وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية – كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة تأثير المستخلص المائي الحار لأوراق نبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* في فعالية الجهاز التناسلي الأنثوي ومستويات بعض الهرمونات لدى الجرذان البيض المعاملة بنترات الصوديوم

بحث قدم

إلى مجلس كلية العلوم/ جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس

علوم في علوم الحياة

تقدم به الطالب

حسين زباله جلوب معروف الزرفي

بإشراف

م.د. جاسم حنون هاشم العوادي.

1437 هـ

2016 م

بسم الله الرحمن الرحيم

والله أنبتكم من الأرض نباتاً (١٧)

ثم يعيدكم فيها ويخرجكم إخراجاً (١٨)

صدق الله العلي العظيم

سورة نوح (الآيتان: ١٧- ١٨)

الإهداء

إلى ربي (جل وعز) الذي خلقني وكرمني ولم أكن قبل هذا شيئاً مذكوراً

إلى الكواكب التي أضاءت الأرض والسماء نورا

المصطفى وآله (عليهم السلام)

إلى شهداء الإسلام وأحرار الأمة

الحسين وزينب الكبرى (عليهما السلام) وبنت الهدى (قدس سرها)

إلى الوالدين الغالين

إلى أخوتي . . . محبة ووفاء

إلى المرجعية والشعوب التي تناصر الحق

الباحث

شكر وتقدير

الحمد لله على نعمه التي لاتعد ولاتحصى , والشكر لله أن فضلنا على جميع مخلوقاته ورزقنا عبادته. أفضل الصلاة وأزكى السلام على سيدنا وقائدنا محمد بن عبد الله وعلى أهل بيته (صلوات الله وسلامه عليهم) . وبعد

يسرني أن أتقدم بالشكر إلى الأستاذ المشرف الدكتور الدكتور جاسم حنون هاشم العوادي على متابعته المتواصلة طيلة مدة البحث, وعلى الجهد والوقت اللذين بذلهما من أجل إتمام هذه الرسالة فأسأل ربي أن يمده بالتوفيق والتألق الدائم.

وكما أتقدم بالشكر إلى رئاسة جامعة القادسية وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة للتسهيلات التي وفروها لإنجاز البحث.

الشكر الوافر للأهل بحق دعائهم والشكر لكل من مدَ يد العون ووقف لجانبي, أسأل البارئ

بالتوفيق جميعاً.

الخلاصة

استعمل في هذه الدراسة (85) أنثى و(20) ذكر من الجرذان البالغة, وتضمنت الدراسة ثلاثة تجارب ,التجربة الأولى لأجل استخراج الجرعة المؤثرة الوسطية ED50 للمستخلص المائي الحار لأوراق نبات إكليل الجبل إذ استعملت في هذه التجربة (25) أنثى وزعت إلى خمسة مجاميع , واحدة سيطرة والمجاميع الأربعة الأخرى جرعت المستخلص المائي الحار لأوراق نبات إكليل الجبل وبتراكيز تصاعدية (100, 200, 300, 400) ملغم/كغم ولمدة (8) أيام, والمعايير التي استعملت في هذه التجربة وزن المبيض الأيمن, وهرمون الاستروجين, والكلوتاثيون(GSH).

استعملت ال ED50 في التجربتين الثانية والثالثة , تضمنت التجربة الثانية مدتين (16 و32) يوم. تحتوي كل مدة على (20) أنثى من الجرذان, وزعت إلى أربعة مجاميع هي مجموعة السيطرة, ومجموعة المعاملة الأولى أعطيت النترات, ومجموعة المعاملة الثانية أعطيت مستخلص إكليل الجبل, فضلاً عن مجموعة المعاملة الثالثة أعطيت النترات ومستخلص إكليل الجبل, وفي نهاية كل مدة درست مستويات هرمونات الاستروجين, والبروجستيرون, ومحفز الجريب (FSH), واللوتيني (LH), والثايروكسين (T4), والثايرونين ثلاثي اليود (T3) ومحفز الدرقية (TSH), اضافة إلى دراسة مستوى الكلوتاثيون (GSH) والمالوندايالديهايد (MDA) والدراسة النسيجية للمبيض التي شملت قياس أقطار المبايض وأعداد وأقطار الجريبات (الابتدائية, والثانوية, والناضجة) .أما التجربة الثالثة فقد شملت (20) أنثى بالغة من الجرذان ولمدة (32) يوماً, وزعت إلى أربعة مجاميع هي مجموعة السيطرة, ومجموعة المعاملة الأولى أعطيت النترات, ومجموعة المعاملة الثانية أعطيت مستخلص إكليل الجبل, فضلاً عن مجموعة المعاملة الثالثة أعطيت النترات ومستخلص إكليل الجبل, وعند انتهاء هذه التجربة زوجت الأناث المعاملة بذكور غير معاملة, وذلك لإختبار خصوبة إناث الجرذان من خلال دراسة نسبة الإناث الحوامل, ومدة الحمل, وأعداد المواليد .

استخرجت الجرعة المؤثرة الوسطية ED50 في التجربة الأولى التي تساوي (226.68) ملغم/ كغم. وبينت نتائج الدراسة أن معاملة إناث الجرذان بنترات الصوديوم سببت انخفاضاً معنوياً ($P< 0.05$) في مستويات هرمونات الاستروجين, والبروجستيرون, ومحفز الجريب (FSH), واللوتيني (LH), والثايروكسين (T4), والثايرونين ثلاثي اليود (T3), في حين كان هناك ارتفاع معنوي ($P< 0.05$) في مستوى الهرمون محفز الدرقية (TSH). وقد أدت النترات أيضاً إلى حدوث انخفاضاً معنوياً ($P< 0.05$) في مستوى الكلوتاثيون GSH, وارتفاع معنوي ($P< 0.05$) في مستوى المالونداياالديهايد (MDA), فضلاً عن حدوث انخفاض معنوي ($P< 0.05$) في أقطار المبايض وأعداد وأقطار الجريبات الابتدائية والثانوية والناضجة وللمدتين (16 و32) يوماً, إذ تؤثر النترات بشكل أكبر عند زيادة المدة الى (32) يوم.

أظهرت نتائج الدراسة أن مستخلص إكليل الجبل يعمل على حصول زيادة معنوية ($P< 0.05$) في ومستويات هرمونات الاستروجين, والبروجستيرون, ومحفز الجريب, واللوتيني والثايروكسين, والثايرونين ثلاثي اليود, وانخفاض معنوى ($P< 0.05$) في مستوى الهرمون محفز الدرقية, وأن مستخلص إكليل الجبل أدى إلى زيادة معنوية ($P< 0.05$) في مستوى الكلوتاثيون وانخفاض معنوي ($P< 0.05$) في مستوى المالونداياالديهايد, فضلاً عن إن مستخلص إكليل الجبل أدى إلى حدوث زيادة معنوية ($P< 0.05$) في أقطار المبايض وأعداد الجريبات وأقطارها وللمدتين (16 و32) يوماً, إذ يؤثر المستخلص المائي الحار لأوراق إكليل الجبل بشكل أكبر عند زيادة المدة الى (32) يوم.

أشارت النتائج إلى أن مستخلص إكليل الجبل يعمل على تقليل التأثير السمي للنترات, إذ أدى إلى تحسن في مستوى هرمونات المبيض والهرمونات المنبه للمناسل والهرمونات الدرقية وانخفاض الهرمون محفز الدرقية, إضافة إلى إن مستخلص إكليل الجبل عمل على زيادة مستوى الكلوتاثيون وانخفاض المالونداياالديهايد وقد لوحظ كذلك أن هناك تحسناً كبيراً في أقطار المبايض وأعداد الجريبات وأقطارها جراء إعطاء المستخلص مع النترات وللمدتين (16 و32) يوماً .

وقد أوضحت النتائج أن إعطاء النترات لإناث الجرذان أدى إلى انخفاض الخصوبة بسبب انخفاض نسبة الإناث الحوامل مع زيادة مدة الحمل وانخفاض معنوي ($P< 0.05$) في أعداد المواليد. أما إناث الجرذان التي أعطيت مستخلص إكليل الجبل حدث لها حمل مع انخفاض مدة الحمل وكانت هناك زيادة معنوية ($P< 0.05$) في أعداد المواليد. كذلك أظهرت النتائج إن مستخلص إكليل الجبل الذي يعطى لإناث الجرذان بعد المعاملة بالنترات أحدث تحسناً في نسبة الإناث الحوامل ومدة الحمل وتحسناً في أعداد المواليد.

يمكن إستنتاج أن التعرض لنترات الصوديوم إدى الى إحداث ضرر في الجهاز التناسلي الانثوي والغدد المتعلقة به مثل الغدة الدرقية والنخامية , فضلاً عن زيادة الإجهاد التأكسدي, وأثبتت الدراسة إن إعطاء مستخلص إكليل الجبل له دور فعال في حماية الجهاز التناسلي الانثوي من الاضرار التي تسببها نترات الصوديوم.

المقدمة: Introduction

يصاب الإنسان بأضرار كبيرة نتيجة التعرض للمواد الكيميائية, ومن هذه المواد هي نترات الصوديوم Sodium Nitrate التي تسبب الكثير من الاضطرابات الوظيفية ومنها الميتهيموكلوبينية Methemoglobinia بسبب نقص الأوكسجين. وتحدث الميتهيموكلوبينية عندما ترتبط عوامل مؤكسدة بالهيموكلوبين (Bruce, 2013). فعند زيادة تركيز النترات في الجسم تصبح سامة وتسبب الضرر لخلايا الجسم إذ إن النترات تتحول بفعل بكتريا القناة الهضمية إلى نتريت الذي يرتبط مع الهيموكلوبين ليحوله إلى الميتهيموكلوبين Methemoglobin, إذ يفصل الحديد المرتبط بالهيموكلوبين ليرسب الحديد ويصبح الهيموكلوبين غير قادر على حمل الأوكسجين, كذلك تسبب النترات استرخاء العضلات الملساء Smooth muscle relaxation فضلاً عن التسمم القاتل في الأطفال نتيجة ابتلاع النترات مع الماء (Koppenol *et al*.,1992).

وتولد النترات جذور حرة محدثة ضرر في خلايا الجسم ومن هذه الجذور أوكسيد النتريك Nitric oxide (NO) الذي يثبط تولد الهرمونات الستيرويدية في الخلايا المبيضية (Syira *et al*., 1997). تزداد فرصة تعرض الإنسان للتسمم بالنترات نتيجة استعمالها كمواد حافظة Preservation في التصنيع الغذائي والاستعمال العشوائي وغير العلمي لتسميد التربة بالمواد النتروجينية لزيادة خصوبتها (Li *et al.,* 2002).

