جامعة القادسية
كلية التربية
قسم علوم الحياة

تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155 على بعض معايير الخصوبة في ذكور الجرذان البيض

رسالة مقدمة إلى

عمادة كلية التربية/جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة/ علم الحيوان

من قبل
جبار رحيم عباس
بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية / جامعة بغداد /2000

إشراف
أ.م.د حسين عبَّاس سلمان الحميداوي

1440 هـ **2019 م**

إقرار المشـــرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ" **تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155 على بعض معايير الخصوبة في ذكور الجرذان البيض** " للطالب (**جبار رحيم عباس**) جرى بإشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة القادسية وهي من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان .

التوقـــيـــع :

اسم المشرف : **د. حسين عباس سلمان**

اللقب العلمي : **أستاذ مساعد**

العنوان : جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ : ١١ / ٢/ ٢٠١٩

توصية رئيس قسم علوم الحياة :

بناءً على التوصيات المقدمة من المشرف أرشّح هذه الرسالة للمناقشة .

التوقيـــع :

الاسم : **د . احمد جاسم حسن**

المرتبة العلمية : **أستاذ مساعد**

العنوان : جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ : ١١/ ٣ / ٢٠١٩

جامعة القادسية
كلية التربية
قسم علوم الحياة
الدراسات العليا

قرار المقوم اللغوي

إن الرسالة الموسومة بـ" **تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155 على بعض معايير الخصوبة في ذكور الجرذان البيض** " تمت مراجعتها لغوياً وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وأسلوبية, وأصبحت مؤهلة للمناقشة قدر تعلق الأمر بالسلامة اللغوية والأسلوبية .

التوقيع :

الاسم : **د .عبد الله حبيب التميمي**

المرتبة العلمية : **أستاذ**

جامعة القادسية / كلية التربية / قسم اللغة العربية

التاريخ : ٥ / ٢ / ٢٠١٩

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهد أننا اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ **" تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155 على بعض معايير الخصوبة في ذكور الجرذان البيض "** المقدمة من طالب الماجستير (**جبار رحيم عباس**) وناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ ٢١ / ٢ / ٢٠١٩ ونشهد بأنها جديرة بالقبول بتقدير (امتياز) لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان.

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : **د. عدنان وحيد محمد**

المرتبة العلمية : **أستاذ**

التاريخ : ١١/ ٢ / ٢٠١٩

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : **د. جبار عبادي محمد**

المرتبة العلمية : **أستاذ مساعد**

جامعة الكوفة / كلية التربية للبنات

التاريخ : ١٠/ ٢/ ٢٠١٩

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : **د. وجدان مطرود كاظم**

المرتبة العلمية : **أستاذ مساعد**

جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ : ١١/ ٢/ ٢٠١٩

عضواً ومشرفاً

التوقيع :

الاسم : **د. حسين عباس سلمان**

المرتبة العلمية : **أستاذ مساعد**

جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ : ١١/ ٢/ ٢٠١٩

مصادقة عمادة كلية التربية - جامعة القادسية

التوقيع :

الاسم : **د. خالد جواد العادلي**

المرتبة العلمية : **أستاذ**

جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ : ١/ ٤/ ٢٠١٩

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155 على الجهاز التناسلي لذكور الجرذان البيض من خلال دراسة المعايير الآتية : حساب وزن الأعضاء التناسلية و دراسة معالم النطف وقياس مستوى بعض الهرمونات (الشحمون الخصوي و محفز الجريب FSH و اللوتيني LH و GnRH) ، وبعض المعايير الكيموحيوية كحساب مستوى الإنزيمات المضادة للأكسدة وبيروكسدة الدهون ، كذلك حساب بعض المعايير الدمية ، إلى جانب ذلك دراسة نسجية للخصية والبربخ.

تم إجراء هذه التجربة في البيت الحيواني / كلية التربية / جامعة القادسية من شهر تشرين الثاني 2017 الى شهر اذار 2019 ، وشملت الدراسة (30) ذكر بالغ من الجرذان البيض بعمر (14-16) أسبوع وبأوزان متقاربة (180-200) غرام ، وقسمت الحيوانات إلى ثلاث مجاميع متساوية وبصورة عشوائية اذ تضم كل مجموعة (10 حيوانات) ، المجموعة الأولى هي مجموعة السيطرة (C) جرعت 1 مل من الماء الاعتيادي و لمدة (60) يوم ، المجموعة الثانية هي مجموعة المعاملة الأولى (T1) جرعت 1 مل من صبغة الشوكلاتة البنية بتركيز (200)ملغم/ كغم من وزن الجسم ولمدة (60) يوم ، المجموعة الثالثة هي مجموعة المعاملة الثانية(T2) جرعت 1 مل من صبغة الشوكلاتة البنية بتركيز (400)ملغم/ كغم من وزن الجسم ولمدة (60) يوم . وبعد انتهاء مدة التجريع تم التضحية بالحيوانات وسحب الدم منها واستئصال الأعضاء التناسلية لملاحظة تأثير الصبغة على معايير الدراسة وكالاتي :

بينت نتائج التحليل الإحصائي حصول انخفاض معنوي في معدلات الكسب الوزني للجسم و انخفاض أوزان الخصى والبرابخ في مجموعتي المعاملة بالصبغة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

كما كان الانخفاض معنويّاً في مستوى تركيز هرمون الشحمون الخصوي وهرمون FSH وهرمون LH وهرمون GnRH بالنسبة لمجموعتي المعاملة (T1) و(T2) عن تراكيزها في مجموعة السيطرة(C).

كذلك أظهرت النتائج وبحسب التحليل الإحصائي وجود ارتفاع معنوي في مستوى تركيز المالوندايااليهايد (MDA) وتركيز أوكسيد النتريك NO وانخفاض مستوى إنزيم الكاتليز Catalase في كل من (T1) و(T2) بالنسبة لمجموعة السيطرة(C).

وبعد قياس معالم النطف أوضحت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي في تركيز النطف للحيوانات المجرعة في (T1) و(T2) عن تركيزها في (C) ، كذلك انخفضت النسب المئوية لكل من النطف المتحركة و النطف السوية والنطف العيوشة لمجموعتي المعاملة (T1) و(T2) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (C).

وسجلت نتائج الدراسة الحالية ايضا ارتفاع معنوي بأعداد خلايا الدم البيضاء للحيوانات المعطاة للصبغة في (T1) و(T2) بالمقارنة مع (C) ، ولكن انخفضت أعداد كريات الدم الحُمرْ ونسبة الهيموغلوبين ونسبة حجم الخلايا المرصوص وحجم الكريات الدم الحمراء في دم الجرذان المعاملة بالصبغة (T1) و(T2) بالنسبة إلى مجموعة السيطرة (C) .

كما أظهرت نتائج الفحص النسجي للشرائح النسجية وجود تغيرات نسجية واضحة في خصى وبرابخ الجرذان المعطاة للصبغة وذلك من خلال انخفاض أقطار النبيبات المنوية وانخفاض سمك الطبقة الجرثومية المبطنة لها في هذه الأعضاء بالمقارنة مع الخصى والبرابخ لحيوانات السيطرة ، كذلك انخفضت معدلات أعداد سليفات النطف Spermatogonia و الخلايا النطفية Spermatocyte و ارومات النطف Spermatid كما انخفضت معدلات خلايا لايدك Leydig cells في حيوانات المعاملة (T1) و(T2) عن معدلات هذه الخلايا في مجموعة السيطرة (C).

ويمكن الاستنتاج إن صبغة الشكولاته البنية ذات تأثيرات سلبية واضحة على أنسجة و وظيفة الجهاز التكاثري مما يؤثر سلبا على عمل وكفاءة الأعضاء التناسلية بصورة عامة وعلى خصوبة الذكور بشكل خاص .

- المقدّمة Introduction

تؤثر العوامل البيئية بصورة مباشرة على الصحة العامة للإنسان ، و أداء ، وظائفه المختلفة ، حيث تتأثر الخصائص التركيبية و الفسلجية للأعضاء التناسلية بالعديد من العوامل كالغذاء والعوامل البيئية مثل: درجة الحرارة و الضوء والملوثات البيئية ،لذلك يجب التركيز على الغذاء من حيث الكمية والنوعية للمحافظة على الأنشطة الحيوية للأعضاء التناسلية وباقي أعضاء الجسم الأخرى و أن تناول الأشخاص للغذاء الطازج مثل : الفواكه والخضروات يساعد على تأخير ظهور العديد من إمراض الشيخوخة وإمراض القلب والشرايين (الكناني, 2001; Halliwell *et al*.,2000) .

كان الغذاء يستخدم محليا ولا يحتاج إلى وقت طويل لخزنه أما اليوم وفي خضم الانفجار السكاني والتطور الكبير في مجال الصناعة والتجارة والتسويق دخل الغذاء مع باقي السلع التجارية في مجال التطوير والتحسين والتسويق بل ويفوقها بذلك لأنه الأكثر رواجا واستهلاكا من باقي السلع الأخرى (Anand and sati , 2013) . لذلك لم تعد الطرق القديمة مجدية لمواكبة التطور الحاصل في صناعة الأغذية وتسويقها هذا ما دعا العاملون على صناعتها لابتكار العديد من الطرق الجديدة لتحسينها وتطويرها وتخزينها لحين استهلاكها وأهم هذه الطرائق هي إضافة الصبغات والمواد الحافظة والنكهات أو ما يسمى بالمضافات الغذائية Food additives (Wroblewska , 2009).

تعتبر الصبغات الغذائية من أهم المواد المضافة للأغذية والأدوية والتي تستخدم بشكل واسع بالوقت الحالي، والتي يوجد منها أكثر 2500 نوع (Toledo, 1999 ; Carocho *et al*., 2014) . الصبغات الغذائية قد تكون طبيعية أو صناعية ، ولكن 95 % من الصبغات المستخدمة حاليا في صناعة الأغذية هي صبغات صناعية وذلك بسبب سهولة إنتاجها و رخص ثمنها (Gautam *et al*., 2010) . معظم الصبغات الغذائية الصناعية من مركبات الأزو (Azo) والتي حدد استخدامها اليومي ضمن تراكيز معينة ومنع البعض الأخر من الاستخدام لما لها من تأثيرات سلبية على معظم أعضاء الجسم (Tanaka , 2005) . ولقد ذكر De Campos and Maria (2013) بان صبغات الآزو Azo ثابتة ولا تتحلل وخصوصا في البيئة المائية وتحتوي على حلقات عطرية ولها سمية وتسبب طفرات وراثية والبعض منها مسرطنة.

صبغة الشوكولاتة البنية (Chocolate Brown HT E155) احد أنواع صبغات الازو (Azo) ، تكون ذات لون بني محمر ولها وزن جزئي 652.56 غم/مول واسمها الكيميائي :

disodium 4,4'-(2,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-1,3- phenylene bis-azo) di-(naphthalene-1-sulfonate) (European Food Safety Authority, 2010) .

صبغة الشوكولاته البنية تستخدم بشكل واسع في الأغذية مثل الآيس كريم والمشروبات الغازية ، والصلصات والأسماك واللحوم وكذلك مع الحلويات (Khatun *et al*.,2017; Bawazir, 2012) .

إشارت الهيئة الأوروبية لسلامة الأغذية European Food Safety Authority (2010) إن المسموح تناوله من هذه الصبغة في الأغذية يوميا حوالي (0 - 1.5 غم/كغم من وزن الجسم) . وقد أشارت الكثير من الدراسات الى إن هذه الصبغة لها تأثيرات ضارة على DNA في خلايا الكبد والكلية كما تؤدي إلى انخفاض وزن الجسم وتراكيز الإنزيمات المضادة للتأكسد (SOD) Super oxide dismutase و Glutathione - S – Transferees(GSTs) وزيادة أنزيمات الكبد في الدم (Hassan and Salman , 2017 ; Hassan, 2010 ; Helal *et al*., 2000 ; Aboel-Zahab *et al.* , 1997) .

1-1. الهدف من الدراسة Aim of study

ولقلة الدراسات الحالية التي تناولت التأثيرات السلبية المحتملة لصبغة الشوكولاتة البنية على تركيب ووظيفة الأعضاء التناسلية في اللبائن لذلك صممت الدراسة الحالية لمعرفة تأثير هذه الصبغة على بعض معايير الخصوبة في ذكور الجرذان البيض تم ذلك من خلال دراسة المعايير التالية :

1- دراسات هرمونات محور تحت المهاد - النخامية - الخصية من خلال قياس تركيز هرمون (GnRH) ، (FSH) ، (LH) بالإضافة إلى تركيز هرمون (الشحمون الخصوي) .

2- دراسة بعض المعايير الكيموحيوية والتي شملت قياس تركيز إنزيم الكاتليز CAT وقياس MDA وتركيز NO بالإضافة إلى قياس بعض المعايير الدمية .

3- دراسة بعض معاير الخصوبة والتي شملت عدد النطف ، حركة النطف ونسبة النطف الحية إلى جانب ذلك دراسة تشوهات النطف .

4- الدراسة النسيجية للخصية والبربخ والتي شملت قياس أقطار النبيبات المنوية للخصية وسمك الطبقة لمبطنة لها وكذلك قياس اقطار نبيبات البربخ وسمك الطبقة الطلائية المبطنة له فضلا عن حساب أعداد الخلايا المنشأ للنطف وأعداد خلايا لايدك .

2- استعراض المراجع

1-2 المضافات الغذائية Food additives

هي أي مادة تضاف إلى الغذاء وتعمل على تغيير إي من صفاته ، وتشمل جميع المواد التي ليست من المكونات الطبيعية للأغذية وتضاف إليها وتستخدم لحفظ الطعام أو تحسين شكله أو لونه أو مذاقه (Himri *et al*., 2011;Sasaki *et al*.,2002) .

المضافات الغذائية كثيرة ومتنوعة منها مواد كيميائية تمنع التلف تسمى بالمواد الحافظة preservatives تستخدم المواد الحافظة الكيميائية لمنع الفساد الكيميائي والحيوي للأغذية Biological and Chemical deterioration (Smith, 2011;Kulkarni *et al*.,2010) ، كذلك تضاف إلى الغذاء الكثير من المواد لتحسين مظهره وتركيبه ومذاقه منها تضيف لون للغذاء تسمى الملونات colors ومنها ما يضاف لإعطاء نكهة معينة للغذاء تسمى بالنكهات Flavors (Hirschbruch and Bawazir, 2012 ; Ohtusuki *et al* ., 2012) .

ومع التزايد في أعداد وأنواع المضافات الغذائية تزايد النقاش والاختلاف بشأن تأثيراتها ومخاطر استخدامها ، وفي عام 2001 أشار مركز مكافحة الإمراض والوقائية في الولايات المتحدة Center For Disease Control And Prevention Of United states إن هناك 76 مليون حالة من الإمراض المنقولة بالأغذية مما أدى إلى موت 5000 شخص خلال عام واحد وهذا دعا هيئة الغذاء والدواء الأمريكية Food and Drug Administration (FDA) وضع شروط صارمة للموافقة على المكونات و المضافات الغذائية المصنعة (Mister and Hathcock , 2012) .

إما في أوروبا قامت هيئة سلامة الأغذية الأوربية European Food Safety (EFSA) Authority بالاتفاق مع منظمة الصحة العالمية World Health Organization(WHO) منذ عام 2010 برنامج لتقييم جميع المضافات الغذائية ، كما وضع لجميع المضافات الغذائية سواء كانت معتمدة أم لا أرقام خاصة مسبوقة بحرف E والذي يمثل كلمة (Europe) (ملحق رقم**1**) كما تصدر نشرات خاصة توضح الحدود المسموح بأستخدام هذه المضافات خلال اليوم الواحد (ADI) Acceptable Daily Intake (Carocho *et al* , 2014 ; European Food Safety, 2011).

2-2 الصبغات الغذائية Food Colors

الصبغات الغذائية هي مواد تضاف إلى الطعام أو الشراب والأدوية لتغيير لونها أو لمحاكاة اللون الأصلي للمنتج الغذائي وكثيرا ما ترتبط النكهات والطعم للغذاء والشراب بألوانه المميزة مما يؤثر على أختيار المستهلك للمنتج (Bawazir , 2016; Mason and Chanforan , 2015) .

