل يظهر فيه قلة أعداد النطف و انعدامها في بعض النبيبات (a) ، تفكك الخلايا الظهاريـــة للنسيج (b) (هيماتوكسلين + ايوسين)

المصادر:

1. Verpoorte. R.and Alfermann A.(2000). metabdic engineering of plant secondary metabolism kluwer Academic publishers. 1-4. London
2. Simpson B.and Ogorzaly M.(2001). Economic, botany 3rd Ed .McGran- Hill.pp270-276.New York.
3. Vats, V.grover.Jand Rathi .S.(2002). Zalution of anti. hyperlycemic and hypoglycemic effect of trigonolla foenum- gracum in normal and alloxanized diabetic rats. J.Ethnopharm.79(1) ; 95-100.
4. Ahmadiani.A.Semnanian, S.Javen,,M.Barat,E.and Kamalinejad. M.(2002) Anti .inflammatary and Trigonella foenum Graecum leaves extract in the rat .J.Ethno. 75. (2-3); 283-286 [Abstract].
5. Zia,T,Hasanain,S. and hasan,S. (2001). Evaluationfo the oral hypogly caemic effeat of Trigonella foenum graecum in normal mice J.ethno. 75 (2-3);191- 195.[Abstract].
6. Leung , A. and Foster , S. (1996). Encyclopedia of common natural ingredients used in food . Drugs . 2nd Ed . Wiley .243-244 . New York.
7. Bancroft, J. and Stevens , A. (1982). theory and practice of histological technique. 2nd Ed . Churchill Livingston , London.
8. Duncan, D.B.(1955) Multiple range and multiple F-tests. Biometrics 11:1- 42.
9. الشحات ،نصير أبو زيد 1986.النباتات والأعشاب الطبية دار البحار .بيروت، لبنان.
10. Petit, P, Sauvaire ,Y., ponsin, G.,Manteghetti,M.,Fave,A. and Ribes ,G.(1993). Effects of a fenugreek seed extract on feeding behavior in the rat : metabolic –endocrine correates , pharmacol.Bioohem.Behav. 45(2): 369-374. [Abstract].
11. Zubay ,G.,Parson,W. and Vance,d.(1995). Principles of Biochemistry . 50- 66. Brown publishers . England .
12. Tahiliani, P. and Kar , A. .(2003) . The combined effect of Trigonella and Allium extracts in the regulation of hyperthyroidism in rats . phytomedicine . 10 (8) : 665-668. [Abstract].
13. Hebel, S .(1997).Fenugreek in : the laurenc review of natural products (Louis ,S.) American Botanical CKOK uncil. 1-3. American.
14. Basch, E., Ulbricht, C., Kuo, G., Szapary, P. and Smith ,M.

(2003). Therapeutic applica tions of fenugreek. Alternative Medicine Review. 8: 20-27.

15. Homady, M. (2001).Changes in the testicular and preputial gland structures of mice related to influence of ferula hormones extract . J.Sci. 1(3) : 108-112.

١٦. الربيعي ،أنعام علي سلمان (٢٠٠٦) . تأثير المستخلص الكحولي الخام ومستخلص مادة الصابونين مادة الصابونين لبذور الحلبة Fenugreek seeds في خصوبة ذكور الفئران البيض Albino male mice اطروحة ماجستير. كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد.

17. Akinleye , A., Abatan, K.,Alaka, O. and Oke, B.(2002). Histopathological studies on the effect of calotrepis procera on male reproduction organs of wistar rats . African J . of Biomedical, Res. 5: 57-61.

18. Dikshith , T., Raizada ,R. and Mul Chandani, N.(1990) . Toxicity of pure Alkaloid of Tylophora asthmatica in male rats . Indian J. Exp. Biol. 28: 208 -212 .

19. Joshi, M. and Ambaya, R . (1968). Effect of AL-kaloids from Vica Rosoa in male rat . Indian J.Exp. Biol. 6:256.

20. Luis , C ., Carneiro, J. and John, A. (1986). Basic Histology .5th Ed. Lange Medical publications .California.

Effect of crude alcoholic extract of fenugreek seeds on fertility in albino male mice .

Enaam A. S.Al-Rubaee * **Sabah A. R. Al-Obaidi ***

Rasmiya H. Murad *

*** Department of Biology , College of Science for Women , University of Baghdad**

Abstract

The effect of the crude alcoholic extract of the fenugreek seeds , given orally to albino male mice , on the physiological and histological changes of the testes was studied .The extract was give daily in different concentrations (0.25 , 1.25 , and 2.5 mg / ml) for 35 days .The histology of the testes revealed cells of varying degrees of desquamation and degeneration in the epithelial cells of of the seminiferous tubules. Vacules were also noticed within the epithelial cells of both seminiferous tubules and epididymal tubes. A significant decline was found in number of sperm produced . No significant differences were seen in the diameter of the seminiferous and epididymal tubules . The effect on the epithelial height of the epididymal tubes was also not significant .

It could be concluded that the crude alcoholic extract of the fenugreek seeds may have a negative effect on the fertility of the albino male mice.