وتعد النباتات البرية أحد أكثر النباتات المستعملة في المجال الطبي , فالريحان والنعناع والزعتر وإكليل الجبل هي نباتات تابعة للعائلة الشفوية تمتلك فوائد طبية متعددة (Steinmetz and Potter, 1991) . فنبات إكليل الجبل أو حصالبان *Rosmarinus officinalis*: هو من النباتات الطبية العطرية وهو نبات عشبي دائم الخضرة من العائلة الشفوية, أزهاره صغيرة نيلية أو زرقاء اللون, رائحته شذية مفضلة منذ القدم (إبراهيم وجماعته , 2009). إن المستخلص المائي لنبات إكليل الجبل له القدرة على إعطاء الاليكترونات إلى الجذور الحرة ومن ثم تصبح هذه الجذور أكثر اتزاناً لذلك فإن إكليل الجبل يعطي الحماية للجزيئات البايولوجية مثل البروتينات والسكريات والأحماض الدهنية والأحماض الأمينية والحامض النووي DNA إذ إن له القدرة العالية على إزالة مختلف الأنواع من الأوكسجين والنتروجين الفعالة والكثير من الجذور الحرة (Saber and Hawazen,2012).

تتكون الجذور الحرة في الجسم بشكل مستمر ودائم طالما استمرت الحياة إذ يمكن أن تتولد من مختلف التفاعلات الأنزيمية وغير الأنزيمية في مختلف أنسجة الجسم بوصفها نواتج عرضية أو مركبات كيميائية لتؤدي وظائف فسلجية متنوعة مثل نقل المعلومات أو وسيلة للاتصال بين الخلايا وتنفيذ عمليات كثيرة تعتمد عليها حياة الخلية, وهناك توازن طبيعي بين إنتاج هذه الجذور وإنتاج مضادات الأكسدة Antioxidants التي تكون موجودة في الغذاء وبعضها يتكون داخل الجسم , ففي حالة زيادة الجذور الحرة وفقدان حالة التوازن سوف تسبب هذه الجذور الضرر لخلايا وأنسجة الجسم (Collins , 2005).

والأعشاب الطبيعية مثل نبات إكليل الجبل وأنواع أُخرى من النباتات تحوي مواد مضادة للأكسدة إذ إن إكليل الجبل يستعمل بشكل واسع كمواد مضافة للطعام, لكونه يمتلك تأثيرات وقائية للجسم وأن هذه الفعالية المضادة للأكسدة تأتي من كونه يحتوي كمية كبيرة من المركبات الفينولية Phenolic Compounds والفلافونيدات Flavonoids وأحماض طبيعية (Leung and Foster ,1996). لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى :

1- تحديد الجرعة المؤثرة الوسطية (ED50) للمستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل لدى إناث الجرذان البالغة .

2- دراسة الفاعلية العلاجية للمستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل في الجهاز التناسلي لأناث الجرذان التي تعرضت للتسمم بنترات الصوديوم. عن طريق دراسة مايأتي:

أ- تأثير إكليل الجبل على وظيفة المبيض من خلال دراسة مستويات هرمونات وقطر المبيض وأعداد وأقطار الجريبات المبيضية الأبتدائية والثانوية والناضجة

ب- قياس مستويات هرمونات الغدة النخامية والتي تشمل محفز الجريبات FSH واللوتيني LH ومحفز الدرقية TSH وقياس هرمونات الدرقية والتي تشمل الثايروكسين T4 والثايرونين ثلاثي اليود T3.

ج- دراسة خصوبة إناث الجرذان عن طريق مزاوجة الإناث المعاملة مع ذكور غير معاملة وحساب النسبة المؤية للحمل ومدة الحمل وأعداد المواليد.

النترات – النتريت Nitrate–Nitrite

تستعمل النترات على نطاق واسع في حفظ الأغذية ومخصب زراعي للمحاصيل, وكذلك في الأدوية المدررة للبول (Mohamed and Anwar, 2010), إذ إن تركيز النترات المسموح به في المياه (4.43) ملغم نترات/لتر و (3.29) ملغم نتريت/لتر, وإن الجرعة نصف المميتة LD50 لنترات الصوديوم لذكور الجرذان البالغة هي (1921.15) ملغم/ كغم (البابلي, 2006). وتعد النترات – النتريت من العناصر الغذائية , إذ تحتوي وجبة الطعام اليومية على نترات فضلاً عن النتريت تصل جسم الحيوان عن طريق الغذاء, وهناك كمية قليلة من النترات تتكون داخل الجسم وتسمى ذاتية النشوء إذ ليس كل النترات هي ذات أصل غذائي (Helal *et al.,* 2000).

لقد عرف منذ عام – 1890 أن المادة الفعالة في الحفظ هي النتريت (عبد الجواد , 2008), إذ إن النترات تتحول إلى نتريت بفعل التأثير البكتيري في أثناء التصنيع والتخزين, وحالياً يتم إنتاج النتريت تجارياً لاستعمالها في حفظ اللحم (Epley *et al.*, 2008). ويكتسب الإنسان النترات– النتريت في أثناء تناول الغذاء أو شرب الماء وكمية قليلة تصل من استنشاق الهواء, وإن مصدر النترات في الماء يبدأ من التربة وخاصة الترب التي تضاف إليها المخصبات الزراعية. إذ إن أحماض النتروز وأملاح النتريت يمكن أن تتحد مع الأوكسجين المذاب في الماء لتكون النترات مما يجعل الماء فقيراً للأوكسجين, وهذا يسبب التسمم للمياه (WHO, 2007). وعند وصول النترات إلى الجسم تزداد تراكيز الجذور الحرة محدثة أضراراً كبيرة وخطرة مثل التسرطن واختلال الغدة الدرقية كذلك التأثير على الجهاز التناسلي (Bukowski *et al.*, 2001).

مصادر النترات Nitrate sources

مصادر خارجية المنشأ

تنشأ طبيعياً من دورة النتروجين في الطبيعة تصل الجسم عن طريق الغذاء والماء (Drive, 2006) وعن طريق الاستنشاق في حالة الغلاف الجوي الملوث بأوكسيد النتريك (Bruce, 2013). إذ ينطلق أوكسيد النتريك نتيجة استعمال حامض النتريك في الصناعة فعند تفاعل حامض النتريك مع المعادن أو المواد العضوية تنطلق أكاسيد النتريك السامة (القماز, 2003).

مصادر داخلية المنشأ

تتكون داخل الجسم تبدأ بعملية تحويل الارجنين Arginine بواسطة الخلايا البلعمية الكبيرة Macrophages فضلا عن الكثير من أنواع الخلايا إلى اوكسيد النتريك والسترولين Citrulline إذ يتبعها عملية تحول أُوكسيد النتريك إلى (N_2O_3) يتفاعل المركب الأخير مع الماء لتكوين النترات (Gangolli *et al.,* 1994) . كما هو في المعادلة الآتية:

$$\text{Arginine} \xrightarrow{\text{Macrophages}} \text{NO} + \text{Citrulline}$$

$$\text{NO} \longrightarrow N_2O_3 + H_2O \longrightarrow NO_3$$

وهناك طريق آخر لتكون أوكسيد النتريك والسترولين وذلك بواسطة الإنزيم المخلق لأُوكسيد النتريك (NOS) Nitric oxide synthase, وهذه العملية تحتاج إلى مساعد الأنزيم النيكوتيناميد أدنين ثنائي النيوكليوتايد فوسفات (NADP) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate كما هو في المعادلة التالية:

$$\text{Arginine} \xrightarrow[\text{NADP}]{\text{NOS}} \text{NO} + \text{Citrulline}$$

ويوجد الإنزيم المخلق لأوكسيد النتريك (NOS) بثلاث حالات:

1- الإنزيم المخلق لأوكسيد النتريك الباحث Inducible NOS (iNOS): عند انتقال الأنزيم بين أنسجة وأعضاء الجسم يسمى بالباحث.

2- الإنزيم المخلق لأوكسيد النتريك العصبي Neuronal NOS (nNOS): هو الإنزيم الموجود في الجهاز العصبي.

3- الإنزيم المخلق لأوكسيد النتريك البطاني Endothelial NOS (eNOS) : هو الإنزيم الموجود في البطانة الأندوثيلية للأوعية الدموية (Tripathi and Krishna, 2008).

نبات إكليل الجبل *Rosmarinius officinalis*

نُبذة تأريخية Historical view

استعمل إكليل الجبل منذ زمن بعيد فقد كان الإغريق والرومان يضعون أوراق وأزهار النبات على ملابسهم للتزين به خاصة في المناسبات, وكان يزرع في حدائق الملوك بوصفه نباتاً عطرياً وزينة , استعمل ايضاً في المجال الطبي بوصفه منشطاً للذاكرة (Siktberg ,2009). وقد اكتشفت الفعالية المضادة للأكسدة لنبات إكليل الجبل في العام – 1950 , أما حامض الروزمارنيك فقد عزله العالمان Oriente و Scarbati عام – 1960 من المستخلص المائي لنبات إكليل الجبل, وبدأ استعمال هذا النبات مضاداً للأكسدة, فقد وجد أنه يحتوي مركبات تمنع تكسر المادة الدماغية ويقلل من خطورة الأشعة مثل أشعة كاما (Sarac and Ugar, 2007).

الوصف العام للنبات General description of the plant

هو نبات عشبي كثير التفرع , يصل ارتفاعه إلى نحو (1,5) م , يتحمل درجات الحرارة المنخفضة وينمو في المناطق الدافئة (20 – 35) مْ, الأوراق عطرية بسيطة شريطية ولها عرق وسطي بارز يميل لون سطح الورقة العلوي إلى الأخضر الفاتح والسفلي إلى الرمادي أو الفضي تخرج الأوراق من الساق في مجموعات ثُلاثية الورقات (الحكيم, 2012), يزهر النبات منذ بداية شهر نيسان حتى نهاية شهر تشرين الأول (Bakirel *et al.*, 2008), والأزهار زرقاء أو بنفسجية تجتمع في نورات عنقودية طرفية وهي وافرة الرحيق تجذب النحل, يتكاثر إكليل الجبل جنسياً عن طريق البذور التي تزرع في فصل الخريف , كذلك يتكاثر خضرياً بتجذير العقل الطرفية في الربيع والخريف (محمد, 2004).

موطن النبات Plant habitation

يزرع في مناطق مختلفة من العالم, وينمو بشكل واسع في دول البحر الأبيض المتوسط مثل سوريا وتركيا وشمال أفريقيا مثل مصر وفي أوربا مثل إيطاليا واليونان وفرنسا (Ana *et al.,* 2005), ويزرع في آسيا الوسطى, والهند, واستراليا والولايات المتحدة وجنوب البرازيل, غير أن بعض الدول اهتمت بإنتاجه كونه أصبح واسع الاستعمال في العالم, كما في الصين إذ يستعمل مستحضراً للتجميل, ومن أهم الدول المنتجة لزيوت إكليل الجبل هي المغرب وتونس واسبانيا والولايات المتحدة (Mishra *et al.*, 2009).