كما أشار Himair وجماعته (2011) إن الصبغات الغذائية تضاف بهدف إعطاء لون معين أو استعادة اللون الطبيعي للغذاء وبذلك يكون لها تأثير حسي وبصري مهم جدا لاختيار المستهلك للمنتج الغذائي مما أعطى الصبغات مكانا مهما بين المضافات الغذائية الأخرى ، وهي كثيرة ومتنوعة وذات

مصادر طبيعية أو اصطناعية ، الصبغات الطبيعية هي صبغات ذات أصل نباتي أو حيواني أو فطري أو من الكائنات وحيدة الخلية كالأوليات والبكتريا وأكثر الصبغات الطبيعية الشائعة ذات أصل نباتي مثل: الانثوسانين Inthoseanin الأرجوانية ، وأشباه الكاروتين Isocarotene ذات اللون الأحمر والأصفر (Otani,2015; Caro *et al* . , 2012) ، ولكن 95 % من الصبغات المستخدمة حاليا في صناعة الأغذية هي صبغات غذائية صناعية وذلك بسبب سهولة إنتاجها ورخص ثمنها ، وهي الصبغات التي تحضر بالمختبر وتكون إما لا عضوية تحضر من المعادن أو عضوية تحتوي على مركبات الكربون ، والهيدروجين ، والأوكسجين ، والنتروجين (Rodringue-Amaya, 2018 ; Soltan and Shehata , 2012; Delgado-Vargas *et al.* , 2000) .

أشارت العديد من الدراسات إن 65% من الصبغات المضافة للأغذية هي من صبغات الآزو العضوية الحاوية على مجموعة الآزو Azo الجســرية (-N=N-) ذات التهجين الثنائي (Sp2) والمرتبطة بالنظام الأروماتي ، وتصنف بدورها إلى أحادية وثنائية وثلاثية الآزو، ويوجد أكثر من 3000 نوع من هذه الصبغات والتي تستخدم بشكل واسع في صناعة الأغذية (Carocho *et al.*, 2015; Otani , 2015) . ومن بين أكثر الصبغات الغذائية استخداما :

1.صبغة التر ترازين Tartrazine E102

من أهم صبغات الآزو لونها اصفر مخضر (ليموني) وتكون سريعة الذوبان في الماء كونها تستخدم في مجالات الصابون ، والشامبو ، ومستحضرات التجميل إلى جانب ذلك المنتجات الغذائية والحلويات و الايس كريم والحلوى الصلبة و الجيلاتين و والمربيات و والمشروبات الغازية و والمشروبات الكحولية .

(Mason and Chanforan , 2015 ; Montaser and Alkafafy , 2013)

2.صبغة غروب الشمس الصفراء Sun set yellow E110

وهي من صبغات الآزو أيضا صفراء اللون تستخدم في البسكويت والحلويات والهلام (Mason and Chanforan, 2015;Yadav *et al*.,2013).

3.صبغة الكارمويسين Carmoisine Dye E122

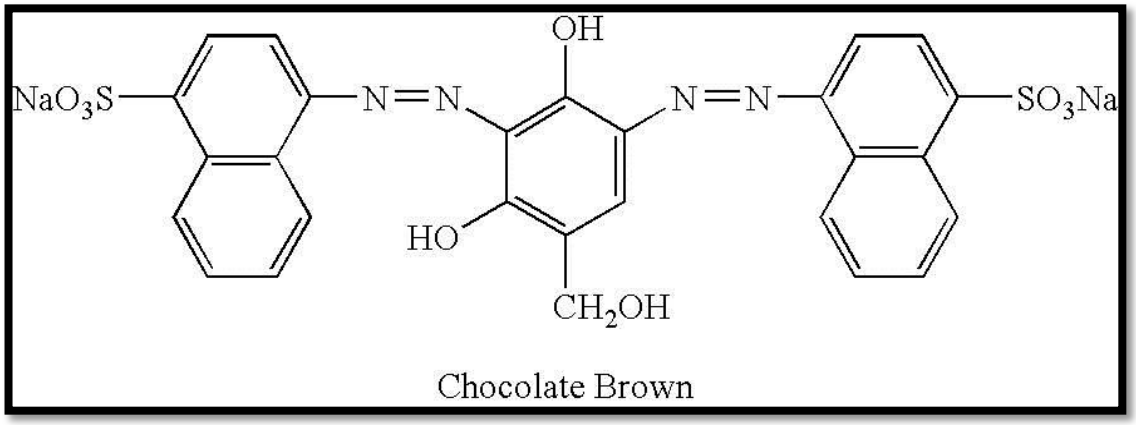
تحضر من قطران الفحم أو ملح الديزانيوم من خلال ارتباطه بمجموعة الآزو(-N=N-) إلى مركبات هيدروكربونية اروماتية شديدة التفاعل لها القابلية العالية على الذوبان في الماء معطية اللون الأحمر عند الذوبان مما يؤدي إلى تحسين اللون ووسيلة لجذب المستهلك وتستخدم في معاجين الأسنان والأغذية المتنوعة (Amin *et al*., 2010 ; Chanlon *et al*. , 2005) .

4.صبغة اللورا الحمراء Allura red E129

وهي من صبغات الآزو الحمراء تضاف إلى الأغذية والأدوية بكثرة كذلك تستخدم في مواد التجميل وصناعات الورق والأنسجة والجلود ، على رغم من استخداماتها الواسعة إلا أنها ذات تأثيرات سلبية كثيرة على مختلف أعضاء ووظائف الجسم (Bawazir , 2016)

5. صبغة الشوكولاتة البنية Chocolate Brown HT E155

صبغة الشكولاتة البنية (Chocolate Brown HT E155) هي من صبغات الآزو Azo العضوية الغذائية ذات لون بني محمر، عديمة الرائحة تعطى الرمز (EEC.NO.E-155) ، حالة المادة صلبة بشكل مسحوق دقيق fine powder أو بشكل حبيبات grains ، إما كثافتها (0.7) ، ذوبانيتها (180mgr/liter) واسها الهيدروجيني (PH=4-6) و وزنها الجزيئي (652.57 g/m) وهي مادة مستقرة ضمن الاستخدامات العادية وحساسة للهواء الرطب وصيغتها الجزيئية ($C_{27}H_{18}N_4Na_2O_9S_2$) ، واسمها الكيميائي disodium 4,4'-(2,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl)-1,3-(phenylenebis-azo) di-(naphthalene-1-sulfonate) (EFSA , 2010) ، إما التركيب البنائي لهذه الصبغة فهو :



الشكل رقم (2-1) يوضح الصيغة البنائية لصبغة الشوكولاته البنية (Leo *et al.* , 2012)

كما تضاف إلى الكثير من الأغذية كالأسماك ، واللحوم ، وكذلك مع الحلويات ، وغيرها ، وحسب الهيئة الأوربية لسلامة الأغذية EFSA (2010) فان المسموح تناوله من هذه الصبغة في الأغذية يوميا حوالي (0- 1.5غم/كغم) من وزن الجسم (Bawazir, 2012) .

2-3-1 تأثير الصبغات الغذائية Effect of food's colors

أصبحت الأغذية المصنعة جزئا هاما من التغذية البشرية وقد زاد من استخدام المضافات الكيميائية وبالأخص الصبغات الغذائية مما أدى إلى زيادة الدراسات المتعلقة بمثل هذه الصبغات بسبب كثرة الاختلافات والجدل حول تأثيراتها على الصحة البشرية واستخداماتها كما يجب إن تخضع لقانون محدد يسري على بلد معين أو مجموعة بلدان ، ليحدد التراكيز المسموح باستخدامها يوميا ، إذْ ركزت هذه الدراسات على تأثيرات الصبغات من النواحي الايضية Metabolism و السرطانية Carcinogenicity و السمية الجينية Genotoxicity وفرط الحساسية Hypersensitivity

والسمية المناعة Immunotoxicity والامتصاص Absorption والتكاثر Reproduction (Carocho *et al*. ,2014) .

تبدأ مخاطر صبغات الآزو بعد تناول الأغذية الحاوية عليها وامتصاصها من جدار الأمعاء الدقيقة إذ تنتقل إلى الكبد ويتم اختزالها بشكلٍ كامل إلى أمينات أروماتية وهذه المركبات تتأكسد بوجود إنزيمات الأكسدة إلى مشتقات N-hydroxy ، وهذا التحول الحيوي يحدث في معظم الثدييات ومن ضمنها الإنسان (Martins *et al*.,2016 ; Otani,2015) ، كما أن التأثير المسرطن أو السام للأصباغ الغذائية يكون إما بشكلٍ مباشر أو غير مباشر ، إذ أشارت بعض الدراسات إنَّ استعمال هذه الأصباغ لفترة طويلة يمكن أن يسبب العديد من الأمراض مثل فقر الدم وعسر الهضم والاعتلال العصبي في الدماغ وأمراض الكبد والكلى والطحال وتأخر النمو وكذلك أمراض الحساسية والطفح الجلدي والربو إلى جانب ذلك بعض الأمراض السرطانية (Rafii and Cernigti,1997; Combes and Haveland-Smith,1982) .

ومن جانب أخر ، أشار Mahmoud (2006) من خلال دراسة تأثير الصبغات الغذائية على الفئران البيض حدوث تشوهات في تركيب كبيبات الكلية ونخر في الوريد المركزي في الكبد وعدم انتظام في النبيبات المنوية للخصية وانخفاض في عدد الحيوانات المنوية و اضطراب حركتها .كما لاحظ Al- Shinnawy (2009) إن الصبغات الغذائية تسبب انخفاضاً ملحوظاً في وزن الجسم وانخفاض معدل دهون مصل الدم والكولسترول وزيادة في حجم الخلايا المرصوص للدم Hematocrit (Hct) وزيادة في متوسط حجم كريات الدم Mean corpuscular volume (MCV) وزيادة في تركيز إنزيمات الكبد مثل Alkaline phosphatase (ALP) و Alanine aminotransferase (ALT) .

فضلا عن ذلك أكد Amin وجماعته (2010)) إن صبغات الآزو تسبب استهلاك الخارصين الذي له أهمية كمرفق إنزيمي للنواقل العصبية كما تؤثر على التركيب النسيجي للكبد والكلية من خلال تكوين جذور حرة وإحداث إجهاد تأكسدي.

وفي دراسة أجراها Gautam وجماعته (2010) على تأثير صبغة التراترازين (E102) Tratrazine الصفراء على الجرذان لاحظوا انخفاض وزن الخصية وذيل البربخ وانخفاض أَعداد الحيوانات المنوية وزيادة في التشوهات المورفولوجية للحيوانات المنوية في ذيل البربخ . الى جانب ذلك وفي نفس الاتجاه اثبتت Himri وجماعتها (2011) بدراسة على الجرذان السويسرية بان صبغة التراترازين الغذائية تحول شكل كريات الدم الحُمْر من الشكل القرصي الاعتيادي إلى كريات ذات بروزات شائكة (echinocyte) وتغيرات ملحوظة في تركيز الكلوبيولين والكرياتينين وبروتينات الكلية وزيادة وزن الكبد وتغيرات نسجية مرضية لكل من الكبد والكلية .

من جهة أخرى تسبب صبغة الكرموسين Carmoisine انخفاض عدد كريات الدم البيضاء وزيادة في حجم الخلايا المرصوص للدم Hct وزيادة في معدل كل من البروتينات (الالبومين والكرياتينين

واليوريا وحامض اليوريك) وزيادة في البليروبين bilirubin وزيادة في استهلاك السوائل وانخفاض استهلاك الغذاء ونقص في وزن الجسم (Fijer and Al-Mashhedy, 2012) . كما إن زيادة الأطعمة الملونة تسبب تهيج الأمعاء واحمرار الجلد وزيادة في كريات الدم البيض WBC نتيجة لرد الجهاز المناعي على الالتهاب إذْ أثبتت إن الألوان تغير في التركيب النسيجي للكبد والكلى وذلك بسبب اضطراب الجهاز المناعي نتيجة موت الخلايا من قبل الجذور السامة والإجهاد التأكسدي وانخفاض في الإنزيمات المضادة للتأكسد Glutathione - S – Transferees (GST) و Glutathione (GSH) و glutathione peroxidase (GSH-px) وSuper oxide dismutase (SOD) و(Cat) Catalase (Soltan and Shehata ,2012).

ومن خلال دراسة أجريت على الجرذان البيض لوحظ إن زيادة الملونات في الغذاء تسبب زيادة في العدوانية وتسبب احمرار الجلد وتهيج الأمعاء ، وضعف الكليتين من خلال زيادة الكرياتين واليوريا والالبومين ، وزيادة في الكوليسترول وزيادة الكلسيريد الثلاثي (TG) Tricglycerol ، وتغيرات في خلايا الكبد وزيادة مستوى أنزيماتها وانخفاض مستوى الإنزيمات المضادة للتأكسد (GST , GSH , GSH-px, , Cat , SOD) وارتفاع مستوى بيروكسيد الدهون المالوندايالديهايد Malondialdehyde (MDA) مما يسبب أكسدة الأحماض الدهنية في أغشية الخلايا مؤديا إلى زيادة الجذور الحرة المسببة للإجهاد ألتأكسدي (Montaser and Alkafafy , 2013) .

كما ذكر De Campos and Marin-Morales (2013) بان صبغات الآزو Azo ثابتة ولا تتحلل وخصوصا في البيئة المائية وتحتوي على حلقات عطرية ولها سمية ومستقلباتها ذات سمية وراثية وتسبب طفرات وراثية وبعض منها مسرطنة .

كذلك أشارت بعض الدراسات التي أجريت على الفئران البيض بان صبغة غروب الشمس الصفراء Sunset Yellow (E110) وهي من صبغات الازو أيضا تسبب خلل في وظائف الكبد وانخفاض في الإنزيمات المضادة للتأكسد (GSH و GST و GSH-px وSOD وCat) وزيادة الجذور الحرة وارتفاع مستوى MDA واختلاف تراكيز بروتينات الكرياتين والالبومين واليوريا مما يؤكد خلل في عمل الكليتان وإضرار في أنسجة الكبد والكلية والدماغ (Masone and Chanforan, 2015; Yadav *et al.* , 2013)

كما أكد Yamjala وجماعته (2016) في دراسة تأثير صبغات الازو على الإنسان بأنها تسبب انخفاض في الأوالي المعوية التعايشية Flora بسبب الأمينات العطرية الناتجة عن ايض الصبغات وهي دلالة على السمية ، كذلك تسبب الصداع المتكرر لدى البالغين وللبعض من هذه الصبغات تأثيرات مسرطنة على المدى الطويل . وفي دراسة مماثلة على الإنسان أظهرت الآثار السلبية لهذه الصبغات على الجهاز المناعي وتسبب زيادة في فرط الحساسية (Vojdani, 2015) ، ومن خلال دراسة على تأثير صبغة اللورا الحمراء Allura Red (E 129) لاحظ بأنها تسبب فقر الدم والحساسية والطفح الجلدي والربو كما أنها تستنزف مضادات الأكسدة وتزيد الجذور الحرة بسبب ضعف الدفاع وتلف

الأنسجة وأكدت الدراسة على التأثيرات السلبية للصبغة على النواقل العصبية في الدماغ (Bawazir , 2016)

كما اثبت فجر (2017) بدراسة على ذكور الجرذان البيض بان الإصباغ الغذائية تسبب انخفاضاً في مستوى(SOD, GST, GSH , GSH-px) وجميعها انزيمات مضادة للأكسدة في مصل الدم وارتفاع في مستوى المالوندايالديهايد (MDA) و أوكسيد النتريك (NO) وارتفاع مستويات الدهون دلالة على حصول أكسدة فوقية للدهون و حدوث الإجهاد ألتأكسدي ، وارتفاع في مستوى اليوريا و الكرياتنين بسبب خلل في وظائف الكلى كذلك ارتفاع في مستوى الإنزيمات (ALT, AST , ALP) وانخفاض في مستوى HDL مما يدل على اضطراب في وظائف الكبد ، كما أكدت الدراسة النسجية حدوث تغيرات نسجية مرضية في أنسجة الكبد والكلية والمعدة و الأمعاء كذلك انخفاض في مستوى التعبير الجيني للأنزيم GST دلالة على سمية الإصباغ الغذائية .

2-3-2 تأثيرات صبغة الشوكلاتة البنية Effects of Chocolate Brown HT E155

صبغة الشوكولاتة البنية احد أنواع صبغات الآزو العضوية لها الكثير من التأثيرات السلبية على تركيب الحامض النووي DNA في الكبد وتلف في أنسجة الكلى ولها تأثير مدمر على الوظائف الحيوية (Hassan, 2010) .

كما إن هذه الصبغة ذات تأثير سلبي على الأطفال من عمر (1-10) سنوات أكثر من الكبار وان زيادة التركيز لمعدل الاستهلاك اليومي للمدى الطويل أكثر تأثيرا من المدى القصير (Aguilar *et al*.,2010) ، كذلك تسبب سمية جينية و لها تأثيرات مسرطنة من خلال تكوين أمينات عطرية وهي دلالة على السمية الجينية (Huybrechts *et al*.,2010) .

من جانب أخر ، اثبت Bawazir (2012) بدراسته تأثير صبغة الشكولاتة على ذكور الجرذان البيض بأنها تسبب انخفاض مستوى النواقل العصبية كالدوبامين ونور بينفرين وحامض امينو البوتريك من جميع مناطق الدماغ ، كما تؤثر سلبيا على وظائف الكبد والكلى وكذلك على التركيب النسيجي للكبد والكلى والدماغ . من جانب أخر أكد Hong وجماعته (2014) في دراسة على الفئران بان هذه الصبغة لم تسجل إي تأثيرات مسرطنة على الرغم من زيادة تراكيز الجرع حتى تركيز (425mg) لليوم الواحد ولكنها تسبب خللاً في وظائف الكلى وارتفاع نسبة الكرياتنين والألبومين واليوريا وزيادة نسبة الوزن النسبي للدماغ و الكبد والطحال والكظرية ،

وفي دراسة أخرى قاما بها Hassan and Selman (2017) لمعرفة ثاثير صبغة الشوكولاتة البنية على ذكور الجرذان البيض وجدوا حدوث انخفاض في وزن الجسم ، وتركيز الإنزيمات المضادة للتأكسد GST و SOD في حين كانت هنالك زيادة معنوية في بيروكسدة الدهون MDA و تركيز

الإنزيمات الناقلة للأمين ALT وAST وكانت هذه الزيادة ترتفع بزيادة تركيز جرعة صبغة الشوكولاتة بالإضافة إلى تغيرات نسجية مرضية في بطانة المعدة والأمعاء.

4-2 الإجهاد ألتأكسدي Oxidative stress

يعرف الإجهاد ألتأكسدي هو عدم اتزان بين الجذور الحرة ومضادات الأكسدة بسبب اضطراب في عمل الإنزيمات المضادة للأكسدة أو زيادة في إنتاج الجذور الحرة أو كلاهما معا (Davies, 2000) ، إذ تزداد تراكيز كل من جذور الاوكسجين الفعالة مثل جذر الهيدروكسيل Hydroxyl radical ، وجذر سوبر اوكسيد Superoxide radical وبيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide بتراكيز تفوق قدرة الأنزيمات المضادة للتأكسد للتخلص منها مما يؤدي إلى تأثيرات سامة وخلل في الوظائف الحيوية وتسبب أمراضاً لأجهزة وأعضاء الجسم المختلفة (Birben *et al*.,2012). يزداد تولد الجذور الحرة بسبب النشاط الايضي والإرهاق الجسدي والتقدم بالعمر أو بسبب تأثير خارجي كالتعرض للإشعاع والمواد الكيميائية والملوثات وتناول بعض العقاقير (Palmieri and Sblendorio , 2007) ، كما يعد الإجهاد ألتأكسدي واحدة من الآليات العلاجية لقتل الخلايا السرطانية ولكن كتأثير جانبي قد تستهدف خلايا غير مصابة مما يسبب ضرراً في أنسجة الأعضاء كالدماغ والقلب والخصية (Halliwell,2007 ; Valko *et al*.,2006).

الجذور الحرة Free radicals المسببة للإجهاد ألتأكسدي هي ذرات أو جزيئات تحتوي على الكترونات حرة في مدارها الخارجي مما يجعلها غير مستقرة ونشطة تبحث عن الكترونات لغرض الاستقرار والثبات الكيميائي مثل جذر الكاربونات Carbonate radical وجذر النترات Nitrate radical وجذور الهيدروكسيل Hydroxyl radical (OH) والأوكسجين المفرد O^{2-} وجذر السوبر أوكسيد السالب Superoxide anione radical ويعتبر من انواع جذور الاوكسجين الفعالة يمكن ان يتحول الى جذر بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide (H_2O_2) الذي يعد من أكثر أصناف الجذور الحرة سمية (Ferrari , 2001) ، وغالبا تهاجم الجذور الحرة اقرب جزيء ثابت إليها محاولة اقتناص الكتروناته وبذلك تتحول الجزيئات المهاجمة الفاقدة للالكترونات إلى جذور حرة تبحث عن الاستقرار وبذلك تستمر سلسلة من التفاعلات تهاجم أغشية الخلايا ومكوناتها وحتى الأحماض النووية وهذا يبين قدرتها على إتلاف الخلايا (Ferrari , 2001).

إما مضادات الأكسدة فهي أنظمة دفاعية تعمل على حماية الجسم من إضرار الجذور الحرة وغالبا ما يحدث الإجهاد ألتأكسدي بسبب عدم كفاءتها (Nirmala *et al*.,2011) ، ومضادات الأكسدة على نوعين

1- مضادات الأكسدة الإنزيمية Enzymatic antioxidants وهي أنظمة حيوية متعددة الوظائف لها دور وقائي وفعال في إزالة السموم ومنها إنزيم سوبر أوكسيد ديسميوتيز Super oxide (SOD) dismutase وإنزيم الكاتليز Catalase (Cat) و كلوتاثايون بيروكسيد (GSH-px)

glutathione peroxidase و كلوتاثايون ريدكتيز(GSH-rd) glutathione reductase (Halliwell,2001) .

2- مضادات الأكسدة الغير أنزيمية Non Enzmatic Antioxidant مثل فيتامين C وفيتامين A وفيتامين E و الفينولات Phenols والفلافونيدات Flavonoids و الكلوتاثايون Glutathione (GSH) وهو ببتيد قصير مكون من ثلاثة أحماض امينية هي Glutamate و Glycine و Cysteine والذي يوجد في مختلف الكائنات الحية ويعد من أهم مضادات الأكسدة وأكثرها فعالية (Xu *et al.* , 2017 ; Halliwell and Gutteridge,2015 ; Gupta and Sharma,2006)

5-2 بيروكسدة الدهون Lipid peroxidation

هي عملية أكسدة الأحماض المتعددة غير المشبعة polyunsaturated fatty acid الموجودة في أغشية الخلايا بسبب تفاعلات متسلسلة للجذور الحرة لتكون هيدروبيروكسيدات الدهون Lipid hydroperoxides التي تتفكك بدورها لتكون مركبات أخرى مثل المالوندايالديهايد (MDA) Malondialdehyde كناتج لعملية بيروكسدة الدهون (Halliwell and Gutteridge,2015)، وهذا يؤدي إلى زيادة في مستوى أصناف الأوكسجين الفعالة ومن ثمّ يتفاعل مع مضادات الأكسدة Antioxidants مثل الكلوتاثيون (GSH) مما يسبب انخفاض في تركيزها (Schieber, and Chandel , 2014 ; Lector,1996) .

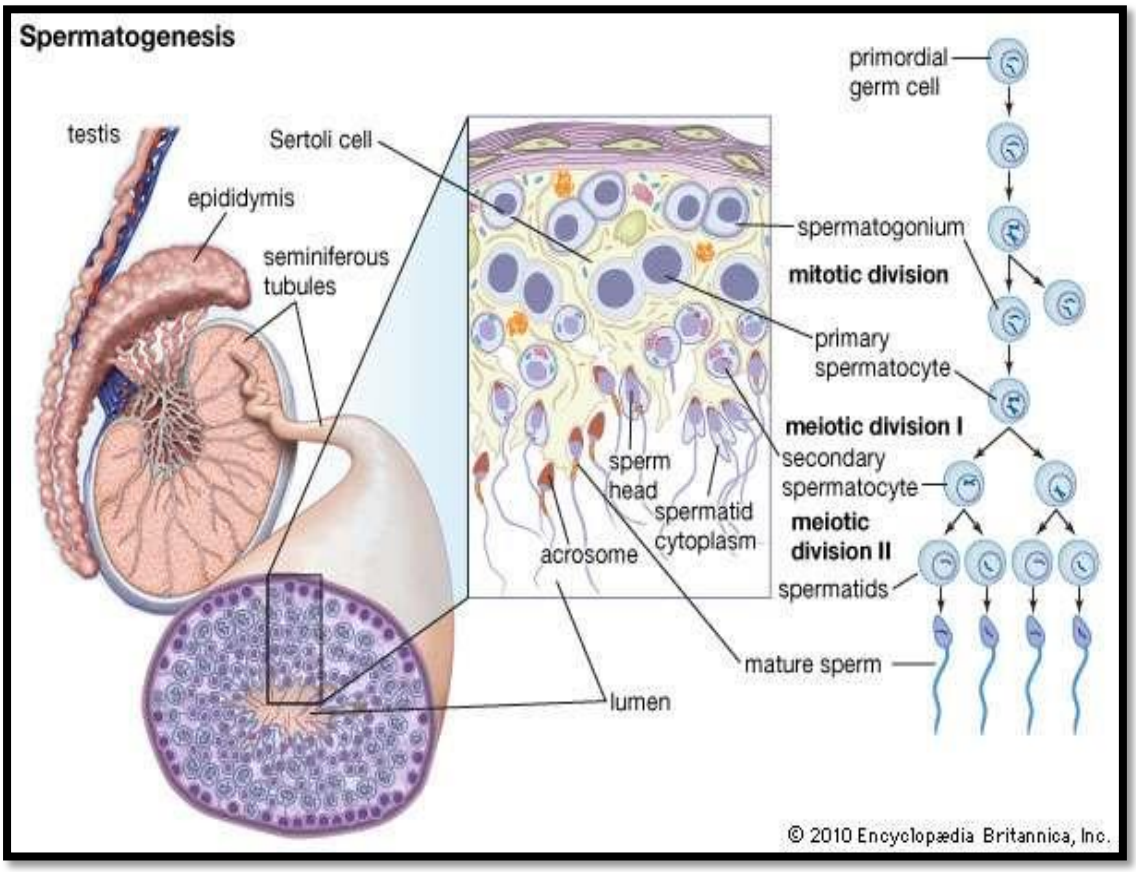
6-2 دورة تكوين النطف Spermatogenesis cycle

تحدث دورة تكوين النطف داخل الجدار المبطن للنبيبات المنوية seminiferous tubules إذ توجد خلايا جرثومية germe cells والتي تسمى سليفات النطف spermatogonia والتي تشكل معظم الخلايا المبطنة لجدار النبيبات المنوية وهي المسؤولة عن تكوين النطف إذ تمر بسلسلة من الانقسامات الخلوية والتغيرات التطورية والشكلية اْبتداءً من أماكن تواجدها على محيط النبيب المنوي ومتقدمة باتجاه تجويف النبيب إلى أن تتكون النطفة Spermatozoa وهذا ما يعرف بنشأة النطف أو تكوينها Spermatogenesis (Griswold , 2015; De Rooij, 2001) كما موضح في شكل (2-2) .

بالإضافة إلى هذه الخلايا يوجد نوعان من الخلايا الجسمية المساعدة هما خلايا سرتولي Sertoli cells التي تربط وتحيط بالسليفات داخل النبيبات المنوية وخلايا لايدك Leydig cells التي تقع بين النبيبات المنوية ومسؤولة عن إنتاج الهرمونات الجنسية الذكرية كهرمون الشحمون الخصوي Testosterone، إما خلايا سرتولي فهي خلايا كبيرة تستقر على غشاء قاعدي وترتبط مع بعضها البعض بروابط محكمة تكون بذلك الحاجز الدموي الخصوي blood-tastes barrier الذي يمنع من دخول المواد السامة والغريبة إلى داخل تجويف النبيبات كذلك يمنع الحيوانات المنوية والتي لا زالت في طور التكوين من الانتشار إلى الدم وهذا الحاجز لا يتطور ويقوم بوظيفته إلا عند البلوغ ، إن هذه الخلايا

هي المسئولة عن إفراز سائل يحتوي على مواد مغذية وبروتينات وإنزيمات وايونات جميعها ضرورية لتغذية وتطور الحيوانات المنوية كما يساعد على دفع الحيوانات المنوية باتجاه البربخ ، كما تقوم خلايا سرتولي بإفراز بروتين يدعى رابط الهرمونات الذكرية Androgen-binding protein (ABP) الذي يعمل على ربط وزيادة تركيز هرمون Testosterone الضروري لتطور الحيوانات المنوية كذلك تفرز البروتين المثبط Inhibin الذي يؤثر على الغدة النخامية ويثبط هرمون المحفز افراز للجريب FSH الذي يعمل على نضج الحيوانات المنوية Dong *et at.*, (2016 ; Oliveira *et al*.,2011; Walker, 2011; Hermo *et al*.,2010) ،

تبدأ دورة تكوين النطف بانقسامات اعتيادية للسليفات spermatogonia قبل البلوغ ليزداد عددها ويكون كافيا لإنتاج النطف طوال العمر وتبقى هذه الخلايا مرتبطة مع بعضها البعض بجسور أو زوائد بروتوبلازمية كما أنها تحاط وترتبط بخلايا سرتولي وعند البلوغ ونتيجة للتحفيز الهرموني تنقسم هذه



الخلايا انقساما اعتياديا أيضا لتكون خلايا نطفية أولية primary spermatocyte وجميع الخلايا لحد هذه المرحلة كاملة المجموعة الكرموسومية (2n) تنقسم هذه الخلايا انقسام اختزالي أول meiosis I إذ يختزل عدد الكروموسومات إلى النصف (1n) وتسمى الخلايا الناتجة بالخلايا النطفية الثانوية secondary spermatocytes تمر كل خلية منها بالانقسام الاختزالي الثاني meiosis II لتنتج أربع

خلايا تمتلك نصف العدد الكرموسومي (1n) تسمى ارومات النطف (طلائع النطف) المبكرة early spermatids وهي خلايا كروية صغيرة لا يكتمل الانقسام السايتوبلازمي cytokinesis وتبقى متصلة مع بعضها (Yanagimachi, 2017; Griswold, 2015; Hess and De Franca,2009)، كما موضح في شكل (2-2) .

شكل (2-2) يوضح عملية تكوين النطف Spermatogenesis (Sharma and Agarwal,2011)

ولكي تصبح النطف ناضجة تمر بسلسلة من التغيرات من خلال عملية التشكل والنضج والتي تسمى بحؤول النطف (Spermiogenesis) إذ تنفصل عن بعضها ويتم التخلص من السايتوبلازم الزائد تدريجيا وتتركز المادة الكروماتينية في الرأس head وتحاط بغشاء ويتطاول الرأس تدريجيا ويحاط الجزء الأمامي بتركيب قمعي يسمى بالجسم القمي acrosome ينتج من تمايز جهاز كولجي ويحتوي على إنزيمات تساعد على اختراق أغشية البيضة إما القطعة الوسطى middle piece للحيوان المنوي تتكون من ميتوكوندريا مرتبة بشكل حلزوني تقوم بإنتاج الطاقة اللازمة للحركة والجزء الأخير هو الذنب tail يتألف من سوط يحتوي على خيوط تنزلق على بعضها لأحداث الحركة وبذلك يكون حيواناً منوياً ناضجاًspermatozoa، ينطلق باتجاه تجويف النبيب المنوي (Dias *et al*., 2016 ; Turner, 2003) كما يوضح في شكل (2-3) ، وبذلك فأن للخصية وظيفتان الأولى تكوين النطف والثانية إفراز الهرمونات الضرورية لتكوين النطف وإظهار الصفات الذكريالأخرى (Mann&Lutwak-.Mann,2012) .

شكل (2-3) يوضح مراحل نشأة النطفة في الإنسان (Sharma and Agarwal,2011)

تستغرق عملية تكوين النطف Spermatogenesis وما يرافقها من انقسامات متعاقبة وتغيرات شكلية (68-74 يوم) في الإنسان وفي الفئران (34-35 يوم) إما في الجرذان البيض (48-52 يوم) (Durairajanayagam *et al*. ,2015 ; Cunnigham, 2002).

ومن الجدير بالذكر إن النطف تكتسب القدرة على الحركة بعد مرورها في نبيبات البربخ والذي يفرز سائل ضروري لنضج النطف (Ganong , 2003). أن إفرازات البربخ تكون غنية بالبوتاسيوم والكليسريل فسفوريل كولين (Glyceryl phosphoryl choline) والتي تعتبر مصدر الطاقة الكامنة للحيامن (Kumar *et al*.,2016 ; Dacheux *et al*. ,2005). أما إفرازات الحويصلات المنوية فأنها غنية بسكر الفركتوز و حامض الستريك Citric acid وذلك لتأمين الطاقة اللازمة لحركة النطف وأن نضج النطف يحصل عادةً عندما تصبح النطف قادرة على ا الحركة والإخصاب (Martini *et al*.,2010 ; Owen and Katz, 2005) .