التسمية Nomiculture

يسمى إكليل الجبل في الوطن العربي بأسماء متعددة مثل, حشيشة العرب, حصالبان, إكليل النفساء , ندى البحر , روزماري (الصالح, 1998), ويسمى النبات القطبي , وعشب البوصلة والأمازيفية , والآزير , والتوزالة , وفي الإنكليزية يسمى Rosemary والاسم العلمي له هو *Rosmarinus officinalis* (محمد, 2004). واشتق اسم الجنس Rosmarinus من الكلمة اللاتينية Ros وmarinus , وال Rosmarinus باللاتيني تعني ندى البحر (Dew of the sea) (Siktberg, 2009).

تصنيف النبات Classification of plant

مملكة : النباتات	Kingdom : Plantae
شعبة : النباتات البذرية	Phylum : Spermatophyte
صنف : مغطاة البذور (النباتات الزهرية)	Class: Angiosperms (Flowering plants)
قسم : ذوات الفلقتين	Division : Dicotyledons
رتبة : الأنبوبيات	Order : Tubiflorae
عائلة : الشفويات	Family : Labiatae(Lamiaceae)
جنس: إكليل الجبل	Genus : *Rosmarinus*
النوع :إكليل الجبل	Species: *officinalis*

تتصف نباتات هذه العائلة بأن معظمها أعشاب عطريه لاحتوائها على زيوت طيارة. وهي نباتات حولية أو معمرة , أحياناً شجيرات أو أشجار , السيقان رباعية الأضلاع.

وتضم هذه العائلة (200) جنس و (3500) نوع منتشرة في جميع أنحاء العالم ومركز انتشارها إقليم البحر الأبيض المتوسط (الكاتب, 2000).

الأجزاء الطبية Medical parts

أجمع المهتمون بالنباتات على أن الأجزاء الهوائية لنبات إكليل الجبل هي الأجزاء المستعملة في العلاج التقليدي, وكذلك الدراسات الحديثة وبالأخص الأوراق (إبراهيم, 2013).

استعمالات النبات Plant usages

الاستعمالات الصناعية Industrial usages

يستعمل إكليل الجبل في إضافة نكهة غذائية (توابل) (Gilani and Rahman,2005) وفي صناعة الزيوت الغذائية التي تسمى زيوت الروزمري والتي تستخرج بواسطة التقطير, إذ تشتهر البرازيل بصناعة هذه الزيوت (Ana, 2005) كذلك يستعمل النبات في مستحضرات التجميل, وفي صناعة الصابون والشامبو, وصناعة العطور (Oluwatuyi *et al.*, 2004).

الاستعمالات الطبية Medicinal usages

يمتلك إكليل الجبل فوائد كثيرة فهو يستعمل في علاج اضطرابات المغص الكلوي, وعسر الطمث, والقرحة الهضمية, والأمراض الالتهابية, ومنع حدوث ذات الرئة القصيبي والسرطان (Katrino-Poulos *et al.,* 2005; Brickell, 1990) فقد وجد أن السكائر التي تحتوي على مستخلص إكليل الجبل ينخفض فيها البنزوبايرين Benzopyrene إلى (70)% مما يقلل من حدوث خطر السرطان الرئوي (Fahim *et al.*, 1999). يعمل على استرخاء العضلات الملساء في القصبة الهوائية والأمعاء , ويكبح حدوث توليد الأورام Antitumorogenic, وعلاج اضطراب نشوء النطف , ودواء لتسمم الكبد وأمراض القلب الاسكيمية (فقر دم بسبب صعوبة تدفق الدم في الشرايين) , ويمنع من تكون الماء الأسود أو الأبيض في العين (Al-Sereiti *et al.,*1999) وهو مطهر ومفرغ للصفراء , ومدرر للبول, وشافي للجروح ويستعمل أيضاً لمكافحة الطفيليات الخارجية , ومعالجة الروماتيزم, ومنشط للذاكرة (قبيسي, 2004) حيث بينت دراسة انه عند إضافة زيت إكليل الجبل ذي الرائحة النعناعية إلى بيئة تحوي مجموعة من الكلاب , فان هذه الحيوانات سوف تكثر من وقتها في الحركة, إذ وجد أن زيت إكليل الجبل يؤثر على الجهاز العصبي من خلال حاسة الشم إذ إن المستقبلات الشمية الموجودة في الأنف تستجيب لهذا العطر وتنقله إلى الدماغ محدثة النشاط للدماغ (Graham *et al.*, 2005). فقد وجد إن زيت إكليل الجبل ينشط الاستيل كولين Acetylcholin وهذا يتم بواسطة السينول والبينين الموجودان ضمن المواد الكيميائية لنبات إكليل الجبل , إذ إن انخفاض الاستيل كولين يحدث اضطراب في الخلايا العصبية ويحدث أمراض الدماغ الشديدة مثل الزهايمر أو فقدان الذاكرة Alzeimers disease , والوهن العضلي الوبيل Myasthenia gravis الذي يحدث بسبب نقص كبير في الاستيل كولين بالعضلات

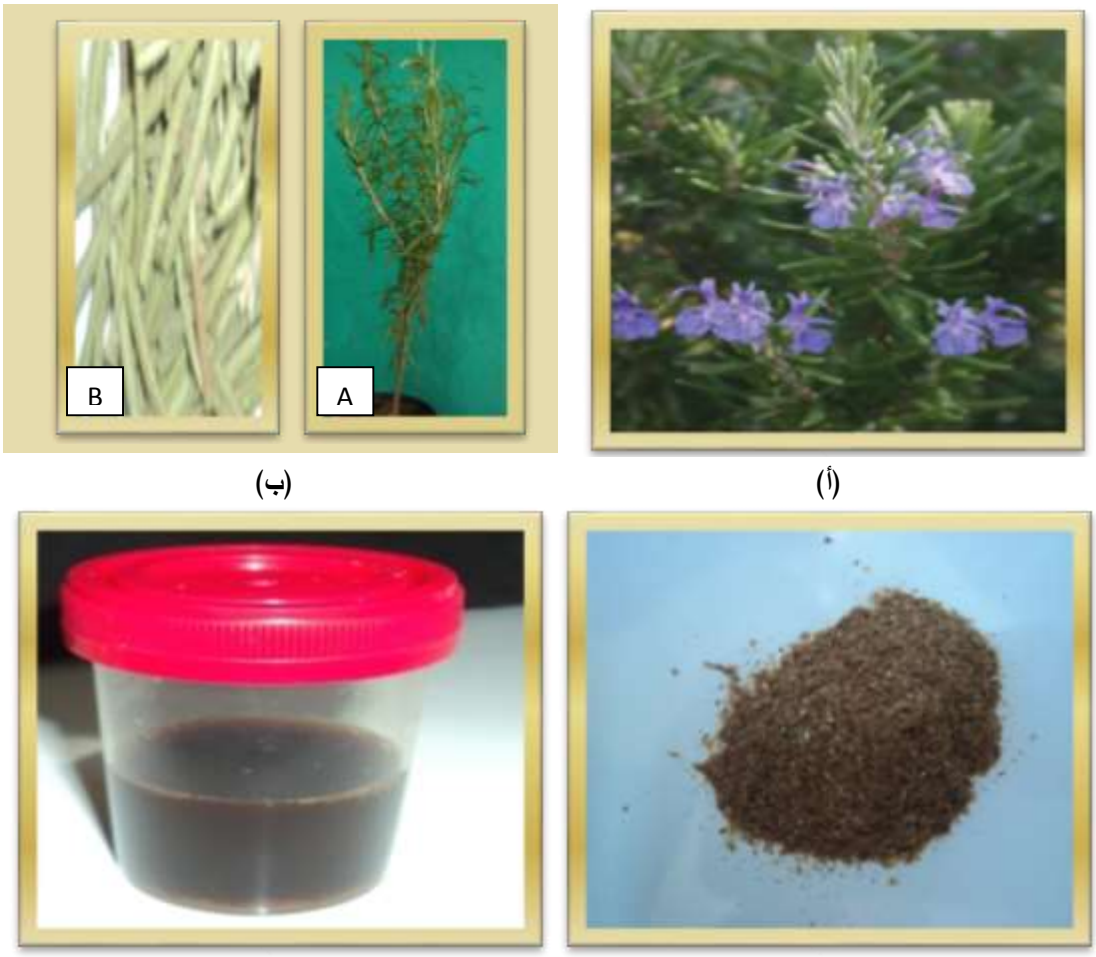
(Orhan *et al.*, 2008). واستعمل إكليل الجبل لعلاج الربو, والزكام , والارتعاش , والأرق والبهاق , وتحفيز نمو الشعر, وخفض الكولسترول (Cakilcioglu and Turkoglu,2007). ويعمل مستخلص إكليل الجبل على تثبيط فعالية الخلايا الناقضة للعظم Osteoclasats وزيادة كثافة العظم (Putnam *et al.*, 2006). فقد وجد أن إعطاء (1) غم/ كغم من مسحوق أوراق نبات إكليل الجبل مع الغذاء إلى الجرذان يسبب ارتفاعاً معنوياً في كالسيوم العظام مما يقلل من هشاشة العظام ويعطيها الدعم (Faixova, 2008), ومن جانب آخر يقلل إكليل الجبل من سكر الدم فعند إعطاء مستخلص النبات إلى الأرانب التي أعطيت الألوكسان Alloxan–diabetic ادى الى انخفاض سكر الدم وارتفاع مستوى الأنسولين (Bakirel *et al.*, 2008).فضلاً عن ذلك يعمل مستخلص إكليل الجبل عند إعطائه للأرانب ولمدة (30) يوماً إلى زيادة تكاثر الخلايا اللمفية وزيادة تركيز الأنترليوكين–2 مما يؤثر ايجابياً على المناعة (Beghelli *et al.*, 2012). ويعمل مستخلص إكليل الجبل على التنظيم الدقيق لضربات القلب (Road, 2009).

تحضير المستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل

حضر المستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجيل *Rosmarinius officinalis* حسب طريقة Eman (2012) , إذ طحنت الأوراق باستعمال خلاط كهربائي , وأُخذ (10)غم من مسحوق الأوراق ونقع في (100) مل من الماء المقطر, وترك النقيع ليلة واحدة ثم وضع في حمام مائي بدرجة حرارة (100) مْ ولمدة ساعة ثم ترك ليبرد بعد ذلك رشح خلال أوراق ترشيح مزدوجة, ووضع الراشح في المبخر الدوار Rotary evaporator تحت درجة حرارة (45) مْ, بعد ذلك أخذت خلاصة ألأوراق وحفضت في الثلاجة بدرجة (4°C) لحين الاستعمال.

طريقة إعطاء المستخلص والنترات Giving method of the extract and nitrate

أعطيت الحيوانات المستخلص والنترات يومياً عن طريق الفم Orally بوساطة محقنة طبية سعة (1) مل مزودة بأداة تجريع على هيئة أنبوبة معدنية رفيعة ومعقوفة الشكل,(ملحق 2). أعطى المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل بعد ساعة من المعاملة بجرعة (200)ملغم/ كغم بنترات الصوديوم لضمان انتشارها في الجسم وذلك بحسب طريقة البابلي (2006) , وقد حسبت جرعة المستخلص والنترات التي تعطى لإناث الجرذان بحسب طريقة أوجي (2004), (ملحق 3) وقد جرعة الحيوانات في الطور الأول للدورة الشبقية وهوالطور قبل الشبق Proestrous وذلك بعزل الحيوانات التي بدأ فيها الطور قبل الشبق عن الحيوانات التي لم يبدأ فيها هذا الطور وتجريعها.