تحتوي القذفة Ejaculation على 60-150 مليون خلية / سم3 وان 80% منها على الأقل تكون طبيعية تعد مشاكلة الخصوبة من أهم المشاكل الصحية الرئيسة في جميع أنحاء العالم وتؤثر على حوالي 15% من الأزواج ، في عام 2010 وجد نحو 48.5 مليون زوج في جميع أنحاء العالم يعانون من العقم ، مقابل 42 مليون في عام 1990، ويعزى 40 - 50% منها إلى أسباب تتعلق بالذكور (Stuppia

(Anderson *et al*.,2009; *et al*.,2015) . وتسمى حالة قلة النطف Oligozoospermia عندما يكون تركيز النطف في السائل المنوي 30 مليون خلية / سم3 وتكون دليل واضح على العقم أما اختفاء النطف بالكامل من السائل المنوي تسمى الحالة اللانطفية Azoospermia (Kobayashi *et al*.,2017; Dohle *et al*.,2002).

1-6-2 السيطرة الهرمونية على وظيفة الخصية Hormonal Control of Testicular Function

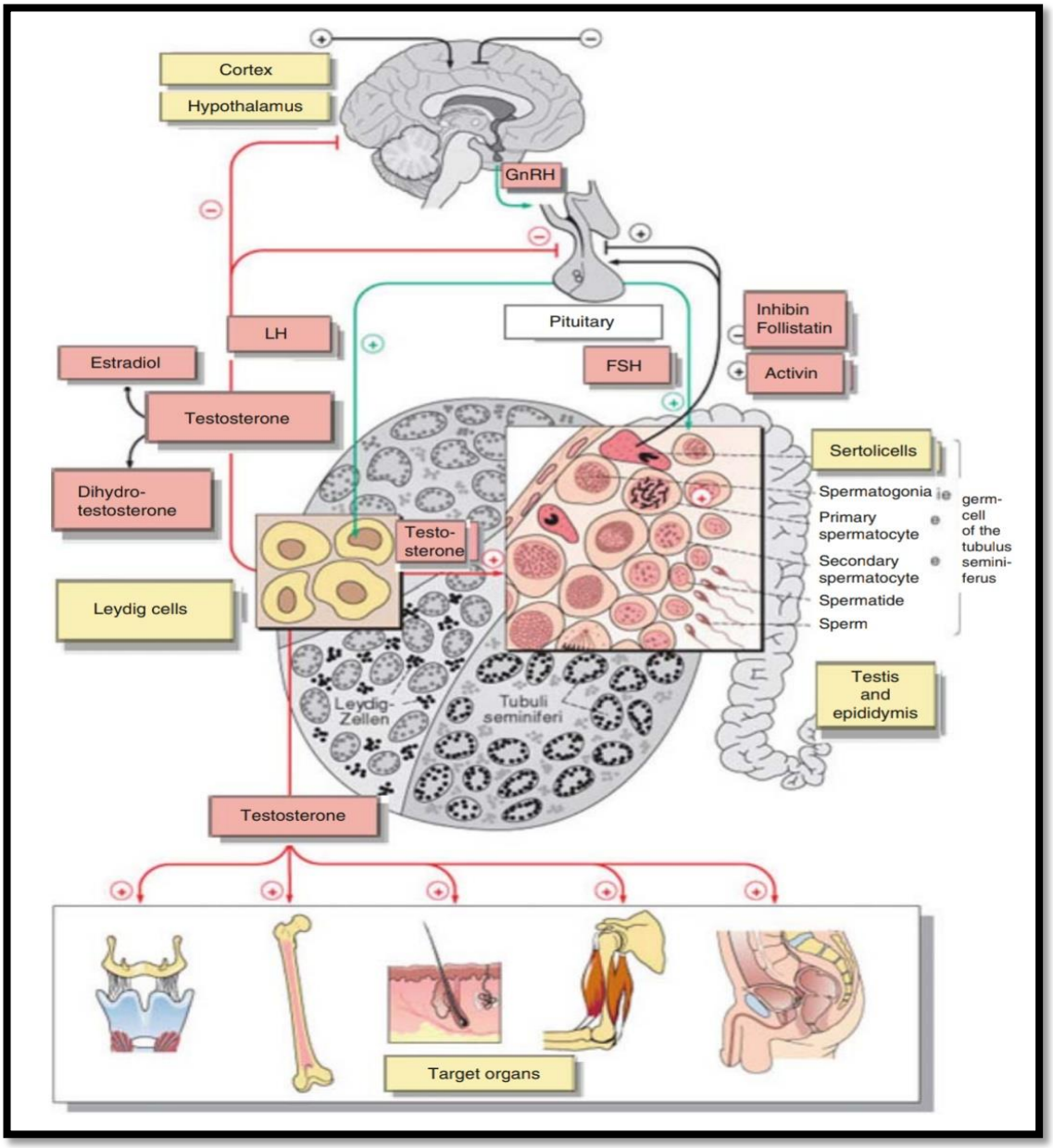
تتشارك ثلاث غدد صماء في تنظيم نشاط الجهاز التناسلي الذكري ، الأولى هي تحت المهاد hypothalamic إذ تفرز هرمون gonadotropin-release hormone (GnRH) والثانية النخامية pituitary تقوم بإفراز الهرمونات المنشطة (follicle-stimulating hormone(FSH) , lutenizing hormone(LH والثالثة الخصيتان testis تفرزان هرمون التستوستيرون Testosterone والهرمون المثبط inhibin و للتداخل بين عمل هذه الغدد يطلق عليها محور تحت المهاد – النخامية - الخصية hypothalamic-pituitary-testis axis (الشكل 2-6) ويكون هادئ قبل البلوغ Sadate-(Kuiri-Hänninen *et al*., 2014; Nagatchou *et al*.,2004) و عند الوصول إلى سن البلوغ تنشط تحت المهاد وتفرز هرمون GnRH والذي يتحرر تحت سيطرة نظام (kisspeptin- GPR54 system) حيث تنتج ببتيدة kisspeptin بوساطة KISS1 gene الموجود على كرموسوم رقم واحد (chromosome 1q32.1) والتي يرتبط بمستقبلات GPR54 الموجودة على أسطح خلايا تحت المهاد وبتالي يفرز GnRH ،عمر هرمون GnRH اقل من عشرة دقائق ثم يهدم بواسطة إنزيمات موجودة في خلايا الغدة النخامية . ينتقل هرمون GnRH بالأوعية الدموية تحت المهادية النخامية البوابية portal system ليؤثر على خلايا الجزء الأمامي للنخامية والتي تستجيب لتفرز الهرمونات المنشطة LH وFSH (Clasadonte and Prevot , 2018; Popa *et al*.,2008).

هرمون LH ينتقل بالدم إلى الخصية ليؤثر على خلايا لايدك Leyding الموجودة بين النبيبات المنوية لتقوم ببناء وإفراز هرمون الشحمون الخصوي المهم في تكوين و نمو وتطور النطف أما هرمون FSH الذي ينتقل أيضا بالدم إلى النبيبات المنوية ويرتبط بمستقبلات على خلايا سرتولي مما يحثها على إفراز البروتين الرابط للهرمونات الذكرية Androgen-binding protein (ABP) الذي يربط تستوستيرون فيزيد من تركيزه على أسطح خلايا سرتولي مما يسهم في نضج وتمايز الحيوانات المنوية sperms وهذه تمثل الوظيفة الأساسية والاهم للخصية (Lindgren *et al*.,2012;Allan *et al*.,2010) .

إن عمل محور تحت المهاد – النخامية – الخصية hypothalamic-pituitary-testis axis ينظم بواسطة إلية التغذية الراجعة السالبة negative feedback (الشكل 2-4) إذْ إن زيادة تركيز هرمون

تستوستيرون يثبط تكوين هرمون GnRH إما هرمون FSH فيثبط بواسطة هرمون Inhibin الذي يفرز بواسطة خلايا سرتولي داخل النبيباب المنوية عندما يزداد عدد الحيوانات المنوية حيث ينتقل هذا الهرمون بواسطة الدم ليؤثر على النخامية ويثبط إفراز FSH بعملية التغذية الراجعة السلبية (McNeilly *et al.* ,2003 ; McLachlan *et al.* ,2002) .

ومن الجدير بالذكر إن المؤثرات الجنسية ترسل إشارات عصبية عبر الأعصاب جار الودية العجزية (الفقرات الثانية والثالثة والرابعة من الحبل الشوكي) والتي تؤثر على العضلات الملساء في الشرايين pudendal الداخلية المغذية للقضيب الذي يؤدي إلى إفراز أوكسيد النتروجين **NO** الذي يسبب ارتخاء في عضلات الشرايين واتساعها وزيادة تدفق الدم منها نحو الاجسام الكهفية حيث تحتقن بالدم مما يؤدي إلى الانتصاب (العبدالله ، 2012).



الشكل (2-4) يوضح السيطرة الهرمونية على الجهاز التناسلي الذكري (Weinbauer *et al.*,2010)

2-6-2 العوامل المؤثرة على الخصوبة Factors influencing of the fertility

تقسم العوامل المؤثر على الخصوبة إلى عوامل داخلية وعوامل خارجية وكما يأتي :

ا.العوامل الخارجية وتشمل :

1- **درجة الحرارة Temperature**:ان لدرجة الحرارة اهمية كبيرة في عملية نشأت النطف واي تغيير في درجة الحرارة قد يتسبب في عدم اكتمال هذه العملية او تشوه النطف المتكونة لذلك توجد الخصى خارج تجويف الجسم في اللبائن و تحاط الخصيتان بتركيب كيسي يدعى الصفن Scrotum وتنظيم درجة الحرارة للخصيتين هي من أهم الوظائف التي يقوم بها الصفن إذ يسمح للخصيتين إن تتدليا بعيدا عن الجسم لتتخذ موقع تكون فيه الحرارة اقل من حرارة الجسم وينكمش الصفن عندما يكون الجو بارداً فيرفع الخصيتين ليقربهما من الجسم الدافئ نسبيا ،كذلك تنظم درجة الحرارة لتبقى ملائمة لتكوين النطف بوجود شبكة من الشعيرات الدموية الوريدية تدعى ضفيرة محلاقية Pampinirorm plexus تحيط بالشريان الخصوي المزود للخصية بالدم قبل دخوله إليها وتمتص الحرارة من الدم الشرياني وتبرده إلى درجة مناسبة (Durairajanayagam *et al*.,2015;Kim*et al*. ,2013)

2-التغذية Nutrition : الغذاء من أهم العوامل التي تؤثر ا في عملية تكوين النطف، ذلك من خلال تأثيره على تكوين ونمو المناسل وعلى عملية تحرر الهرمونات المحفزة لها (LH وFSH) لأن الأدلة تشير إلى أن الأغذية التي تنقصها السعرات الحرارية تؤثر سلباً على تكوين الهرمونات إلى جانب ذلك وجد إن بعض الفيتامينات مثل(C , A , B, E) تؤثر على نوعية السائل المنوي وحجم الخصية والغدد الملحقة بها أن أي نقص في هذه الفيتامينات يؤدي إلى ضمور الخصية ورداءة السائل المنوي ونقص في نسيج الغدد الملحقة كما أن المعادن تؤثر على كفاءة المناسل (Hafez and Hafez, 2013;Mann and Lutwak-Mann,2012; Yousef *et al*. , 3003)

3- الضوء The light : يعد الضوء من أهم العوامل البيئية التي تؤثر على الفعاليات التكاثرية في معظم الحيوانات، حيث يتم السيطرة على مواسم التناسل في بعض الأنواع بزيادة طول مدة الإضاءة اليومية وأنواع أخرى بقلة الإضاءة اليومية (Oseen and Wassersug, 2002)

4 - **عوامل أخرى Other factors** : تتأثر عملية نشوء النطف بعدة عوامل أخرى أهمها الكحول والتدخين و الالتهابات الموضعية و الأشعة السينية و المواد السامة و الإجهاد التأكسدي و بعض العقاقير الطبية و بعض المعادن الثقيلة وخصوصاً الكادميوم والرصاص فضلا عن ثاني اوكسيد الكاربون (Gabrielsen and Tanrikut , 2016; Creemers *et al*.,2002) ، ولاحظ Harrison (1998) أن التعرض الطويل الأمد للمواد الكيميائية الصناعية كمنتجات النفط والأصباغ والمذيبات الكيميائية يؤدي إلى أضرار في الفعاليات التكاثرية.

ب. عوامل داخلية وتشمل :

1-الهرمونات Hormones : تعد الهرمونات من العوامل التي لها تأثيرات مباشرة على عملية نشوء النطف واهم هذه الهرمونات هي (FSH و LH و البرولاكتين وهرمون النمو و الاندروجينات والانهبين) وينظم عملية إفراز هذه الهرمونات بآليات التغذية الاسترجاعية السالبة وان أي خلل في هذه الهرمونات سينعكس سلباً على عملية نشوء النطف (Nass and Evans, 2019 ; محي الدين وجماعته , 1990).

2- العوامل الوراثية: تسهم العيوب الوراثية في 15- 30% من حالات العقم عند الذكور وتشمل تغيرات وراثية في وظيفة جينات معينة بما في ذلك شذوذ الكروموسومات وقصور الغدد التناسلية وقد تم تحديد تشوهات وراثية لدى الرجال الذين يعانون من نقص في وزن الجسم و أوزان الأعضاء التناسلية لأسباب غير معروفة وتشوهات في الجهاز التناسلي الذكري قد يؤدي إلى نقص في إعداد النطف (Ferlin *et al*.,2007) .

3 - عوامل أخرى غير وراثية : إما العوامل الغير وراثية كثيرة منها العدوى التناسلية والتعرض لجراحة الصفن أو الأعضاء التناسلية و دوالي الخصية و الأمراض المزمنة ، اذ ان ما لا يقل عن 40% من أسباب العقم في الرجال غير معروفة (Dohle *et al*.,2002)

- المواد وطرائق العمل Materials and method

1-3 المواد Materials

1-1-3 المواد المستخدمة Used Materials

الجدول (1-3) يوضح المواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Chocolate صبغة الشوكولاتة البنية Brown E155	BHD	England
2	Phosphoric acid	Merck	Germany
3	Nigrosin صبغة النكروسين	Sorchim	Swiss land
4	Eosin صبغة الايوسين	BHD	England
5	Hematoxylin صبغة الهيماتوكيسلين	Merck	Germany
6	Normal saline محلول ملحي فسيولوجي	BDH	England
7	Chloroform كلوروفورم	BDH	England
8	37% Formaldehyde فورمالدهايد	BDH	England
9	H_2O_2 بيروكسيد الهيدروجين	Solvchem	England
10	Phosphate buffer محلول منظم	Hopkin and Wiliams	England
11	Trichloro acetic acid(TCA)	Hopkin and Wiliams	England
12	Thiobarbituric acid (TBA)	Hopkin and Wiliams	England
13	عدة قياس (Kit) الهرمونات (FSH,LH,Testerone)	Biomerieux	France
14	عدة قياس (Kit) الهرمون (GnRH)	Elabscience	U.S.A
15	N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride	Fluka	Germany
16	Sulfanilamide	Qualkenis	India

2-1-3 الأجهزة المستخدمة Used devices

الجدول (2-3) الأجهزة والأدوات المستخدمة بالدراسة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية **Spectrophotometer**	**Apel**	**Italy**
2	جهاز الطرد المركزي **Centrifuge**	**Heraeus-Christ Gumby**	**Germany**
3	جهاز الحمام المائي **Water bath**	**Karl-Kob**	**Germany**
4	مجهر ضوئي **Light microscope**	**CM001CYANscope**	**Belgium**
5	الميزان الحساس **Melter AE 200**	**Sartouris**	**Germany**
6	عدة تشريح **Dissection set**	**Elphor**	**Germany**
7	مايكروبايبيت **Micropipette**	**Slamed**	**Germany**
8	ميزان الكتروني **Electronic balance**	**Heraeus-Christ Gumby**	**Germany**
9	إطباق بتري **Petri dishes**	**Zhejian INI Medical Devices**	**China**
10	ثلاجة **Refrigerator**	**Ishtar**	**Iraq**
11	شرائح زجاجية **Slides**	**Standard**	**Germany**
12	كاميرا المجهر الضوئي متباين الأطوار نوع **BIMF 200 SA**	**Canon**	**Japan**
13	**PH meter**	**Karl-Kob**	**Germany**
14	جهاز المشراح الدوار **Rotary Microtome**	**Anglia**	**England**
15	جهاز تحليل الدم الاوتاماتيكي **Blood autoanalyzer**	**Sysmex-XP-300**	**Japan**
16	جهاز عداد الاشعاعات **Gamma conter**	**Olympus**	**Japan**

3-1-3 حيوانات التجربة Experiment animals

استخدمت في هذه الدراسة (30) جرذ من الذكور البالغة تم تربيتها في البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية /جامعة القادسية للمدّة من شهر تشرين الثاني سنة 2017 وحتى شهر آذار سنة 2018 بعد ان تم شرائها من البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري /جامعة بغداد ، و أعطيت الحيوانات فترة شهر للتكيف على المكان وطبيعة الغذاء قبل البدء بالتجربة ، وكانت أوزان الحيوانات عند بدء التجربة بين (180-200) غم وأعمارها متقاربة بين (14- 16) أسبوع تقريبا، وزعت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية مغطاة بأغطية معدنية وفرشت أرضيتها بنشارة الخشب وتمت العناية بنظافة الأقفاص وتبديل الأرضية باستمرار وتعقيمها بالمطهرات وكذلك العناية المستمرة بنظافة قناني الإرواء وغرفة الإيواء ، كما خضعت جميع حيوانات التجربة إلى ظروف مختبريه ملائمة بدرجة حرارة ومدة إضاءة وظلام طبيعية (10-14) ساعة تقريبا ، زودت الحيوانات بالماء والعليقة القياسية بصورة حرة وبحسب التركيبة المبينة في (الملحق 2) (Ward , 1970) .

2-3 طرائق العمل Working methods

1-2-3 تصميم التجربة Design Experience

وزعت حيوانات التجربة على ثلاث مجاميع كل مجموعة ضمت(10) حيوانات وكما يلي :

1- مجموعة السيطرة (C) Control جرعت 1 مل من الماء الاعتيادي ولمدة 60 يوم متواصلة .
2- مجموعة المعاملة الأولى (T1) جرعت1مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/ كيلوغرام من وزن الجسم ولمدة 60 يوم متواصلة.
3- مجموعة المعاملة الثانية (T2) جرعت1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام / كيلوغرام من وزن الجسم ولمدة 60 يوم متواصلة .

2-2-3 تحضير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155

تم تحضير صبغة الشوكلاتة البنية بتركيز 200 mg /kg من وزن الجسم للجرعة ذات التركيز الاوطئ وتركيز 400 mg/kg من وزن الجسم للجرعة ذات التركيز الأعلى ، وكلاهما يتجاوز الحدود المسموح بها حسب هيئة سلامة الأغذية الأوربية European Food Safety Authority (EFSA) والتي حددت الاستخدام اليومي من هذه الصبغة بتركيز (0.0 – 1.5 mg/kg) ،وكذلك تم تحديد الجرع لهذه الدراسة حسب دراسات سابقة ولنفس الصبغة من قبل كل من Hassan and Selman (2017) على ذكور الجرذان البيض البالغة و Khatun وجماعته (2017) على إناث الجرذان البيض البالغات .

اذ حضرت الصبغة بشكل مسحوق دقيق منتج من شركة (BHD) الانكليزية وبعد حساب معدل وزن الجسم لكل مجموعة من مجموعات الدراسة ومقارنتها مع تركيز 200 mg لكل 1000 mg تم حساب وزن الصبغة وكمل المسحوق الى 1000 ml ، وبنفس الطريقة تم تحضير تركيز 400 mg .

3-2-3 التضحية بالحيوانات Sacrifice of Animals

بعد 24 ساعة من انتهاء أخر عملية تجريع ، تم وزن جميع الحيوانات وحسب مجاميعها ثم خدرت بمادة الكلوروفورم لضمان بقاء عمل القلب وتم سحب الدم بصورة مباشرة بواسطة محاقن طبية بطريقة طعنة القلب Heart Puncture وبعدها وضع جزء من الدم بأنابيب لا تحتوي على مادة مانع التخثر و بصورة مائلة لمدة 30 دقيقة ثم وضعت داخل جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة15 دقيقة بسرعة (3000 دورة / دقيقة) لغرض الحصول على المصل ، تم سحبه بواسطة الماصة الدقيقة micropipette والتي تم حفظه في أنابيب بلاستيكية جمدت بدرجة (- 20) م ° إلى حين إجراء التحاليل الكيميوحيوية ، ووضع (2 ml) من الدم بأنابيب بلاستيكية تحتوي على مادة مانع التخثر (EDTA) للاختبارات الدمية .

وبعد ذلك تم تشريح الحيوانات واستئصال الخصى والبرابخ وتنظيفها من الأنسجة الرابطة والأجزاء الدهنية ، ونشفت بواسطة ورق ترشيح و وزنت بميزان دقيق وتم حفظ الخصى والبرابخ اليمنى بالفورمالين 10% لغرض عمل شرائح للدراسة النسيجية ، إما البرابخ اليسرى فوضعت في محلول فسلجي Normal saline لاستخدامها في دراسة معالم النطف .

3-3 المعايير المدروسة Parameters of study

1-3-3 التغيرات الوزنية Change of weight

1-1-3-3 معدل الكسب ألوزني Change of body weight

تم قياس أوزان الحيوانات قبل البدء بالتجربة وتم حساب معدل أوزان الحيوانات لكل مجموعة من مجموعات التجربة الثلاث ولمعرفة الفروق الوزنية ومعدل الكسب ألوزني تم طرح معدل الوزن النهائي بعد التجربة من معدل الوزن الابتدائي قبل التجربة لكل مجموعة لملاحظة التغيرات الوزنية.

2-1-3-3 وزن الأعضاء التناسلية weight of reproductive organs

بعد استئصال الأعضاء التناسلية (الخصى والبرابخ) وإزالة الأجزاء الدهنية والأنسجة المحيطة بها وزنت الأعضاء باستعمال ميزان حساس وتم حساب وزن العضو نسبة إلى وزن الجسم وبحسب المعادلة الآتية :

$$\text{نسبة وزن العضو} = \frac{\text{وزن العضو بالملغرام}}{\text{وزن الجسم بالملغرام}} \times 100\%$$

2-3-3 الفحوص الهرمونية Measurements of hormones

1 -2-3-3 قياس تراكيز الهرمونات (FSH , LH , Testosterone)

تم قياس تراكيز هذه الهرمونات الثلاثة في مصل الدم باستخدام عدة قياس (Kit) بواسطة جهاز Mini Vidas المصنع من شركة Biomerieux الفرنسية وبطريقة التنافس المناعي إذ تعتمد هذه الطريقة على مبدأ التنافس على الارتباط بالأجسام المضادة بين الهرمون المراد قياسه وبين الهرمون الموسوم المعلوم التركيز والذي يتناسب عكسيا مع تركيز الهرمون المراد قياسه مجهول التركيز ويقاس الهرمون الموسوم والمرتبط بالأجسام المضادة باستخدام جهاز عداد الإشعاعات Gamma counter

ويتم تحديد قيمة الهرمون في المصل بعد قراءة المنحني الذي يرسمه الجهاز للهرمون الموسوم المرتبط بالأجسام المضادة الذي يربط بين تركيز الهرمون الموسوم وعدد النبضات الإشعاعية المقروءة في الجهاز .

2-2-3-3 قياس تركيز هرمون GnRH

تم قياس هرمون GnRH بالاعتماد على الطريقة المناعية المعروفة(Enzyme-Linked (ELISA Immuno sorbent Assay باستخدام عدة قياس (Kit) المنتج من قبل شركة Elabscience الأمريكية والذي يحتوي على المكونات بحسب الجدول الآتي:

جدول (3-3) يوضح محتويات Kit قياس هرمون GnRH

ت	المادة	المواصفات	التخزين
1	Micro ELISA Plate	8wells x 12 strips	لمدة 6 أشهر بدرجة -20°C
2	Reference Standard	2 vial	لمدة 6 أشهر بدرجة -20°C
3	Concentrated Biotinylated Detection Ab(100x)	1 vial 120 μL	لمدة 6 أشهر بدرجة -20°C
4	Concentrated HRP C conjugate (100x)	1 vial 120 μL	لمدة 6 أشهر بدرجة -20°C في الظلام
5	Reference Standard and Sample Diluent	1 vial 20 ml	لمدة 6 أشهر بدرجة 4 °C
6	Biotinylated Detection Ab Diluent	1 vial 14 ml	لمدة 6 أشهر بدرجة 4 °C
7	HRP Conjugate Diluent	1 vial 14 ml	لمدة 6 أشهر بدرجة 4 °C
8	Concentrated Wash Buffer (25x)	1 vial 30 ml	لمدة 6 أشهر بدرجة 4 °C
9	Substrate Reagent	1 vial 10 ml	لمدة 6 أشهر بدرجة 4 °C بالظلام
10	Stop Solution	1 vial 10 ml	بدرجة 4 °C
11	Plate Sealer	5 pieces	

تم قياس تركيز الهرمون بإتباع الخطوات التالية :

1- ثبت العدد المناسب من الحفر Wells على المسند أو الحامل الخاص بها المجهز مع طقم الهرمون

2- اخذ 10 مايكرو لتر من مصل الدم ونفس الحجم من المادة القياسية Standard (بتراكيز مختلفة) وتوضع هذه الإحجام في الحفر المهيأة لها.

3- أضيف 100 مايكرو لتر من كاشف Biotinylated Detection لكل حفرة

4- أضيف 50 مايكرو لتر من كاشف المضاد HRP Conjugate المستخلص من المصل لكل حفرة.

5- مزجت محتويات الحفر مزجا جيدا وتم حضنها بدرجة حرارة 37°C لمدة 30 دقيقة

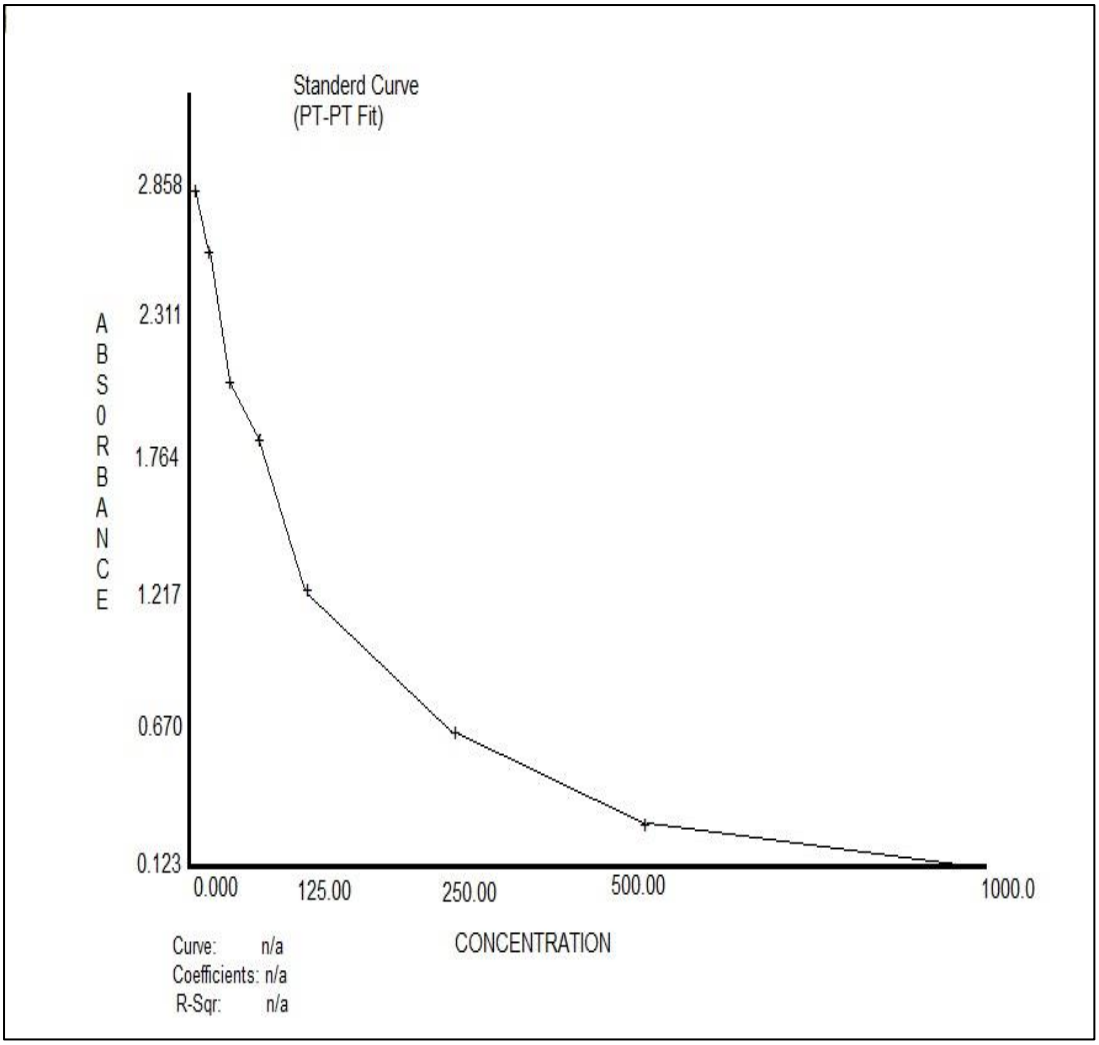
6- غسلت الحفر من محتوياتها برفق بالماء المقطر بشكل متقطع خمس مرات.

7- أضيف 90 مايكرو ليتر من الكاشف Substrate Reagent لكل حفرة ثم حضنت لمدة 15 دقيقة بدرجة 37°C

8- أضيف 50 مل من محلول إيقاف التفاعل Stop Solution

9- قراءة الامتصاصية Absorbance لمحتويات كل حفرة عند الطول الموجي 450 نانومتر بواسطة الجهاز ELISA Reader .

10- رسم منحني القياسي كعلاقة بين التراكيز القياسية والامتصاصية الآتي :



الشكل (3-1) يوضح منحني المعايرة لقياس هرمون GnRH

3-3-3 قياس مضادات الاكسدة والمؤكسدات Antioxidation and Oxidation

3-3-3-1 تقدير فعالية أنزيم الكاتليز Determination of Catalase

تقاس فعالية إنزيم الكاتليز باستخدام طريقة (Aebi , 1974) والتي تعتمد على الاختلاف في الامتصاصية عند تحول بيروكسيد الهيدروجين إلى ذرتي ماء وأوكسجين نتيجة لفاعلية أنزيم الكاتليز وتقاس الامتصاصية عند 240 نانوميتر في جهاز Spectrophotometer.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Cat} 2H_2O + O_2$$

تحضير الكواشف

1-محلول الفوسفيت المنظم Phosphate buffer في وسط متعادل وبتركيز 50 µm وهو يحضر من:

A- محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين Potassium dihydrogen orthophosphate KH_2PO_4 بتركيز 50 µm ويمكن تحضيرها بإذابة 6.81 غم من KH_2PO_4 بكمية من الماء المقطر ويكمّل الحجم إلى لتر.

B- محلول فوسفات الصوديوم الهيدروجينية Disodium hydrogen orthophosphate $Na_2HPO_4.2H_2O$ ويمكن تحضيرها غم بإذابة 6.9 من $Na_2HPO_4.2H_2O$ في كمية من الماءالمقطر

2- بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 30%

ويتم ذلك بمزج 0.34 ml من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 30% وأكمل الحجم الى 100 ml من محلول الفوسفيت المنظم

طريقة العمل :

يُؤخذ 50 µl من المصل ويتم تخفيفه ب 5 ml من محلول الفوسفات المنظم 50 µm ، pH 7 توضع المحاليل في أنبوبتي اختبار وكما يأتي :

	Test	Blank
Phosphate buffer	**….**	**1ml**
Diluting serum	**2 ml**	**2 ml**
H2O2	**1 ml**	**…..**

يبدأ التفاعل بإضافة بيروكسيد الهيدروجين المحضر حديثا إلى أنابيب الاختبار وبواسطة جهاز المطياف Spectrophotometer عند 240 نانوميتر يتم تسجيل القراءة الأولى بعد 15 ثانية من بدأ التفاعل وتُسجل القراءة الثانية بعد 30 ثانية من بدأ التفاعل ويتم حساب فعالية أنزيم الكاتليز عن طريق المعادلة الآتية :

$$K = \frac{V_t}{V_S} \times \frac{2.3}{\Delta t} \times \frac{E_1}{E_2} \log \times 60$$

K: rate constant

Δt: t_2 - t_1 and it is equal to 15 seconds.

E1: the initial absorbance at 15 seconds.

E2: the final absorbance at 30 seconds.

Vt: total assay volume.