شكل (3-1): (أ) أوراق وأزهار نبات إكليل الجبل مأخوذة من Siktberg (2009) (ب) (A) نبتة إكليل الجبل (B) ألأوراق الجافة لإكليل الجبل (جلبت من كلية الزراعة- جامعة بغداد) (ج) مستخلص إكليل الجبل قبل تذويبه (د) مستخلص إكليل الجبل بعد تذويبه.

طريقة استخراج قيمة الجرعة المؤثرة الوسطية ED50 للمستخلص المائي الحار لاوراق نبات إكليل الجبل

اعتمدت ثلاثة معايير لاستخراج قيمة الجرعة المؤثرة الوسطية ED50 وذلك تبعاً لطريقة (Randolph and Ciminera , 1985) .

1- وزن المبيض الأيمن لإناث الجرذان

2- مستوى هرمون الاستروجين

3- مستوى الكلوتاثيون

يمكن توضيح كيفية حساب التراكيز المختلفة للمستخلص

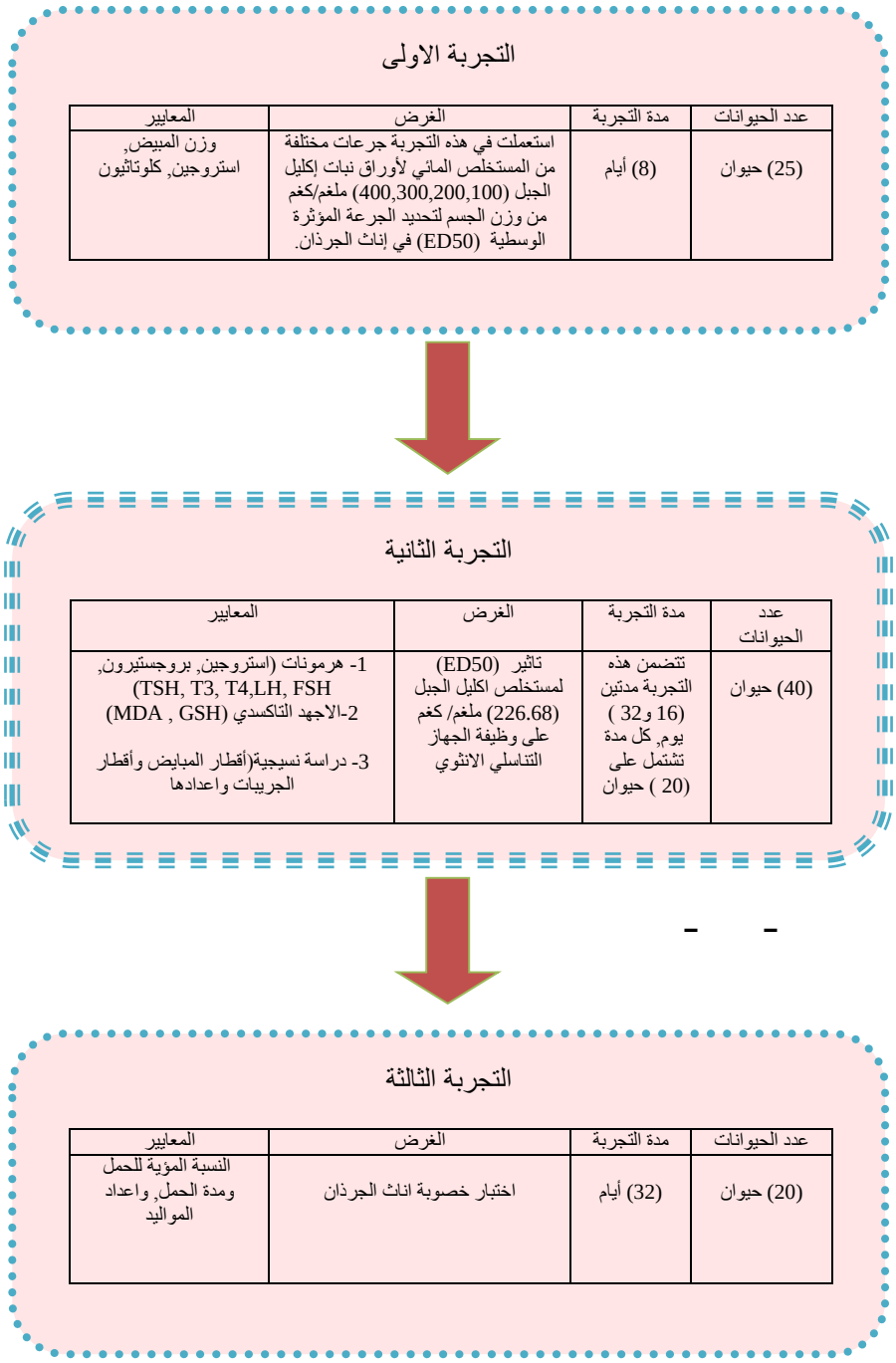
الجرعة بالملغم/ كغم	الجرعة بالغرام/ كغم ليوم واحد	الجرعة بالغرام/ كغم لثمانية أيام (فترة التجربة الأولى التي أستخرجت فيها الجرعة المؤثرة)
100ملغم/ كغم	0.1 غم/ كغم	0.1 غم/ كغم 8 أيام = 0.8 غم
200 ملغم/ كغم	0.2 غم/ كغم	0.2 غم/ كغم 8 أيام = 1.6 غم
300 ملغم/ كغم	0.3 غم/ كغم	0.3 غم/ كغم 8 أيام = 2.4 غم
400 ملغم/ كغم	0.4 غم/ كغم	0.4 غم/ كغم 8 أيام = 3.2 غم

المعيار الأول (وزن المبيض الأيمن لإناث الجرذان) : طبقت ثمان خطوات لاستخراج قيمة الجرعة المؤثرة .

1- إعداد جدول يتضمن جميع البيانات المطلوبة وعلى النحو الآتي :-

Observations المشاهدات أو عدد العينات	Variables تركيز لثمانية ايام X	وزن المبيض Y المستخلص	X^2	Y^2	XY
السيطرة (5حيوانات)	لم تعطى المستخلص	(39.96)mg وزن اول مبيض	.	.	**0**
مجموعة التركيز الاول (100) ملغم (5حيوانات)	(0.8) g	.	.	.	.
مجموعة التركيز الاول (200) ملغم (5حيوانات)	(1.6) g	.	.	.	.
مجموعة التركيز الاول (300) ملغم (5حيوانات)	(2.4) g	.	.	.	.
مجموعة التركيز الاول (400) ملغم (5حيوانات)	(3.2) g	(36) mg المبيض الاخير	.	.	.
عدد الحيوانات الكلي = (25) حيوان	ΣX=(40)	ΣY=(1047.56)	ΣX^2=96	ΣY^2=44149.09	**ΣXY=1638.47**

مخطط يبين تصميم تجارب الدراسة



تصميم التجارب Experiments design :

شملت الدراسة ثلاث تجارب:

التجربة الأولى :-

استعملت في هذه التجربة جرعات مختلفة من المستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل (400,300,200,100) ملغم/كغم من وزن الجسم لتحديد الجرعة المؤثرة الوسطية (ED_{50}) في إناث الجرذان . عدد الحيوانات التي استعملت في هذه التجربة (25) أنثى ولمدة (8) أيام, وزعت الحيوانات عشوائياً إلى (5) مجاميع كل مجموعة تحتوي (5) حيوانات .

1- مجموعة السيطرة : جرعت بمقدار 0.5 مل من المحلول الفسيولوجي يومياً .

2- مجموعة المعاملة الأولى (T1): جرعت بالتركيز الأول من المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل والذي يساوي (100) ملغم/كغم من وزن الجسم.

3- مجموعة المعاملة الثانية (T2): جرعت بالتركيز الثاني من المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل والذي يساوي (200) ملغم /كغم من وزن الجسم.

4- مجموعة المعاملة الثالثة (T3): جرعت بالتركيز الثالث من المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل والذي يساوي (300) ملغم/كغم من وزن الجسم.

5- مجموعة المعاملة الرابعة (T4): جرعت بالتركيز الرابع من المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل والذي يساوي (400) ملغم/ كغم من وزن الجسم.

المعايير المدروسة في هذه التجربة هي (وزن المبيض الأيمن , مستوى هرمون الاستروجين , مستوى الكلوتاثيون).

التجربة الثانية :-

تضمنت هذه التجربة دراسة تأثير النترات والجرعة المؤثرة الوسطية ED50 لمستخلص إكليل الجبل على الجهاز التناسلي لأناث الجرذان. استعملت في هذه التجربة (40) حيواناً من إناث الجرذان ولمدتين (16 و 32) يوم حيث انه كل مدة تحوي (20) حيوان, وزعت الحيوانات عشوائياً إلى (4) مجاميع كل مجموعة تشتمل على (5) حيوانات .

1- مجموعة السيطرة: جرعت بمقدار 0.5 مل من المحلول الفسيولوجي يومياً ولمدة (16) يوماً.

2- مجموعة المعاملة الأولى: جرعت نترات الصوديوم بتركيز (200) ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً ولمدة (16) يوماً.

3- مجموعة المعاملة الثانية: جرعت حيوانات هذه المجموعة مستخلص إكليل الجبل (ED50) بتركيز (226.68) ملغم/ كغم يومياً ولمدة (16) يوماً.

4- مجموعة المعاملة الثالثة: جرعت نترات الصوديوم بتركيز (200) ملغم / كغم وبعد ساعة من المعاملة بنترات الصوديوم جرعت الحيوانات المستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل بتركيز (226.68) ملغم/ كغم يومياً ولمدة (16) يوماً.

المعايير التي درسة في هذه التجربة هي قياس مستوى هرمون الأستروجين والبروجستيرون, ومحفز الجريب (FSH) واللوتيني (LH), والثايروكسين (T4) والثايرونين ثلاثي اليود (T3), ومحفز للدرقية (TSH) إضافة إلى دراسة مستوى الكلوتاثيون (GSH) والمالونداياالديهايد (MDA) والدراسة النسيجية للمبيض التي تمثلت بدراسة أقطار المبايض وأعداد وأقطار الجريبات الابتدائية والثانوية والناضجة.

التجربة الثالثة :-

تضمنت هذه التجربة دراسة تأثير النترات والجرعة المؤثرة الوسطية ED50 لمستخلص إكليل الجبل على خصوبة إناث الجرذان ولمدة (32) يوماً. استعملت في هذه التجربة (20) حيواناً من إناث الجرذان وزعت عشوائياً إلى (4) مجاميع كل مجموعة تحتوي (5) حيوانات.