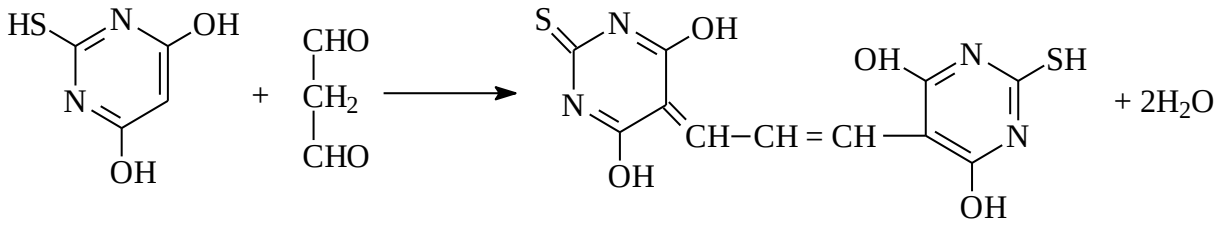
Vs: sample volume in the assay mixture.

2-3-3-3 تقدير مستوى بيروكسيدة الدهن في الدم (المالوندايالديهايد) MDA

Determination of Lipid Peroxidation in Blood (Malondialdehyde)

المبدأ الأساسي Basic Principle

لقياس مستوى المالوندايالديهايد MDA في المصل بالاعتماد على طريقة (Guidet and Shah , 1989)، إذ تقيس الطريقة المالوندايالديهايد وهو من أهم نواتج بيروكسدة الدهون في المصل والذي يتفاعل مع حامض ثايوباربيوتريك Thiobarbituric acid (TBA) وناتج التفاعل يكون ملوناً على إن يتم التفاعل في وسط حامضي بعدها تقاس شدة الامتصاصية لناتج التفاعل بواسطة جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية Spectrophotometer عند532 نانوميتر



TBA **MAD** **Product**

تحضير الكواشف Preparation of Reagent .

1- محلول ثلاثي كلورو حامض الخليك %17.5 Trichloro acetic acid (TCA) .

2-محلول حامض ثايوباربيوتريك %0.6 Thiobarbituric acid (TBA) .

3-محلول ثلاثي كلور وحامض الخليك %70 Trichloro acetic acid (TCA) .

طريقة العمل Procedure

تم وضع طريقة العمل لتقدير مستوى المالوندايالديهايد وبحسب الجدول الآتي :

	Test	Blank
Serum	150 µl	-
Distill water	-	150 µl
TCA (17.5%)	1 ml	1 ml
TBA (0.6%)	1ml	1 ml
يمزج جيدا ثم يوضع في حمام مائي لمدة 15 دقيقة ثم يترك ليبرد بعدها يضاف TCA70%		
TCA (70%)	1 ml	1 ml

وتترك الأنابيب لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة بعدها تتم عملية الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة لمدة 15 دقيقة ثم توضع في جهاز المطياف عند 532 نانوميتر لتتم قراءة شدة الامتصاص للراشح المتكون .

الحسابات Calculation

يكون تقدير تركيز المالوندايالديهايد بالاعتماد على المعادلة الآتية :

$$\text{The concentration of Malondialdehyde } (\mu mol/l) = \frac{A_{test} - A_{blank}}{E_O \times L} \quad \mathbf{D * 10^6}$$

E_o = Extinction coefficient $1.56 \times 10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$

L= light bath 1cm

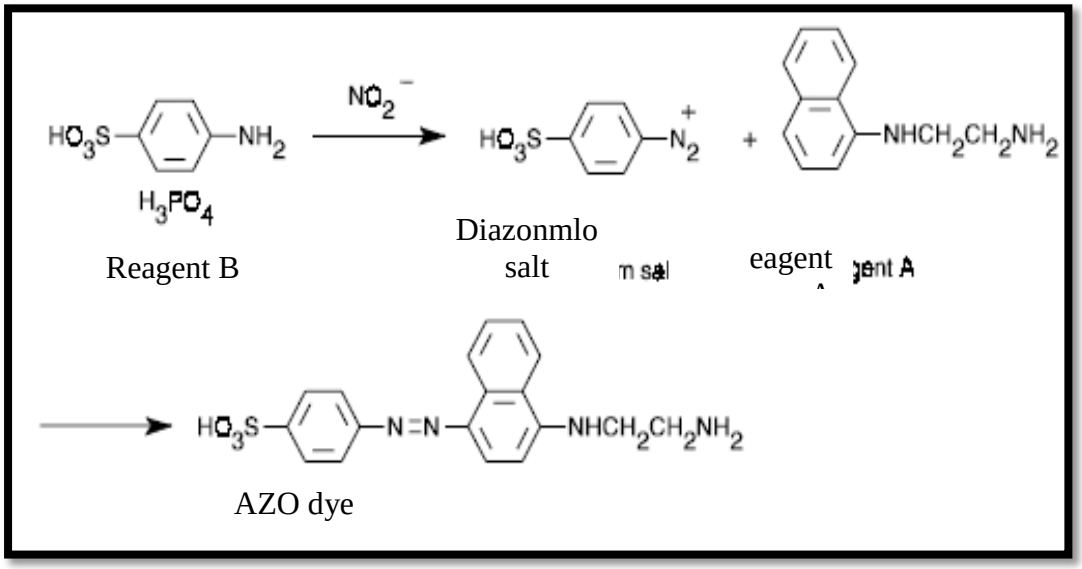
D=dilution factor $\frac{1\ ml\ vol\ used\ in\ ref}{0.15} = 6.7$

3-3-3-3 قياس مستوى أوكسيد النيتريك (NO)

Determination of Serum Nitric Oxide Level in Rats Serum

المبدأ الأساسي Basic Principle : تم أتباع طريقة (Granger *et al*.,1996) لقياس مستوى أوكسيد النتريك (NO) ، وذلك بتفاعل النتريت مع سلفانيلاميد Sulfanilamid و(1-النفثول)-N إيثيلين ثنائي الأمين هيدروكلوريد N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride

لينتج لون وردي معقد التي تقاس الامتصاصية له عند 548nm في وسط حامضي، يتم تحويل حامض sulfanilic بواسطة النتريت إلى الملح الديازونمول Diazonmlo salt
، الذي يزدوج بسهولة مع N-(1-النفثول) - إيثيلين ثنائي الأمين لتكوين صبغة الآزو الملونة التي يمكن الكشف عنها في طول موجي 548nm.



الشكل (2-3) : يوضح تفاعل Griess (Granger *et al*.,1996)

تحضير الكواشف Preparation of Reagent

1- كاشف Griess يحتوي على:

A- 25 ml بتركيز 0.1mg/ml من N-(1-النفثول) إيثيلين ثنائي الأمين هيدروكلوريد N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride .

B- 25 ml بتركيز 0.01mg/ml من Sulfanilic acid يحضر في 5% من حامض الفسفوريك Phosphoric acid. مزجت كميات متساوية من المكونات A و B لتكوين كاشف Griess ، يتم تحضير الكاشف إثناء التجربة ويستخدم آنياً.

2- محلول النتريت القياسي: حضر من مزج 1 مل من 1 ملي مولاري نتريت الصوديوم في الماء المقطر.

طريقة العمل Procedure:

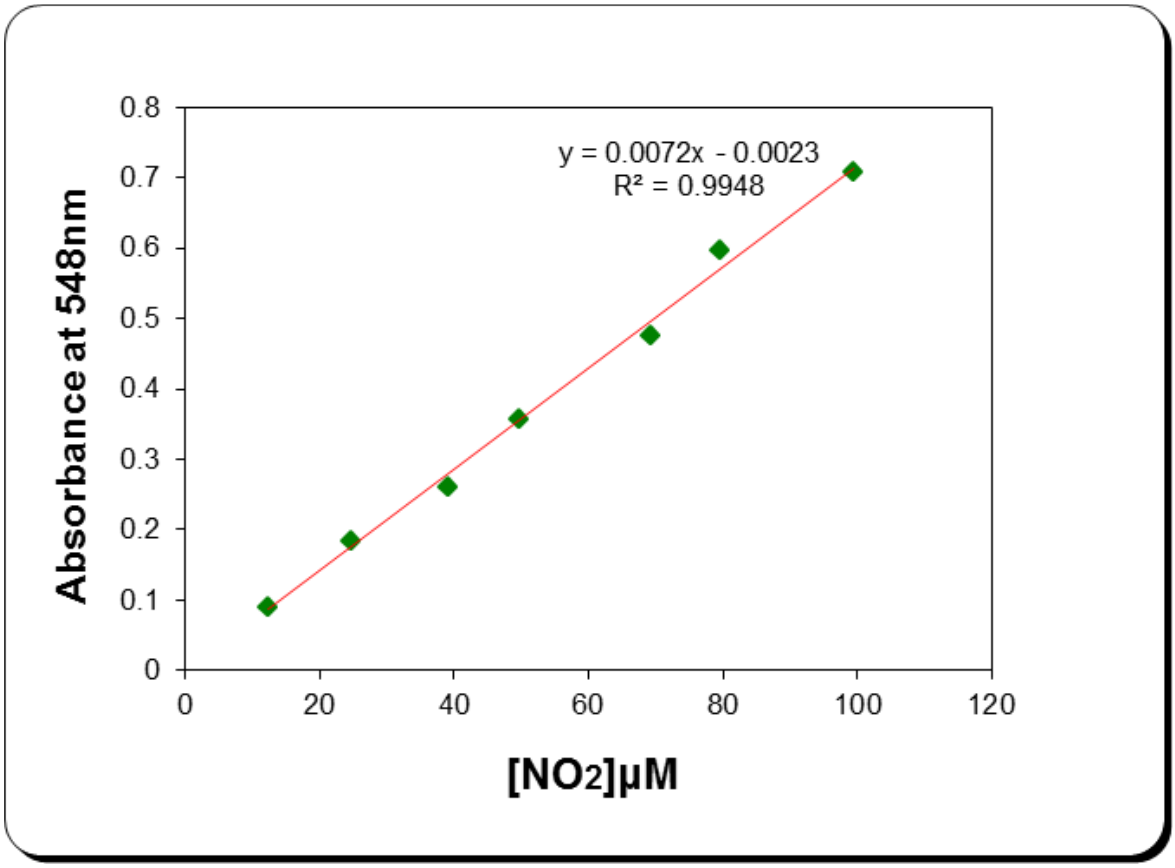
حضرت مجموعتان من الأنابيب على النحو الآتي:

Sample	Blank	Reagent
300µl	_	Serum
100µl	100µl	Griess reagent
2.6 ml	2.9ml	D. W

مزجت الكواشف، وحضن المزيج لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، قيست الامتصاصية للبلانك والعينة في طول موجي 548 nm. يتم قياس تركيز النتريت في كل عينة باستخدام منحني المعايرة.

المعايرة: حضر 1mM من نترات الصوديوم القياسية بإذابة 0.69mg من نترات الصوديوم(MW=69 mg/mole) في كمية قليلة من الماء المقطر، ثم أكمل الحجم إلى 10 مل.

رسم منحنى المعايرة لمحلول نتريت الصوديوم بتراكيز مختلفة بين (1-100µM)، قرأت الامتصاصية عند طول موجي 548 nm لكل تركيز.



الشكل(3-3):منحني المعايرة لمحلول نتريت الصوديوم

4-3 المعايير الفسلجية للخصوبة Physiological Parameter of Fertility

1-4-3 دراسة معالم النطف في البربخ

بعد استئصال البربخ الأيسر وتسجيل وزنه تم عزل ذيل البربخ ثم غمره في 1 ml من المحلول الفسيولوجي الدافئ ، ثم قطع بواسطة مشرط حاد إلى قطع صغيرة جدا لغرض تحرير النطف الموجودة فيه (Hinting , 1989) ثم تركت لمدة دقيقة في درجة 37 م° بعدها تم وضع قطرة من الخليط (النطف البربخية + المحلول الملحي الفسيولوجي) بواسطة ماصة باستور على شريحة زجاجية نظيفة وجافة غطيت القطرة ب Cover slid وفحصت تحت المجهر المركب باستخدام القوة 40x لحساب معالم النطف والتي شملت حساب المعايير التالية :

1-1-4-3 تركيز النطف Sperms concentration

تم حساب تركيز النطف حسب طريقة Hinting (1989) ، أخذت أول قطرة من خليط نطف ذيل البربخ بواسطة ماصة باستور ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وجافة ، غطيت القطرة بغطاء cover slid وفحصت تحت المجهر الضوئي باستخدام قوة التكبير 40x ، لقد تم حساب عدد النطف في 10 حقول مجهرية ويحسب تركيز النطاف (نطفه/مليلتر) من المعدل الحسابي للنطاف المحسوبة في الحقول المجهرية العشرة ، ثم يضرب المعدل الحسابي للنطاف في العامل المضاعف 1 مليون ولتسهيل عملية العد استعمل القلم لرسم قطرين متعامدين على السطح العلوي الخارجي للعدسة العينية فيظهر الحقل المجهري مقسم أربع أجزاء فتحسب رؤوس النطف داخل كل جزء .

1-4-3- 2 حركة النطف Sperms Motility

تم حساب نسبة النطف المتحركة حسب طريقة Levine وجماعته (1992) اخذ قطرة من خليط ذيل البربخ بعد خلطه جيدا بواسطة ماصة باستور ووضعت على الشريحة زجاجية جافة ودافئة وغطيت بغطاء الشريحة ثم عد ما لا يقل عن 200 نطفة لكل شريحة باستعمال قوة التكبير 40x وتم حساب النسبة المئوية للنطف المتحركة وفق المعادلة الآتية :

$$\text{النسبة المئوية للنطف المتحركة} = \frac{\text{عدد النطف المتحركة}}{\text{العدد الكلي للنطف (المتحركة وغير المتحركة)}} \times 100\%$$

3-1-4-3 عيوشة النطف Sperms Viability

اتبعت طريقة Bambe (1988) لحساب (النسبة المئوية للنطف الحية/النطف الميتة) وذلك بأخذ قطرة من خليط نطف البربخ توضع على طرف الشريحة الزجاجية دافئة ثم يضاف إليها قطرة من صبغة الايوسين- نكروسين (الملحق رقم **3**) ، ثم يخلط لمدة 30 ثانية ثم تسحب القطرة لعمل مسحة والتي ترك لتجف في الهواء ثم تفحص تحت المجهر بقوة تكبير 40 x إذ تصطبغ رؤوس النطف الميتة باللون الوردي المحمر (الايوسين) بينما لا تصطبغ رؤوس النطف الحية بالصبغة . حيث تم عمل

مسحتين لكل عينة من عينات الدراسة ولكل مسحة تم حساب ما لا يقل عن 200 نطفة وذاك من خلال حساب النطف على طول المسحة وبشكل متعرج zigzag وتم حساب النسبة المئوية لعيوشة النطف وحسب المعادلة التالية:

النسبة المئوية للنطف الحية = عدد النطف الحية (غير المصبوغة) / العدد الكلي للنطف (المصبوغة وغير المصبوغة) × 100%

4-1-4-3 النطف السوية Sperms

تم إتباع طريقة Axnér وجماعته (1999) حيث تم عمل مسحتين لكل عينة بالطريقة نفسها التي اتبعت في حساب عيوشة النطف واعتبرت النطف التي تختلف في الشكل بأنها نطف غير سوية أو مشوهة بعد إن تم حساب 400 نطفة على الأقل من مجوع المسحتين لكل عينة من عينات الدراسة وحسبت النسبة المئوية للنطف السوية بحسب المعادلة الآتية :

النسبة المئوية للنطف السوية = عدد النطف السوية / العدد الكلي للنطف (السوية وغير السوية) × 100%

5-3 المعايير الدمية Hematological parameters

1-5-3 تعداد خلايا الدم البيض وكريات الدم الحمّر ونسبة الهيموغلوبين وحجم الخلايا المرصوص ومتوسط حجم الكريات الحُمر :

فحصت هذه المعايير الدمية باستعمال جهاز (Auto Blood Analyzer Sysmex – XP300) وذلك بوضع عينة من الدم المسحوب في الجهاز مباشرةً ، وبعد ذلك سجلت جميع النتائج للمعايير اعلاه من الجهاز.

6- 3 الدراسة النسيجية Histological study

حضرت المقاطع النسيجية اعتمادا على الطريقة الموصى بها من قبل كل من المختار وجماعتها (1982) ، و Bancroft وجماعته (1996) إذ تم إزالة المثبت عن طريق غسل العينات بماء الحنفية لمدة ساعة ثم أجريت الخطوات الآتية :

1- الانكاز Dehydration

إذ مررت العينات بسلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي (70 , 80 , 90 , 95 ,100%) ولمدة ساعتين لغرض سحب الماء الموجود داخل النسيج بصورة تدريجية .

2 -الترويق Cleaning

روقت العينات بمحلول الزايلين Xylene مرتين ولمدة ساعتين بكل مرة لجعل العينات أكثر شفافية وأزالت محلول الانكاز .