1- مجموعة السيطرة : جرعت بمقدار 0.5 مل من المحلول الفسيولوجي يومياً ولمدة (32) يوماً.

2- مجموعة المعاملة الأولى: جرعت نترات الصوديوم بتركيز (200) ملغم/كغم من وزن الجسم يومياً ولمدة (32) يوماً.

3- مجموعة المعاملة الثانية: جرعت حيوانات هذه المجموعة مستخلص إكليل الجبل بتركيز (226.68) ملغم/ كغم يومياً ولمدة (32) يوماً.

4- مجموعة المعاملة الثالثة: جرعت نترات الصوديوم بتركيز (200) ملغم / كغم, وبعد ساعة من المعاملة بنترات الصوديوم جرعت الحيوانات المستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل بتركيز (226.68) ملغم/ كغم يومياً ولمدة (32) يوماً.

وفي نهاية التجربة زوجت إناث الجرذان بذكور بالغة غير معاملة لدراسة بعض معايير الخصوبة مثل النسبة المؤية للحمل, ومدة الحمل, واعداد المواليد.

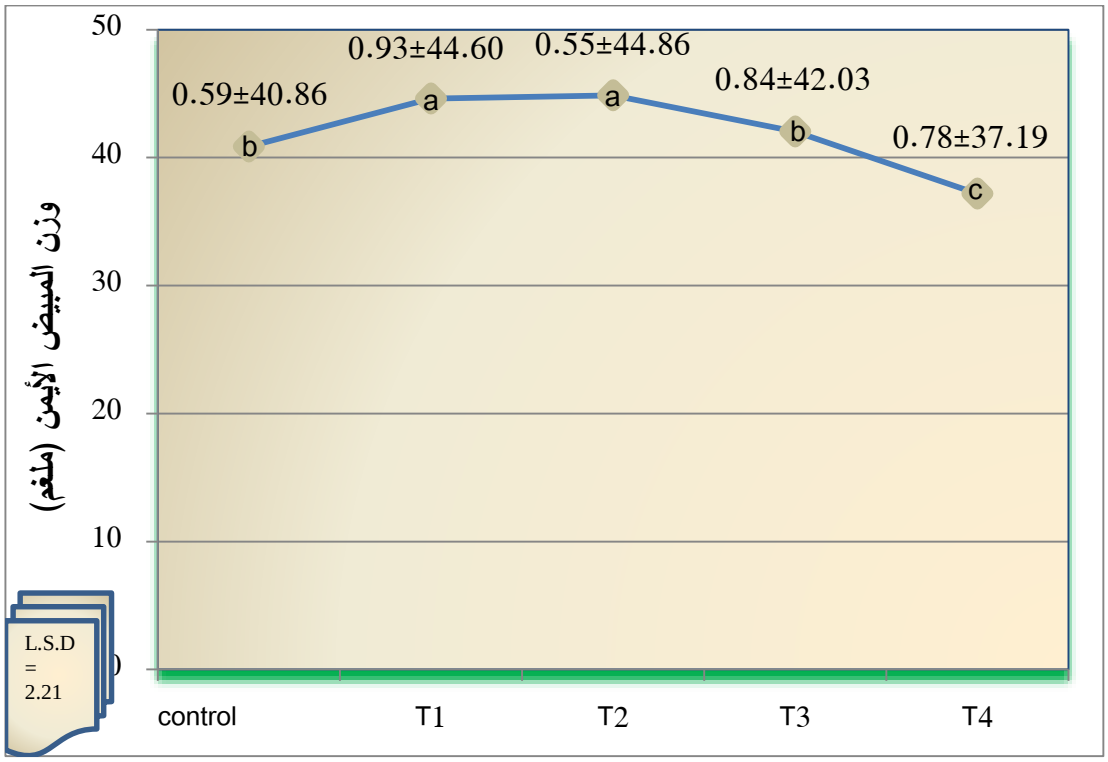
جمع العينات Samples collection

بعد انتهاء التجربة أخذت أوزان الحيوانات وهي في الطور قبل الشبقProestrus وخدرت عن طريق استنشاقها لمادة الكلوروفورم Chloroform ثم سحب الدم من القلب مباشرة بطريقة طعنة القلب Heart puncture باستعمال محقنة طبية Disposable syringe معقمة سعة (5) مل ووضع كل (3) مل من الدم في أنبوبة اختبار زجاجية وتركت لمدة (15- 20) دقيقة بصورة مائلة في درجة حرارة المختبر, ثم وضعت العينات داخل جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة (15) دقيقة, وعزل المصل بوساطة ماصة دقيقة Micropipette ووضع في أنابيب بلاستيكية جديدة وحفظ بدرجة حرارة (20-) مْ لغرض إجراء الاختبارات الهرمونية وقياس الكلوتاثيون والمالونداياالديهايد في مصل الدم . وبعد أخذ عينات الدم عمل شق طولي من الجهة البطنية, إذ استؤصل المبيض الأيمن وأزيلت المواد الدهنية الملتصقة به ونشف بواسطة ورق ترشيح ثم وزن باستعمال ميزان حساس نوع Sartorius ووضع في محلول الفورمالين (10)% وذلك لتحضير المقاطع النسيجية (البابلي , 2006). **و**يحضر الفورمالين (10)% من خلال إضافة (10) مللتر من فورمالديهايد Formaldehyde (37-40)% إلى (90) مللتر ماء جاري tab water (Vacca,1985).

التجربة الأولى : حددت الجرعة المؤثرة الوسطية (ED50) للمستخلص المائي الحار لأوراق نبات إكليل الجبل تبعاً لدراسة المعايير الآتية:

معدل وزن المبيض الأيمن لإناث الجرذان

أظهرت النتائج بأن هناك ارتفاعاً معنوياً ($p< 0.05$) في وزن المبيض في المجموعتين (T1وT2) مقارنة مع السيطرة, وأشارت النتائج إلى عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$) في وزن المبيض في المجموعة (T3) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة لكنها منخفضة معنوياً ($p< 0.05$)عند مقارنتها بالمجموعتين (T1 وT2) , في حين كان هناك انخفاض معنوي ($p< 0.05$) في وزن المبيض في المجموعة (T4) عند مقارنتها مع كل المجاميع. وعند المقارنة بين المجموعتين (T1 وT2) لم يلاحظ وجود فروق معنوية($p > 0.05$) في وزن المبيض (شكل 4-1).



شكل (4-1) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل على وزن المبيض الأيمن لإناث الجرذان.

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي.
الأحرف المختلفة تبين وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية($P< 0.05$) بين المجاميع.
الأحرف المتشابهة تبين عدم وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية($P< 0.05$) بين المجاميع.
Control: السيطرة
T1 : (100) ملغم/ كغم مستخلص أوراق إكليل الجبل
T2 : (200) ملغم/ كغم مستخلص أوراق إكليل الجبل
T3 : (300) ملغم/ كغم مستخلص أوراق إكليل الجبل
T4 : (400) ملغم/ كغم مستخلص أوراق إكليل الجبل

التجربة الثانية:

تأثير معاملة إناث الجرذان بالمستخلص المائي الحار لأوراق نبات إكليل الجبل والنترات للمدتين (16 و 32) يوم.

المعايير الهرمونية

هرمون الاستروجين

انخفض مستوى هرمون الاستروجين معنوياً ($P< 0.05$) في المجموعة الأولى المعاملة بالنترات عند المقارنة بحيوانات المجاميع الأخرى للمدتين (16 و 32) يوم, وقد أظهرت المجموعة الثانية المعاملة بالمستخلص ارتفاعاً معنوياً في مستوى هرمون الاستروجين عند المقارنة مع بقية المجاميع في كل من المدتين (16 و 32) يوم, وكان هناك ارتفاع معنوي ($P< 0.05$) في مستوى هرمون الاستروجين في المجموعة الثالثة المعاملة بالنترات والمستخلص عند المقارنة بالسيطرة ولكل من المدتين (جدول 4-1)

أشارت النتائج الى وجود فروق معنوية ($P< 0.05$) في مستوى هرمون الاستروجين بين مدتي المعاملة (16 و 32) يوم للمجاميع الاولى والثانية والثالثة.

هرمون البروجستيرون

يوضح جدول (4-1) بأن مستوى هرمون البروجستيرون انخفض معنوياً ($P< 0.05$) في حيوانات المجموعة الأولى عند المقارنة بحيوانات المجاميع الأخرى ولمدتي المعاملة, وكان هناك ارتفاع معنوي في مستوى هرمون البروجستيرون في المجموعتين الثانية والثالثة عند المقارنة مع السيطرة ولكلا المدتين (16 و 32) يوم , ولم يلاحظ فرق معنوي ($P> 0.05$) عند مقارنة المجموعتين الأخيرتين مع بعضهما للمدة الاولى (16) يوم.

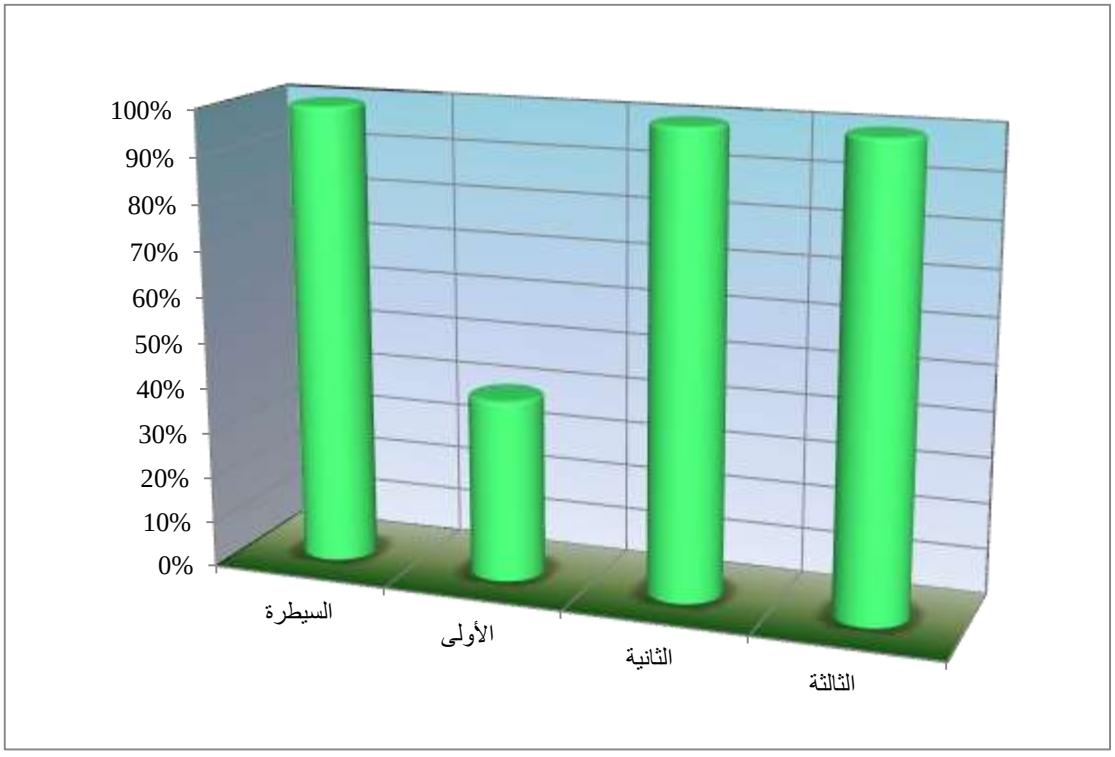
أكدت النتائج وجود فروق معنوية ($P< 0.05$) في مستوى هرمون البروجستيرون بين مدتي المعاملة (16 و 32) يوم للمجاميع الاولى والثانية والثالثة.