3- التشرب Infiltration

بعد الانتهاء من الترويق تم نقل العينات الى جارات معدنية حاوية على شمع البرافين (paraffin wax) المنصهر في فرن كهربائي درجة حرارته (60-59 ºc) وذلك بوضع العينات فيه مرتين ولمدة (1.5-1) ساعة لكل مرة لتصلّب العينات.

4 – الطمر Embedding

تم طمر العينات في قوالب بلاستكية خاصة حاوية على شمع البرافين علمت Labeled وتركت لتتصلب إلى اليوم التالي ثم نقلت لغرض تقطيعها إلى مقاطع نسيجية رقيقة .

5- التقطيع Sectioning

تم تثبيت القالب لغرض التقطيع في جهاز جهاز المشراح الدوار Rotary Microtome وقطعت بسمك 8 مايكرومتر ثم نقلت الأشرطة المقطعة إلى حمام مائي درجة حرارتة (45-40ºc) لفرش النسيج لمدة دقيقتين بعدها ثبتت المقاطع النسجية على شرائح زجاجية نظيفة بعدها تركت الشرائح لتجف على صفيحة ساخنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة ساعة ثم وضعت بسلات معدنية خاصة بالتصبيغ وبصورة عمودية.

6- صبغ المقاطع النسيجية Staining hoistological section

قبل البدء بعملية التصبيغ يجب إزالة الشمع وذلك من خلال وضع الشرائح الزجاجية في فرن كهربائي بدرجة 60ºc ولمدة ساعة ثم وضعت بزايلول مرتين 5 دقائق في كل مرة بعدها مررت الشرائح في سلسلة تنازلية من الكحول الاثيلي وبتراكيز 100%, 90%,80% لمدة 10 دقائق لإرجاع الماء ثم وضعت في محلول صبغة الهيماتوكسلين (المبين تركيبها في الملحق رقم **4**) لمدة 5-10 دقائق وبعدها غسلت بالماء الحنفية ولمدة 5 دقائق ومن ثم بالكحول الحامضي (ملحق رقم **4**) 15 دقيقة لازالت الصبغة الزائدة بعدها غطست المقاطع في صبغة الايوسين(ملحق رقم **4**) لمدة 5-10 دقائق وغسلت بعدها بالماء المقطر لمدة خمس دقائق ثم مررت بتراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (70%، 90%، 95% و100%) والزيلول لمدة 15-30 دقيقة لغرض الترويق.

7- التحميل Mounting

استخدمت للتحميل مادة D.P.X لتثبيت الشرائح الزجاجية ،ثم وضعت الشرائح الزجاجية على صفيحة ساخنة بدرجة حرارة 37 ºc لمدة 24 ساعة للتجفيف بعدها تم فحصها بالمجهر الضوئي .

1-6-3 الفحص والتصوير المجهري Microscopic examination and Photomicrography

تم فحص الشرائح الزجاجية لتحديد التغيرات في مقاطع الأنسجة المدروسة باستعمال المجهر الضوئي لتحديد التغيرات النسيجية فيها وأخذت مواقع مناسبة من هذه الشرائح ،وتم تصويرها باستخدام المجهر الضوئي (MEIJI microscope) والمزود بكاميرا رقمية نوع (BIMF 200 SA) وعلى قوى تكبير مختلفة.

2-6-3 القياسات النسيجية

3-6-2-1 الخصية Testis

اشتملت دراسة التغيرات النسيجية لمقاطع الخصى كما يأتي :

ا.حساب معدل قطر النبيبات ناقلة المني

تم قياس النبيبات ناقلة المني باستعمال المقياس الدقيق العيني Ocular micrometer بعد معايرتة بالمقياس الدقيق المسرح Stage micrometer وبقوة 40 x وتم حساب معدل أقطار 10 نبيبات منوية المنتظمة الشكل (دائرية او قريبة من الدائرية) في كل مقطع ثم حساب المعدل العام لاستخراج معدل القطر للنبيب ناقل المني ، كما تم قياس سمك الطبقة الجرثومية وذلك بقياس السمك من الغشاء القاعدي الى الفراغ للنبيب ناقل المني وبواقع 10 قراءات لكل حيوان ثم استخراج المعدل العام لها .

ب. حساب أعداد خلايا المكونة للنطف وأعداد خلايا لايدك

حسبت أعداد خلايا المكونة للنطف المتمثلة بسليفات النطف والخلايا النطفية واورمات النطف في 20 نبيب منوي لكل حيوان ، ثم حسبت أعداد خلايا لايدك المتواجدة بين كل ثلاث نبيبات منوية وكررت الأخيرة عَشّر قراءات لكل حيوان باستخدام العدسة الشيئية 40x واتبعت طريقة (Alwachi *et al.*,1988) لحساب معدل أعداد تلك الخلايا .

3-6-2-2 البربخ Epididymis

تم قياس أقطار نبيبات ذيل البرابخ للحيوانات باستخدام المقياس العيني الدقيق وبقوة 40x إذ قيست أقطار النبيبات الدائرية أو القريبة من الدائرية وبمعدل 10 قراءات لكل حيوان ثم استخراج المعدل العام لها . كذلك تم قياس سمك الطبقة الظهارية المبطنة لذيل البربخ من غشاء القاعدي إلى تجويف البربخ وبمعدل 10 قراءات لكل حيوان ثم استخراج المعدل العام لها .

3-7 التحليل الإحصائي Statistical Analysis

خضعت نتائج التحليل الإحصائي لبرنامج Statisitical Package for Sciences (SPSS) the social إصدار (21) لمعرفة الفروق بين المعدلات للمعايير المدروسة للمجاميع المختلفة وقد تم تحديد الفروق المعنوية عند مستوى احتمالية 5% باستخدام اختبار التباين الأحادي (ANOVA) One way analysis of variance كما تم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اقل فرق معنوي (LSD) Least significant differences (الراوي ، 2000).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4المعايير الوزنية Weight Parameters

1-1-4 معدل الكسب الوزني body weight .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود فرق معنوي واضح (P<0.05) في معدل الكسب الوزني لمجموعة المعاملة الأولى (T1) بتركيز 200ملغم/ كغم من وزن الجسم ومجموعة المعاملة الثانية (T2)) بتركيز 400 ملغم / كغم من وزن الجسم مقارنة مع معدل الكسب الوزني لمجموعة السيطرة C (الجدول 4 -1) في حين لم يكن هنالك إي فرق معنوي(P>0.05) بينهما ، وقد اتفقت نتائج هذه الدراسة مع (Neshe *et al*., 2016) وذلك بانخفاض معدل الكسب الوزني للحيوانات التجريبية المعاملة بصبغة الشوكلاتة البنية ،كما أن لصبغات الازو الغذائية الأخرى تأثير مماثل إذ تسبب انخفاض معدل الكسب الوزني لجسم الحيوانات المعطاة لهذه الصبغات (Al-Shinnawy and Elkattan., 2013;Fijer and Al-Mashhedy,2012; Hashem *et al*.,2010 ; Al-Shinnawy,2009) في حين اختلفت هذه الدراسة مع ما توصل اليه كل من Sharma *et al*.,2005 ; Gautam *et al*.,2010) Chatterjea and Shinde.,2002) والذين اكدوا ان صبغات الازو تسبب زيادة في وزن الجسم ومن ثم حدوث بدانة ، وقد يفسر ذلك بأن الصبغات الغذائية الاصطناعية تسبب زيادة في معدل الكسب الوزني للحيوانات المجرعة ولكن لمدَّة زمنية محدودة بعد ذلك يبدأ معدل الكسب الوزني بالانخفاض وهذا ما اكده كل من Osman وجماعته (1995) و (Aboel- Zahab) و جماعته (1997) .

قد يعزى سبب انخفاض معدل وزن الجسم في الدراسة الحالية إلى انخفاض مستوى الكوليسترول hypocholesterolemic في الدم وهذا ما أكده (Al-Shinnawy 2009) بدراسته حول تأثير عدد من صبغات الازو على الجرذان إذ سجل انخفاض في إجمالي الكوليسترول في الدم وخاصة مع الجرعات عالية التركيز. ومن المحتمل إن يكون سبب انخفاض وزن الجسم ناتج عن هدم البروتينات والدهون وخلل في وظائف الأعضاء بفعل الإجهاد التاكسدي وعملية أكسدة الدهون (Vanaja and Palanimuthu , 2014)، كذلك ان زيادة الجذور الحرة الناتجة عن تأثير الصبغة لها تأثير على الخلايا وأنسجة الجسم وكذلك الكبد والأحماض النووية واضطراب العمليات الايضية وارتفاع الأكسدة الدهنية في الدم وهذا يسبب فقدان الوزن (Ajiboye, 2012) ، وقد يكون السبب في فقدان الوزن إلى تغيرات نسجية مرضية في المعدة والأمعاء بسبب زيادة تركيز جرعة صبغة الشوكولاتة البنية وهذا يؤثر سلبا على عمليات الهضم وأمتصاص الغذاء وفقدان الشهية

(Hassan and Selman , 2017). بالإضافة إلى ذلك ، فقد أكد Sharma وجماعته (2009) إن سبب الانخفاض في وزن الجسم ربما يحدث كاستجابة للتأثيرات السامة لصبغات الازو.

2-1-4 وزن الأعضاء التناسلية Weight 0f Reproductive Organs

أشارت نتائج الدراسة الحالية (الجدول 4-1) حصول انخفاض معنوي (P<0.05) في نسبة أوزان الخصى ووزن البربخ إلى وزن الجسم لمجموعة المعاملة الأولى (T1) بتركيز 200 ملغم/ كغم من وزن الجسم ومجموعة المعاملة الثانية (T2) بتركيز 400 ملغم / كغم من وزن الجسم عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (C) وكذلك وجود فروق معنوية (P<0.05) بين كل من مجموعتي المعاملة (T1وT2) بالنسبة لأوزان الخصى في حين لم يكن هنالك فرق معنوي (P>0.05) بينهما بالنسبة لوزن البربخ.

وقد جاءت نتائج الدراسة مع اتفاق كل من (Gautam *et al.*, 2010 ; Sharma *et al.*, 2009 ; Mahmoud , 2006) كما أشارت الكثير من الدراسات حول تأثير صبغات الازو الغذائية ومن ضمنها صبغة الشوكلاتة البنية على العمليات الفسلجية في الجسم وتسبب إضراراً كبيرة للجهاز التناسلي والعصبي والكبد والكلية وباقي أنسجة الجسم (Bawazir, 2012; Mathur *et al*.,2005; Abdle-Aziz and Al-Ashinnawy, 1993) . من الممكن أن يكون سبب انخفاض في نسبة أوزان الخصى والبرابخ إلى وزن الجسم هو بسبب انخفاض مستوى تركيز هرمون التيستيستيرون كما أثبتت الدراسة الحالية ، وذلك لان هذا الهرمون ضروري جدا لبناء ونمو عضلات الجسم والأعضاء التناسلية وبالأخص تكامل التركيب النسيجي لهذه الأعضاء وأداء وظائفها وانخفاض مستوى هذا الهرمون يسبب ضمور للأعضاء التناسلية (Maitra and Mitra , 2008 ; Turner and Bagnara , 1976) ، أو بسبب الجذور الحرة المتولدة بتأثير الصبغة التي تتفاعل مع الدهون المكونة لأغشية الخلايا وإنتاج المالونداليهايد MDA الذي يشير إلى وجود الإجهاد التاكسدي ويتسبب في زيادة نفوذية الأغشية الخلوية وانخفاض سيولتها وفقدانها للأحماض الدهنية مما يؤثر على عمل الإنزيمات الغشائية وبالتالي يؤثر على تركيب ووظيفة الأغشية وموت الخلايا (Saafi *et al*., 2011) ،كما ان للإجهاد التاكسدي التأثير الواضح على الخلايا المبطنة للنبيبات المنوية مما يسبب التنكس Degeneration والتنخر Necrosis وموت الخلايا المولدة للنطف كذلك يؤثر على نمو خلايا لايدك وتكاثرها (Marcon *et al*.,2008) ، إذ يؤدي إلى اضطرابات في عملية نشأت النطف ينتج عن ذلك حصول نقص في إعداد الخلايا المولدة للنطف داخل النبيبات الناقلة للخصية والبربخ للحيوانات المعاملة بالصبغة بحسب ما أظهرت نتائج الدراسة الحالية وهذا النقص له دور في انخفاض أوزان الخصى والبرابخ .

الجدول (4-1) يوضح تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155 على معدل الكسب الوزني ونسبة وزن الخصية ووزن البربخ إلى وزن الجسم في ذكور الجرذان البيض لمدة 60 يوم .

الأوزان / المجاميع	معدل الكسب ألوزني (بالغرام)	نسبة وزن الخصية \وزن الجسم (بالغرام)	نسبة وزن البربخ \وزن الجسم (بالغرام)
السيطرة C	106.00±2.91 A	0.442±0.012 A	0.21±0.003 A
المعاملة الأولىT1 200 mg/kg	72.00±7.64 B	0.408±0.0086 B	0.16±0.003 B
المعاملة الثانيةT2 400 mg/kg	62.40±12.38 B	0.382±0.006 C	0.15±0.002 B
LSD	21.6	0.0239	0.023

- **C تمثل مجموعة السيطرة تضم الحيوانات التي جرعت ماء الشرب الاعتيادي طيلة فترة التجربة.**
- **T1 تمثل مجموعة الاولى جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **T2 تمثل مجموعة المعاملة الثانية جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **الأرقام تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية والحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود فروق معنوية .**

2-4 التغيرات الهرمونية Hormonal changes

اظهر التحليل الإحصائي لنتائج الدراسة الحالية الموضحة في الجدول (4-2) انخفاضاً معنوياً (P<0.05) في مستوى تركيز هرمون الشحمون الخصوي Testosterone (T) و الهرمون المحرر لمحرضات المناسل (GnRH) و هرمون المحفز للجريبات (FSH) و الهرمون اللوتيني (LH) في مصل حيوانات الاختبار في مجموعة المعاملة الأولى (T1) ومجموعة المعاملة الثانية (T2) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (C) ، كذلك وجود فرق معنوي (P<0.05) بانخفاض تركيز هرمون Testosterone (T) و هرمون (GnRH) في مجموعة المعاملة الثانية (T2) عن تركيزه في مصل الدم لحيوانات مجموعة المعاملة الأولى (T1) في حين لم تظهر النتائج إي فرق معنوي (P>0.05) بين مجموعة المعاملة الأولى (T1) و مجموعة المعاملة الثانية (T2) بالنسبة لتركيز هرمون المحفز للجريبات (FSH) و الهرمون اللوتيني (LH).

جاءت هذه النتائج متفقة مع دراسة (Khatun *et al*.,2017) على تأثير صبغة الشوكولاته البنية في خصوبة إناث الجرذان البيض إذْ لاحظ انخفاض تركيز هرمون LH ، FSH و هرمون الاسترادايول مع زيادة جرعة الصبغة وقد أوعز سبب هذا الانخفاض بالهرمونات إلى دور صبغة الشوكولاته في

تثبيط محور تحت المهاد النخامية الخصية من خلال تكوين العديد من انواع الجذور الحر وحدوث إجهاد تاكسدي، كذلك اثبت العنبكي (2018) انخفاض مستوى تركيز هرمون الشحمون الخصوي T و LH و FSH بفعل الاجهاد التاكسدي الناتج من الجذور الحرة المتولدة بسبب عقارالهسبردين. وربما يعود سبب انخفاض تركيز هرمون الشحمون الخصوي الى دور الجذور الحرة في تثبيط نشاط الجينات Steroidogenic acute regulatory (StAR) و CYP11A1 المسؤولة على نقل الكوليسترول في خلايا لايدك ومن ثم تثبيط تخليق الهرمونات السترويدية (AL-Awady and AL-Zamely, 2016 ; Tsai *et al*., 2003 ; Diemer *et al*., 2003) .

كما أكد Mahmoud (2006) إن معاملة الجرذان بالصبغة الزرقاء تسبب انخفاض إنزيم Acid phosphatase في المصل مما يؤدي إلى ضمور خلية لايدك Leydig و يقلل من هرمون الشحمون الخصوي ويؤثر سلبا على عملية تكوين النطف ، أو قد يعزى سبب انخفاض مستوى الشحمون الخصوي إلى زيادة القشرانيات السكرية وذلك لان النسبة بين مستوى كل من الكورتيزول و الشحمون الخصوي تعد مؤشرا على الإجهاد (Uchida *et al*., 2004). بالإضافة إلى ذلك أشار كل من (Fathollahi *et al*., 2011; Gore *et al*., 2006) إن القشرانيات السكرية تؤثر بصورة مباشرة أو غير مباشرة على مستوى تحت المهاد وتثبط إفراز هرمون GnRH وانخفاض مستوى هذا الهرمون في النظام البابي يؤدي إلى تثبيط عملية بناء كل من LH و FSH من النخامية الأمامية وبالنتيجة انخفاض الشحمون الخصوي .