التجربة الثالثة

أختبار خصوبة إناث الجرذان المعاملة بالمستخلص المائي الحار لأوراق نبات إكليل الجبل والنترات لمدة (32) يوم.

نسبة الإناث الحوامل

أشارت النتائج إلى أن نسبة الإناث الحوامل كانت 40% في المجموعة الأولى التي أوعطيت النترات مقارنة مع مجموعة السيطرة والتي كانت فيها نسبة الإناث الحوامل 100%, إلا إن نسبة الإناث الحوامل كانت 100% في المجموعتين الثانية والثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة, (شكل 4-4) .



شكل (4-4) تأثير مستخلص إكليل الجبل على نسبة الحمل لإناث الجرذان المعاملة بنترات الصوديوم لمدة (32) يوم.

السيطرة

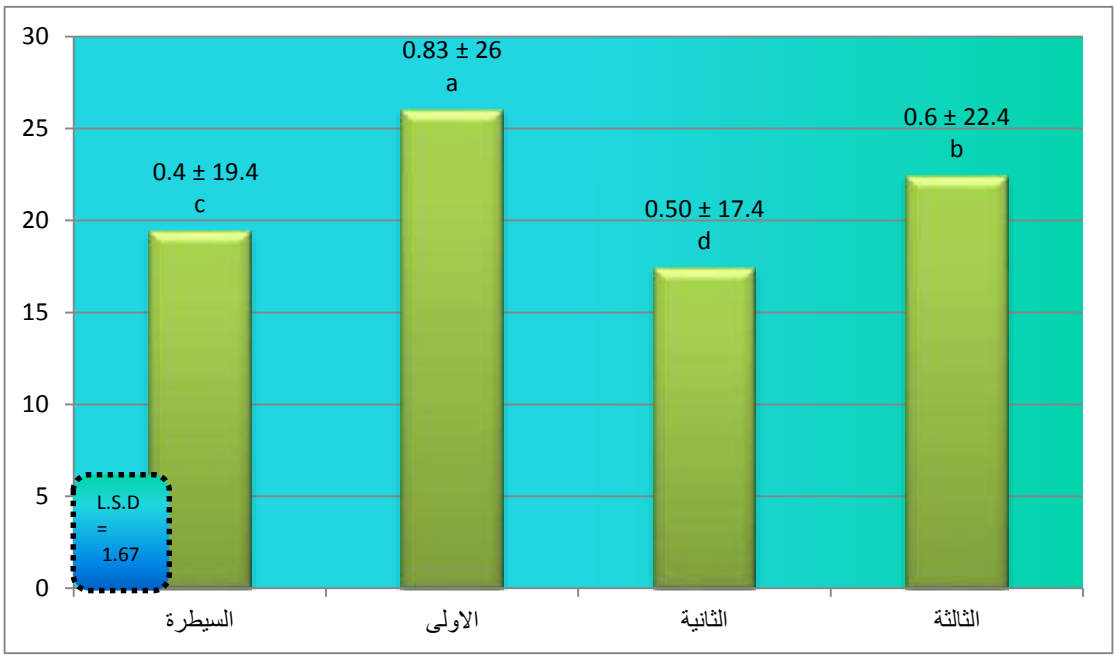
الأولى: (200) ملغم/ كغم نترات الصوديوم

الثانية: (226.68) ملغم/ كغم المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل

الثالثة: (200) ملغم/ كغم نترات الصوديوم و (226.68) ملغم/ كغم المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل

مدة الحمل

يبين الشكل (4-6) بأن مدة الحمل ارتفعت معنوياً (P< 0.05) في حيوانات المجموعة الأولى مقارنة بكل المجاميع , وكان هناك انخفاضاً معنوياً (P< 0.05) لمدة الحمل في المجموعة الثانية عند المقارنة مع بقية المجاميع , كذالك وجد انخفاض معنوي (P< 0.05) في مدة الحمل في المجموعة الثالثة عند المقارنة بالمجموعة الاولى المعاملة بنترات الصوديوم.



شكل (4-5) تأثير مستخلص إكليل الجبل على نسبة الحمل لإناث الجرذان المعاملة بنترات الصوديوم لمدة (32) يوم.

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي.
الأحرف المختلفة تبين وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية(P< 0.05) بين المجاميع.
الأحرف المتشابهة تبين وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية(P< 0.05) بين المجاميع.
السيطرة
الأولى: (200) ملغم/ كغم نترات الصوديوم
الثانية: (226.68) ملغم/ كغم المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل
الثالثة: (200) ملغم/ كغم نترات الصوديوم و (226.68) ملغم/ كغم المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل

التغيرات الهرمونية
هرمونات المبيض

أوضحت نتائج الدراسة الحالية بان معاملة إناث الجرذان بالنترات أدت إلى انخفاض معنوي في مستوى هرمون الاستروجين والبروجستيرون, وعند زيادة فترة التعرض للنترات كان الانخفاض أكثر وضوحاً. إذ بينت نتائج هذه الدراسة أن النترات تعمل على تقليل مستوى الهرمونات المنبه للمناسل المتمثلة بالهرمون محفز الجريب (FSH) والهرمون اللوتيني (LH) والتي يصاحبها انخفاض في مستوى هرمونات المبيض, وهذا يتفق مع ما وجده Viana وجماعته (2007) بان النترات تعمل على خفض مستوى الهرمونات المنبه للمناسل وهرمونات المبيض.

هناك عدد من الدراسات تؤكد ما توصلت إليه نتائج الدراسة الحالية بأن النترات تعمل على خفض مستوى هرمونات المبيض وذلك من خلال طرق مختلفة تقوم بها النترات ومشتقاتها. فقد بينت دراسة إن اوكسيد النتريك (NO) يعمل على تثبيط إنزيم الاروماتيز Aromatase الموجود في الخلايا الحبيبية واللوتينية في مبايض الثديات, حيث إن إنزيم الاروماتيز هو الإنزيم المسؤول عن تخليق الاستروجينات من خلال تحويل الاندروجين إلى استروجين, وبالتالي يعمل اوكسيد النتريك على تقليل الستيرويدات عن طريق تثبيط إنزيم الاروماتيز, وهناك ثلاثة آليات يقوم بها اوكسيد النتريك لتثبيط إنزيم الاروماتيز: الآلية الأولى: من خلال تكوين مركبات وسطية وهذه المركبات الوسطية ترتبط بإنزيم الاروماتيز وتعمل على تثبيطه , فإنزيم الاروماتيز يحتوي على مجموعة الهيم الحاوية على الحديد , ومن هذه المركبات الوسطية الناتج عن التأكسد بواسطة اوكسيد النتريك هو غاز الكاربون الأحادي (CO) الذي يرتبط بشدة مع الحديد الموجود في مجموعة الهيم في إنزيم الاروماتيز. والآلية الثانية: هو تأثير اوكسيد النتريك علىmRNA الذي يقوم بتخليق إنزيم الاروماتيز(Syira *et al.*, 1997). أما الآلية الثالثة: هو قيام اوكسيد النتريك بخفض قيمة الأدينوسين أحادي الفوسفات الحلقي (cAMP) Cyclic adenosine mono phosphate في الخلايا الحبيبية واللوتينية المبيضة Ovarian granulosa–luteal cells مما يخفض من مقدار الطاقة اللازمة في بناء إنزيم الاروماتيز (Yamauchi *et al.*,1997). وبالإضافة إلى قيام أوكسيد النتريك بتثبيط إنزيم الاروماتيز الضروري في بناء الاستروجينات فهو يعمل على تثبيط الإنزيمات الضرورية التي تقوم بتحويل الكولستيرول الى ستيرويدات (Wink,1993; Delpunta *et al*, 1996). كما تؤدي زيادة النترات إلى زيادة تركيز أوكسيد النتريك (NO) في الجسم, إذ يعمل أوكسيد النتريك بإطلاق عوامل من الخلايا تعمل على تثبيط تكوين الهرمونات الاستيرويدية Steroidogenesis في الخلايا الحبيبية Granuloso cells والخلايا اللوتينية Luteal cells في الجرذان والإنسان (Van-Voorhis *et al*., 1994; Hsu, 1997 Azeez *et al*., 2011).

تعمل الكميات المتزايدة من النترات على خفض مستوى الهرمونات الاستيرويدية من الغدة الادرينالية من خلال ملاحظة انخفاض الهيدروكسي – ستيرويد Hydroxy–steroid والكيتو–ستيرويد Keto–steroid في البول (WHO, 2011). كذلك تؤدي النترات إلى تثبيط تحت المهاد في إفرازها للعوامل المحررة للهرمونات الكظرية وهذا يؤدي إلى انخفاض إفراز الهرمونات الستيرويدية من الغدة الكظرية (Varsha *et al.*, 2010). وقد ذكرا الباحثان Guillette و Gunderson (2001) أن الكبد هو موقع يساعد في بناء الهرمونات الستيرويدية, وأن النترات تعمل على تثبيط عدد كبير من الإنزيمات الكبدية التي لها علاقة بتخليق الهرمونات الستيرويدية , وفي النهاية تؤدي النترات إلى تقليل تركيز الهرمونات الستيرويدية في الدم, كذلك ذكر الباحثان بأن النترات تعمل على تقليل استقبال الغدة الكظرية للهرمون المحرض للقشرة الكظرية Adrenocorticotropic (ACTH) المفرز من تحت المهاد وبالتالي هذا سوف يثبط عملية تخليق الهرمونات الستيرويدية من الغدة الكظرية.

عند قلة مضادات الأكسدة سوف ينخفض إنتاج الهرمونات الستيرويدية في المبيض والغدة الكظرية (Creanga *et al.*, 2008) لذلك إن الانخفاض في مستوى الهرمونات المبيضية يتأثر بانخفاض مضادات الأكسدة كانخفاض الكلوتاثيون بحسب ما أوضحته النتائج الحالية, كذلك فإن الانخفاض في أعداد الجريبات لاسيما وعند زيادة التعرض للنترات في الدراسة الحالية ممكن إن يؤثر سلباً على إنتاج هرمونات المبيض, وهذا يتفق مع دراسة أوضحت بأنه عند إعطاء القوارض نترات الصوديوم أدى إلى انخفاض أعداد الجريبات وانخفاض في مستوى هرمونات المبيض (Panesar and Chan, 2000).

تبين من النتائج الحالية حصول زيادة في مستوى هرمون الاستروجين والبروجستيرون عند إعطاء مستخلص إكليل الجبل لإناث الجرذان , وتزداد هذه الهرمونات بصورة كبيرة إذا ما استمرت مدة التجريع بمستخلص إكليل الجبل إلى (32) يوماً. إذ يعمل مستخلص إكليل الجبل على زيادة مستوى الهرمونات المنبه للمناسل التي تعمل على زيادة إفراز المبيض لهرمون الاستروجين والبروجستيرون, فقد أشارا Ghazalah و Ali (2008) بان المستخلص الكحولي لأوراق نبات إكليل الجبل يعمل على زيادة تنبيه الغدة النخامية لإفراز الهرمونات المنبه للمناسل. ومن ثم زيادة إفراز الاستروجين والبروجستيرون.

إن إعطاء مستخلص إكليل الجبل لإناث الجرذان ولوقت أطول يعمل على حصول زيادة في مستوى هرمونات المبيض, ومن الممكن أن تفسر هذه الزيادة في إفراز هرمونات المبيض من خلال زيادة مضادات الأكسدة وقلة الجذور الحرة عند إعطاء المستخلص وهذا بينته نتائج الدراسة الحالية من خلال زيادة الكلوتاثيون وانخفاض المالوندايلديهايد, كذلك بينت دراسة أجراها Olfat وجماعته (2012) أن نبات إكليل الجبل يمتلك فاعلية مضادة للالتهاب ومن ثم له القدرة العالية في مقاومة السموم والقضاء عليها, فقد ذكر هذا الباحث وجماعته أن مستخلص أوراق إكليل الجبل المائي تعمل على زيادة معنوية في مستوى الإنزيمات المضادة للتأكسد, التي تشمل الكلوتاثيون ترانسفيريز (GST), والكاتليز (CAT), والكلوتاثيون بيروكسيد (GPX), وزيادة معنوية في مستوى المواد غير الإنزيمية المضادة للتأكسد مثل فيتامين- C والكلوتاثيون .

أوضحت النتائج الحالية بان هناك تأثيراً ايجابياً لمستخلص إكليل الجبل على نمو ونضج جريبات المبيض, وربما تكون هذه الزيادة في أعداد وأقطار جريبات المبيض قد أدت إلى زيادة إفراز هرمون الاستروجين والبروجستيرون. إذ تُنتج الاندروجينات بواسطة الخلايا القرابية Thecal cells لجريبات المبيض وتتحول تلك الاندروجينات إلى استروجينات في الخلايا الحبيبية لجريبات المبيض تحت تأثير الهرمون اللوتيني(LH) وبمساعدة إنزيم Aromatase , إذ تعد الجريبة الناضجة أشبه بغدة صماء تعمل على إفراز هرمون الاستروجين (Vander, 2001; Saladin, 2003). فضلاً عن ذلك ما ذكره Faixova وجماعته (2008). إن نبات إكليل الجبل يعمل على زيادة نمو أنسجة المبيض وزيادة أعداد الجريبات. وقد ذكر Satoch وجماعته (2002), بان إكليل الجبل يعمل على حماية الجهاز العصبي من ضرر الإجهاد ألتأكسدي. لذا ممكن أن يزيد مستخلص إكليل الجبل من كفاءة تحت المهاد في إفراز الهرمونات المنبه للمناسل مما يؤدي إلى زيادة إفراز هرمونات المبيض.

الهرمونات المنبه للمناسل

سجلت نتائج هذه الدراسة حصول انخفاض معنوي في مستوى الهرمون محفز الجريب (FSH) والهرمون اللوتيني (LH) عند معاملة إناث الجرذان بالنترات, وهذا الانخفاض يزداد في حالة استمرت معاملة إناث الجرذان بالنترات, وقد يكون الانخفاض في مستوى الهرمونات المنبه للمناسل والمفرزة من الغدة النخامية بسبب ضرر في خلايا النخامية نتيجة التعرض للنترات, فقد ذكر Panesar و Chan (2000) أن نترات الصوديوم تعمل على الإضرار بنسيج النخامية وتثبيط الهرمونات المنبه للمناسل. وأوضحت إحدى الدراسات بأن زيادة النترات تؤثر على العلاقة مابين تحت المهاد–الغدة النخامية, إذ تعمل النترات على خفض وظيفة تحت المهاد في إطلاق العوامل المحررة للهرمونات النخامية ومن ثم تنخفض الهرمونات المنبه للمناسل (Varsha *et al.*, 2010).

عند إفراز الهرمون المحفز للجريبات(FSH) ونمو الجريبات سوف يزداد مستوى الكلوتاثيون ليقوم بحماية الجريبات وأنسجة الجسم من الجذور الحرة وعند زيادة البروجستيرون تزداد مضادات الأكسدة بشكل كبير وذلك استعداداً للحمل وحماية الجنين (Behrman *et al.*, 2001), لذلك إن قيام إكليل الجبل بزيادة مضادات الأكسدة كالكلوتاثيون تبعاً لما أوضحته النتائج وخاصة عند زيادة مدة المعاملة فمن المحتمل أن تعمل مضادات الأكسدة في إكليل الجبل بزيادة كفاءة المبيض والنخامية في أداء وظيفتهما, إذ إن هناك الكثير من الدراسات أشارت إلى قدرة مستخلص إكليل الجبل في زيادة مضادات الأكسدة التي تمتلك دوراً وقائياً لحماية الجسم من ضرر الجذور الحرة, ومن هذه الدراسات, دراسة أوضحت أن نبات إكليل الجبل الذي يعطى إلى الحملان الكرادية وبتركيز (7.5) غم/ كغم من الأوراق الجافة يؤدي إلى زيادة معنوية في مستوى تركيز الكلوتاثيون(Hassan and Hassan, 2009), وقد بينت دراسة آخرى أن مستخلص إكليل الجبل يؤدي إلى زيادة مضادات الأكسدة في الجسم فهو يؤدي إلى زيادة مستوى الكلوتاثيون (GSH) في المصل فضلاً عن زيادة مستوى إنزيم السوبر أوكسيد ديسموتيز (SOD) والكاتليز(CAT) (Polat *et al.*, 2011).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأن مستخلص إكليل الجبل يعمل على تحسن في إفراز الهرمون محفز الجريبات والهرمون اللوتيني عند إعطائه مع النترات لإناث الجرذان, فقد بينت النتائج الحالية حصول زيادة في إفراز الهرمونات المنبه للمناسل عند زيادة مدة التجريع بمستخلص إكليل الجبل وربما هذا يعود إلى فعالية مستخلص إكليل الجبل في حماية خلايا الجسم وأعضائه . إذ وجد إن زيادة مدة إعطاء إكليل الجبل للجرذان لمدة تستغرق ثلاثة أسابيع

يظهر حماية للكبد من خلال زيادة مضادات الأكسدة وإنزيمات الكبد ذات التأثير الوقائي للجسم (Cheung and Tai, 2007). وأشارت دراسة بان مستخلص إكليل الجبل يعمل على زيادة إفراز الهرمونات المنبه للمناسل (Faixova *et al,* 2008).

هرمونات الغدة الدرقية

أوضحت النتائج أن هناك انخفاضاً معنوياً في مستوى هرمون الثايروكسين (T4) وهرمون الثايرونين ثلاثي اليود (T3) في إناث الجرذان المعاملة بالنترات, وتنخفض الهرمونات الدرقية بشكل أكبر عند إعطاء النترات لوقت أطول, وقد يكون هذا الانخفاض في مستوى هرمونات الغدة الدرقية نتيجة زيادة الجذور الحرة التي يمثلها المالوندايالديهايد عند التعرض للنترات, إذ يمكن لهذه الجذور من أن تعرقل وظيفة الغدة الدرقية في إفراز هرموناتها. فقد أوضحت دراسة أن إفراز وتنظيم وظيفة الغدة الدرقية مرتبط بحالة المؤكسدات ومضادات الأكسدة الموجودة في الجسم فعند حصول خلل في حالة الاتزان التي توجد عليها مضادات الأكسدة والمؤكسدات يؤدي إلى اضطراب وظيفة الدرقية فزيادة المؤكسدات تؤدي إلى حدوث قصور في نشاط الدرقية Hypothyroidism. ويمكن أن ينتج القصور الدرقي من حصول خلل في أداء وظيفة المحور تحت المهاد–النخامية –الدرقية حيث يتأثر أداء الغدة الدرقية فيقل مستوى هرموناتها (Kumar *et al.*,2010), وهناك عدد من الدراسات أكدت بأن النترات تؤدي إلى انخفاض في مستوى الهرمونات الدرقية وتبعاً لما توصلت إليه الدراسات السابقة المدرجة في أدناه, فإن النترات تسلك طرق مختلفة لأجل إن تخفض من الهرمونات الدرقية. فالنترات إما إن تؤثر على اليود, أو على الإنزيمات الضرورية في تخليق الهرمونات الدرقية, أو تؤثر على الثايروكلوبيولين Thyroglobulin فضلاً عن تأثيرها على نسيج الدرقية. فقد أشار Mukhopadhyay وجماعته (2005) بأن زيادة التعرض للنترات ستعمل على تقليل وصول اليود إلى الغدة الدرقية مما يؤدي إلى انخفاض كبير في إنتاج الهرمونات الدرقية. فالنترات تؤدي إلى إذابة البروتين والدهون في غشاء الخلية الدرقية مما ينتج تعطيل وظيفة الدرقية في إدخال اليود إلى داخلها, كذلك فإن اوكسيد النتريك يتفاعل مع اليود ويقلل من دخول اليود إلى الغدة الدرقية ومن ثم التقليل من إنتاج الهرمونات الدرقية. كذلك تعمل النترات على خفض تركيز إنزيم البيروكسيدز Peroxidase والكاتليز المهمين في عملية تصنيع الهرمونات الدرقية, كما تؤدي النترات إلى تلف للمادة البروتينية الثايروكلوبيولين التي تشترك مع اليود لتخليق الهرمونات الدرقية (Guiles, 2000).

وجد بأن شرب الماء الحاوي على النترات بتركيز (6.5) ملغم/ لتر في النساء يؤدي إلى انخفاض الهرمونات الدرقية أو ما يعرف بقصور الدرقية, إذ إن النترات تعمل على تقليل وصول

اليود للدرقية وحدوث أضرار كبيرة في نسيج الغدة الدرقية مما يؤدي الى قلة إنتاج الهرمونات الدرقية (Briseis *et al.*, 2012). وعند معاملة الفئران بالنترات سينخفض مستوى الهرمونات الدرقية (Pant and Srivastava, 2002). كذلك وجد إن النترات تؤدي إلى خفض مستوى الهرمونات الدرقية في إناث الجرذان (El- Wakf *et al.*, 2008).

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن مستخلص إكليل الجبل يعمل على زيادة إفراز هرمون الثايروكسين وهرمون الثايرونين ثلاثي اليود عند إعطائه لإناث الجرذان, إذ تكون الزيادة في إفراز الهرمونات الدرقية بصورة كبيرة عند زيادة مدة المعاملة بالمستخلص, وان قيام مستخلص إكليل الجبل بزيادة الهرمونات الدرقية قد يكون من خلال حماية الغدة الدرقية من الجذور الحرة التي تنتجها النترات, فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية بأن إكليل الجبل يعمل على زيادة مضادات الأكسدة مثل زيادة الكلوتاثيون , ذكرا Ghazalah و Ali (2008) أن مستخلص أكليل الجبل يحفز وظيفة الغدة الدرقية في إفراز (T4 وT3). وأكدت دراسة أجراها Erenmemisoglu وجماعته (1997) بان الكميات المتزايدة من مستخلص إكليل الجبل تعمل على زيادة هرمون الثايروكسين (T4) والثايرونين ثلاثي اليود (T3). إذ إن نبات إكليل الجبل يحتوى على كمية كبيرة من الفينولات, والفلافونيدات, والقلويدات والفيتامينات, والتربينات, والزيوت الطيارة التي تمتلك خواص مضادة للتأكسد (Wilma, 2013). وقد ذكر Kajari (2004) أن مضادات الأكسدة تعمل على زيادة هرمون ال (T4 و T3) في الجرذان.

الهرمون محفز الدرقية

أشارت النتائج إلى ارتفاع معنوي في مستوى الهرمون محفز الدرقية (TSH) في إناث الجرذان المعاملة بالنترات, ومع زيادة الوقت الذي تعطى فيه النترات لإناث الجرذان سوف يزداد إفراز ال (TSH). وقد يكون الارتفاع في مستوى هرمون ال (TSH) هو نتيجة انخفاض مستوى الهرمونات الدرقية التي تحفز إفراز الهرمون المحفز للدرقية عن طريق التغذية الاسترجاعية السالبة, وهذا يتفق مع ما ذكره Tonacchera وجماعته (2004) من إن النترات تؤدي إلى زيادة في مستوى الهرمون محفز الدرقية بسبب انخفاض الهرمونات الدرقية نتيجة النترات إذ إن هذا الانخفاض في هرمونات الدرقية يحدث تغذية استرجاعية سالبة للغدة النخامية لإفراز الهرمون محفز الدرقية. وأشارت دراسة إلى أن النترات تعمل على زيادة مستوى الهرمون محفز الدرقية في إناث الجرذان (El- Wakf *et al.*, 2008) . ودرس Lambers وجماعته (2000) ستة وأربعين حالة مرضية يكون فيها الهرمون محفز الدرقية مرتفع مع انخفاض لهرمونات الدرقية, ستة حالات مرضية من الرجال وأربعين حالة مرضية من النساء, وقد وجد إن هذا الارتفاع في الهرمون محفز الدرقية هو نتيجة التعرض للنترات وقد تبين انتقال النترات إلى الجسم يكون بواسطة الخضروات الملوثة بالنترات. وقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية إلى أن النترات تنتج تركيز مرتفع من ال (MDA) في المصل مقارنة مع السيطرة, وهذا يشر إلى وجود جذور حرة تتفوق على مضادات الأكسدة, إذ يمكن لهذه الجذور إن تسبب انخفاض للهرمونات الدرقية محفزة هذه الهرمونات بدورها إفراز ال (TSH) من النخامية بطريقة التغذية الاسترجاعية السالبة, يتضح ذلك بشكل اكبر عند زيادة فترة تجريع الحيوانات بالنترات. وهذا ما أكده Briseisوجماعته (2012) بأن التراكيز العالية من الجذور الحرة تعمل على تقليل مستوى هرمونات الدرقية وزيادة إفراز (TSH) إذ إن انخفاض الهرمونات الدرقية يحفز إفراز ال (TSH) بالتغذية الاسترجاعية السالبة.

أوضحت النتائج الحالية أن إعطاء مستخلص إكليل الجبل لإناث الجرذان أدى إلى انخفاض ال(TSH) وبصورة كبيرة عند زيادة المدة التي جرعت فيها الحيوانات مستخلص إكليل الجبل, إذ إن الزيادة في تركيز الكلوتاثيون وحسب ما بينته النتائج تثبت قدرة المستخلص في زيادة مضادات الأكسدة والتقليل من الجذور الحرة , وبهذه الظروف من زيادة مضادات الأكسدة على حساب الجذور الحرة يمكن أن يتسنى للدرقية من إفراز هرموناتها مثبطة بذلك إفراز ال (TSH). واتفقت هذه النتائج مع Mancini وجماعته (2010) الذين ذكروا إن مضادات الأكسدة مثل فيتامين- E وC والكلوتاثيون تعمل على زيادة إفراز هرمونات الدرقية وتثبيط إفراز ال (TSH) بتغذية استرجاعية سالبة. إذ يؤدي مستخلص إكليل الجبل إلى انخفاض ال (TSH) (Erenmemisoglu *et al*., 1997; Sarandol and Tas, 2005).

الاستنتاجات

استنتج من ما أوضحته الدراسة الحالية مايأتي:

1- من نتائج الدراسة الحالية يتضح أن المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل من مضادات الأكسدة الفعالة جداً لما يحتويه هذا المستخلص من مركبات كيميائيه التي تؤدي دوراً أساساً في وقاية الجسم من الجذور الحرة.

2- إن مستخلص إكليل الجبل قد عمل على حماية أنسجة المبيض من التسمم كما انه قد نشط الأنسجة المبيضية ومن ثم اعطى الدعم للمبيض لأداء وظائفه.

3- عمل المستخلص المائي لنبات إكليل الجبل على تحسين أو زيادة الخصوبة لدى إناث الجرذان من خلال أرتفاع النسبة المؤية للحمل والانخفاض في مدة الحمل وزيادة أعداد المواليد.

4- أثر مستخلص إكليل الجبل في تحفيز محور تحت المهاد- النخامية – المبيض عن طريق زيادة هرمونات FSH و ال LH وهرمونات المبيض.

5- ساهم مستخلص إكليل الجبل في تنشيط الغدة الدرقية من خلال تنشيط محور الغدة النخامية- الدرقية.

التوصيات

1- فصل بعض المواد الفعالة التي توجد في أوراق إكليل الجبل وإجراء الدراسات عليها في مجالات وظيفية مختلفة.

2- إجراء دراسات تتضمن استعمال المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل في علاج بعض الاختلالات الوظيفية التي تصيب مبايض الثديات.

3- إجراء دراسة وراثية لتأثير المستخلص المائي لأوراق نبات إكليل الجبل على جينات البيضة وجينات خلايا الجريبات المبيضية.

4- إجراء دراسة لمعرفة تأثير المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل في الكفاءة التناسلية للذكور ومدى كفائته في معالجة حالات العقم المختلفة.

5- يوصى باستعمال المستخلص المائي لأوراق إكليل الجبل في دراسات أخرى تشمل حالات التسمم بعناصر ثقيلة مثل الرصاص والكادميوم.

المصادر العربية

- إبراهيم , حوة (2013).دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نباتات العائلة الشفوية والفعالية ضد الأكسدة. رسالة ماجستير , كلية العلوم والتكنولوجيا وعلوم المادة, جامعة قاصدي مرباح – الرياض.
- إبراهيم , عروبة محمد سعيد وعبد , مجيد محمود وعبد المنعم ,علاء الدين (2009). تقييم فعالية المستخلص المائي والزيتي لنبات إكليل الجبل في تثبيط بعض الأحياء المجهرية المرضية , المجلة الطبية البيطرية العراقية , المجلد 33 , العدد 2 . ص 20-34.
- أوجي , نورا عبد الحميد محمد (2004) . التأثيرات الفسلجية والنسجية الناتجة عن عرق السوس *Glycyrrhiza glabra* L. في مبايض الفئران البيض , رسالة ماجستير , كلية العلوم للبنات , جامعة بغداد .
- البابلي, إيناس أسامه حسين (2006). تأثير التسمم بالنترات على عملية تكوين النطف بالجرذان باستخدام المثلين الأزرق وفيتامين c , رسالة ماجستير كلية الطب البيطري, جامعة الموصل .
- جودت, محفوظ (2001). التحليل الإحصائي المتقدم باستخدام SPSS. الطبعة الأولى, دار الأوائل للنشر, الأردن.
- الحكيم , وسيم (2012) . النباتات الطبية والعطرية . جامعة دمشق , ص 210- 212.
- رمزي , بوالقندول (2011) . الدور الوقائي لبعض المستخلصات الفلافونيدية ضد الالتهاب الكبدي المحرض بالباراسيتامول لداى الجرذان , رسالة ماجستر , كلية علوم الطبيعة والحياة , جامعة منتوري قسنطينة .
- الصالح , رفيق (1998) . دراسة مورفولوجية وكيميائية لنبات إكليل الجبل السوري وكشف غشه بأوراق نبات الجعدة , مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية , 14: 2-6.
- عبد الجواد , سها بنت هاشم (2008). تأثير الليكوبين المستخلص من الطماطم على الإجهاد ألتأكسدي وتمثيل العظام في الجرذان , أطروحة دكتوراه , كلية علوم الأغذية والزراعة , جامعة الملك سعود .

References

- Abdul-Rahim,A.; Al-Jamal,D. and Taha,A.(2011).Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on lipid profile of diabetic rats. *J. of Biol. Scie.* Vol., 14:pp 32-39.
- Adiga,U. (2009). Total antioxidant activity in normal pregnancy. *On. J.Heal. Alli. Scie.*, 8(2): 1-4.
- Adouard, C.D. (2006). Stress oxidative and Human. *Spe. Biotechnol., 16: 228.*
- Agarwal, A.; Aponte-Mellado, A.; Premkumar, B.J.; Shaman,A. and Gupta, S. (2012). Free radicals and Animal. *Reprod. Biol. and endocrinl.*,7: 10-49.
- Agarwal, A.;Gupta, S. and Sharma, R.(2005).Role of oxidative stress in female reproduction.*Reprod. Biol. and Endocrinol.*,3(28):3-28.
- Akande, A. and Akinyinka, O.(2005).Serum malondialdehyde levels during menstral cycle. *Afri. J. of Biotechnol.*, 4(11):1297-1299.
- Al-Ayed, M. I. (2000).Toxicity of drinking water with different nitrate levels. *J. Egy. Ger. Soc. Zool.*, 31 (A): 197-209.
- Albert,M.G.; Rousselot, D.B.; Abedinzadeh, Z. and Gore, D. (2003). Reactives oxygene species. *Mecan. Biochim., 16: 91-96.*
- Al-Katib, E. M.;Al-Khashab M. and Kalo,S.(2009). The antioxidant effects of flavonoids and non flavonoid part extracted from *Ginger (Zingiber Officinale)* roots.*J . Occup. Environ. Med.*,17: 13- 20.