من جهة أخرى، ارتفاع مستوى MDA وNO وانخفاض مستوى إنزيم كاتالايز CAT التي سجلتها الدراسة قد يفسر انخفاض مستوى هرمون التيستستيرون وان الضرر الناتج من الأكسدة السبب في تثبيطه إفراز هرمون GnRH إذ اثبت Bhat *et at*.,(1995) أن اوكسيد النيتريك (NO) يزداد تركيزه بسبب الإجهاد التاكسدي ويؤثر على الناقل العصبي Glutamate الذي يلعب دورا مهمَّاً في السيطرة على إفراز هرمون (GnRH) .

وإلى جانب ذلك، لاحظ كل من Scheuer (2010) و Santosh وجماعته (2011) إن تحفيز محور HPA (تحت المهاد - النخامية– الكظرية) بسبب الإجهاد بالجذور الحرة يؤدي الى تثبيط محور HPG (تحت المهاد - النخامية - الخصية) ذلك من خلال زيادة في إفراز الهرمون المحرض لقشرة الكظرية (CRH) Corticotropin releasing hormone من تحت المهاد والذي يحفز النخامية الأمامية لتحرير الهرمون المحفز لقشرة الكظرية Adrenocorticotropic hormone (HCTH) والذي يقوم بتحفيز قشرة الكظرية لإفراز هرمون الكورتيزول، حيث يعمل هرمون CRH على خفض إفراز هرمون GnRH وهرمون LH وهرمون FSH مما يؤثر على انخفاض الوظيفة الصمية للخصى ومن ثم انخفاض تركيز هرمون الشحمون الخصوي بالدم (Whirledge and Cidlowski , 2013) ، وأكد Li , وجماعته (2003) إن زيادة مستويات mRNA لهرمون CRH تثبط إفراز هرمون LH وتقلل من مستوى الشحمون الخصوي وتحدث هذه

الحالة كاستجابة لمختلف أنواع للإجهاد . كما يسهم هرمون CRH بتحرير ببتيدات Opioid peptides والتي تقوم بتثبيط إفراز GnRH ,كذلك تؤثر هذه الببتيدات على إفراز محرضات المناسل من النخامية إذ إن العديد من تشابكات المحاور والنهايات العصبية المكونة للببتيدات Opioid وكذلك المكونة لهرمون GnRH تقع في النتوء الوسطي Median Eminence بالقرب من الأوعية البابية للنخامية و المتصلة مع الجزء الغدي للنخامية إذ يقوم الجزء الوسطي والأمامي من النخامية ببناء الببتيدات مما يؤكد دورها في تنظيم إفراز محرضات المناسل (Ciechanowska *et al*., 2010 ; Dhandapani and Brann., 2002) .

كما إن الإجهاد التاكسدي سبب العديد من الإضرار في خلايا تحت المهاد مما يقلل من ارتباط أسطحها بمستقبلات GPR54 للبتيد kisspeptin المسؤول عن إفراز الهرمون GnRH والمنتجة من قبل الجين KISS1 gene الموجود على كرموسوم رقم واحد (chromosome 1q32.1) ، إذ يتم نقل هرمون GnRH بالأوعية الدموية تحت المهادية النخامية البوابية portal system ليؤثر على خلايا الجزء الأمامي للنخامية والتي تستجيب لتفرز كل من الهرمونيين LH و FSH (Popa *et al*., 2008) .

وان انخفاض تركيز هرمون GnRH اثر بصورة مباشرة على الفص الأمامي للغدة النخامية مما ثبط من إفرازها للهرمونيين LH و FSH ، إذ يعملان بالتحكم بعملية بناء الكوليسترول Cholestrol synthesis من خلال الارتباط بالبروتين G (G-protein) والكوليسترول تعد الجزيئة الأساسية في بناء الستيرويدات Steroidogenesis (Rosati *et al*.,2011) ، لذا فان انخفاض إنتاج كل من LH وFSH يسبب بتثبيط عملية بناء الكوليسترول وعملية نقل أسترات الكوليسترول إلى الأنسجة المكونة مما يؤدي إلى انخفاض الكوليسترول في الخلايا المكونة للستيرويدات وهذا يسبب انخفاض تركيز هرمون الشحمون الخصوي (الخفاجي , 2015).

جدول (2-4) يوضح تأثير صبغة الشوكولاتة البنية Chocolate Brown HT E155على معدل تراكيز هرمون GnRH بيكو غرام / ملي لتر (pg/ml) والهرمون المحفز للجريب FSH ملي وحدة دولية / ملي لتر (mlu/ml) والهرمون اللوتيني LH ملي وحدة دولية / ملي لتر (mlu/ml) وهرمون الشحمون الخصوي Testosterone نانو غرام /ملي لتر (ng/ml) لذكور الجرذان البيض لمدة 60 يوم .

الهرمونات / المجاميع	GnRH (pg/ ml)	FSH (mlu/ml)	LH (mlu/ml)	Testosterone (ng/ml)
السيطرة C	219.64±6.15 A	0.184±0.0147 A	0.388±0.058 A	10.40±0.27 A
المعاملة الاولىT1 200 mg/kg	183.50±15.65 B	0.146±0.0051 B	0.346±0.0051 B	8.72±0.67 B
المعاملة الثانيةT2 400 mg/kg	161.50±13.08 C	0.124±0.0051 B	0.336±0.0116 B	3.62±0.096 C
LSD	3.10	0.0229	0.0196	1.125

- **C تمثل مجموعة السيطرة تضم الحيوانات التي جرعت ماء الشرب الاعتيادي طيلة فترة التجربة.**
- **T1 تمثل مجموعة الاولى جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **T2 تمثل مجموعة المعاملة الثانية جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **الأرقام تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية والحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروق معنوية**

3-4 مضادات الأكسدة والمؤكسدات Antioxidant and Oxidation

يعتبر مركب Malondialdehyde (MDA) الناتج النهائي لأكسدة الدهون الفوقية والذي يمتلك سمية عالية ويقلل من فعالية مضادات الأكسدة لذلك يكون علامة مهمة على فعالية الجذور الحرة و من أهم المؤشرات على وجود زيادة في الإجهاد التأكسدي وتلف في أنسجة الجسم ' وقد لوحظ أن جزيئة MDA لها القدرة على التفاعل مع الجزيئات الحيوية مثل DNA والبروتينات مما يؤدي إلى تلف الخلايا وكذلك إلى حدوث الطفرات (Gopal *et al*., 2012; Berryman *et al*., 2005; Del Rio *et al*., 2005).

أوضحت نتائج هذه الدراسة بالنسبة لذكور الجرذان المعاملة بصبغة الشوكولاته (الجدول 4-3) حصول ارتفاع معنوي (P<0.05) بتركيز المالوندايالديهايد (MDA) و اوكسيد النتريك (NO) في حيوانات المعاملة (T1) و(T2) مقارنة مع مجموعة السيطرة (C)، كما بينت النتائج حصول ارتفاع معنوي(P<0.05) بتركيز (MDA) في (T2) بالنسبة إلى (T1) وعدم وجود فرق معنوي (P>0.05) بين (T1) و(T2) بالنسبة لتركيز اوكسيد النتريك (NO) ، بالعكس من ذلك أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً (P<0.05) في مستوى إنزيم كاتالايز Cat لكل من (T1) و(T2) مقارنة مع مجموعة السيطرة (C)،كما انخفض مستوى الإنزيم في (T2) عن مستواه في (T1) ، كما بينت النتائج

إن الإجهاد التاكسدي يزداد بزيادة تركيز الصبغة ، وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصل له (Hassan and Salman,2017) إذ سجلت دراستهم نتائج مماثلة في الحيوانات المختبرية المعاملة بصبغة الشوكلاته البنية، كما اتفقت النتائج مع كل من (Gao *et al*.,2011; Amin *et al*., 2010 ; Bawazir , 2016; 2017 , فجر)، وجميع هذه الدراسات أكدت ان صبغات الازو الصناعية لها تأثير مماثل مع صبغة الشوكلاته البنية من ناحية زيادة تركيز MDA والجذور الحرة مثل أوكسيد النتريك NO وانخفاض الإنزيمات المضادة للأكسدة بما فيها إنزيم الكاتليز Cat . قد يعزى سبب ارتفاع تركيز MDA بان صبغات الآزو بعد تناول الأغذية الحاوية عليها يتم اختزالها بشكلٍ كامل في الكبد إلى أمينات أروماتية وهذه المركبات تتأكسد بوجود إنزيمات الأكسدة إلى مشتقات N-hydroxy والتي تتفاعل مع الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة polyunsaturated fatty acid الموجودة في أغشية الخلايا وبسبب التفاعلات المتسلسلة للجذور الحرة تتكون هيدروبيروكسيدات الدهون Lipid hydroperoxides التي تتفكك بدورها لتكون مركبات أخرى مثل المالوندايالديهايد Malondialdehyde (MDA) كناتج لعملية بيروكسدة الدهون (Halliwell and Gutteridge,2015; Fijer and Al-Mashhedy, 2012) ، كما ان زيادة تركيز MAD ربما ناتج من زيادة استهداف الجذور الحرة للأحماض الدهنية في أغشية الخلايا مما يؤدي إلى فقدها لوظيفتها ومن ثمَّ موتها (Demirkol *et al*., 2012). فضلا عن ذلك ، يمكن للأمينات العطرية الناتجة عن ايض الصبغات إن تثبط إنزيم Xantine oxidase الذي يعد الانزيم الرئيس لمنع حدوث عملية بيروكسدة الدهون ويحمي اغشية الخلايا والمايتوكوندريا من إضرار الجذور الفعالة (Stoddart and Levine, 1992; Combes and Haveland-Smith , 1982) .

من جانب أخر، قد ترتبط زيادة مستويات NO في مجموعة الجرذان التي جرعة بالصبغة نتيجة لايض الصبغات وحدوث الإجهاد التأكسدي بزيادة كمية أنواع الأوكسجين الفعالة (ROS) و أنواع النيتروجين الفعالة (RNS) من خلال التفاعل بين الأمينيات العطرية و مجموعة النيتريت أو النترات التي توجد في الغذاء ينتج جذور البيروكسيدالهيدروجين H_2O_2 و النيتروز أمين nitrosamine الذي يولد أوكسيد النيتريك (NO) (Sindelar and Milkowski , 2012; Sasaki *et al*., 2002) ، كذلك أكد Amin وجماعته (2010) على دور البكتيريا المعوية في العمليات الايضية عن طريق التفاعل بين مجموعة الأمين للأمينات العطرية مع النتريت أو النترات الحاوي عليها الغذاء لإنتاج الجذور الفعالة ، كما تسبب الجذور الحرة إصابات واسعة النطاق لهياكل الخلايا عن طريق مهاجمة الحمض النووي والبروتينات وتعد من أهم أسباب الإمراض (Selvakumar *et a*l.,2006;Bansal *et al*.,2005) ،

إلى جانب ذلك فان ارتفاع مستوى NO و MDA للحيوانات المعاملة بالصبغة للمجموعة (T2) عن (T1) ذلك يوضح زيادة الإجهاد التأكسدي بزيادة الجرعة المعطاة للحيوانات كما ان NO و

MDA لأتعد علامة مهمة للحالة التأكسديه فقط بل هي علامة واضحة لعدم التنظيم لمضادات الأكسدة (Carocho and Ferreira, 2013). وبالمقابل انخفاض في مستوى إنزيم الكاتالايز Cat والذي يعد من أهم مضادات الأكسدة مما يؤكد استهلاكه بسبب الإجهاد التاكسدي وزيادة في تركيز الجذور الحرة وكلما زاد التركيز للصبغة قل مستوى الإنزيم مما يؤكد زيادة الأكسدة بزيادة تركيز الصبغة وكما موضح في الجدول (4-3) . كما اشار بعض الباحثين ان الجذور الحرة الناتجة من أكسدة الأحماض الدهنية في أغشية الخلايا بسبب الصبغات الغذائية ومنها صبغات (Azo) تؤدي إلى استهلاك كميات كبيرة من مضادات الأكسدة التي تعمل على حماية الخلايا من تاثير الجذور الحرة ومن ثمَّ انخفاض تركيز مضادات الأكسدة في الدم (Soltan and Shehata, 2012; Amin *et al*., 2010).

الجدول (4-3) يوضح تاثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155على بعض المعايير الكيموحيوية في ذكور الجرذان البيض لمدة 60 يوم .

المعايير / المجاميع	تركيز MDA (µmol/L)	كاتالايز Catalase (U/ ml)	NO (µmol/L)
السيطرة C	0.238±0.031 C	1.63±0.08 A	13.55±0.39 B
المعاملة الاولىT1 200 mg/kg	0.408±0.25 B	1.078±0.09 B	15.60±0.83 A
المعاملة الثانيةT2 400 mg/kg	0.430±0.016 A	0.63±0.05 C	17.00±1.01 A
LSD	0.0061	0.20	1.99

- **C تمثل مجموعة السيطرة تضم الحيوانات التي جرعت ماء الشرب الاعتيادي طيلة فترة التجربة.**
- **T1 تمثل مجموعة الاولى جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **T2 تمثل مجموعة المعاملة الثانية جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **الأرقام تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية والحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود فروق معنوية .**

4-4 التغيرات في معالم النطف Change of Characteristics of sperm

سجلت نتائج الدراسة الحالية ومن خلال التحليل الإحصائي وبحسب الجدول (4-4) انخفاض معنوي (P<0.05) في تركيز النطف ، النسبة المئوية للنطف المتحركة ، النسبة المئوية للنطف السوية و النسبة المئوية لعيوشة النطف في مجاميع الحيوانات المجرعة للصبغة (T1) و(T2) عن مجموعة السيطرة (C) ، كذلك أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في تركيز النطف ، النسبة المئوية للنطف السوية و النسبة المئوية لعيوشة النطف في مجموعة المعاملة (T2) عند مقارنتها مع (T1) في حين لم يظهر اي فرق معنوي(P>0.05) بين مجموعتي المعاملة بالنسبة المئوية للنطف المتحركة .

واتفقت هذه النتائج مع (Gautam *et al*.,2010;Biswas and Khuda-Bukhsh, 2005; Mathur *et al*., 2005) إذ أظهرت هذه الدراسات حصول انخفاض في تركيز النطف وحركتها وانخفاض نسب النطف الحية والسوية للحيوانات المعاملة بصبغات ازو الاصطناعية ، حيث يعد تركيز النطف من المعالم المهمة التي تعطي دليل واضحا عن وظيفة الخصية و طبيعة السائل المنوي (Ezer and Robaire ,2002) . وقد يعزى سبب انخفاض تركيز النطف إلى حصول اجهاد التاكسدي الذي يعتبر من أهم الأسباب التي تؤدي إلى قلة تركيز النطف والتي قد تسبب العقم في الذكور (Alonso *et al*., 2009) ، كذلك قد يعزى سبب انخفاض إعداد النطف إلى الجذور الحرة المتولدة بسبب الصبغات الازو ومنها صبغة شوكولاته حيث تعمل الجذور الحرة على زيادة أكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة في أغشية الخلايا المبطنة للنبيبات المنوية وتؤدي إلى موتها ومن ثمَّ حدوث خلل في عملية تكوين النطف (Dessouki *et al*.,2013).

من جانب أخر، إن انخفاض تركيز هرمون الشحمون الخصوي الذي أظهرته نتائج الدراسة الحالية في مجموعتي المعاملة (T1) و(T2) اثر بشكل واضح على عملية تكوين النطف وانقسامات الخلايا الجرثومية في بطانة النبيبات المنوية ، كما أَنَّ للهرمون دور مهم في نضج النطف ، كذلك الإضرار النسيجية في الخصى والبرابخ ساعد في خفض تركيز إعداد النطف (Ali *et al*.,2011) . وكما لوحظ من خلال نتائج الدراسة الحالية حصول اضطراب في محور تحت المهاد - نخامية- خصية hypothalamic-anterior pituitary- testis axis والانخفاضات التي سجلت بالنسبة لتركيز هرمون GnRH المفرز من تحت المهاد في مجموعتي المعاملة (T1) و(T2) وهو المنبه للفص الأمامي من النخامية لإفراز الهرمونيين LH و FSH المحفزان للمناسل وكان تركيزهما قد انخفض أيضا واثر على الإفرازات الأخرى كهرموني النمو والبرولاكتين وهذه الاضطرابات كان لها دور مهم ومؤثر بشكل كبير على أنسجة وخلايا الخصى والبرابخ وخصوصا خلايا لايدك وخلايا سرتولي مما سبب خلَلاً في عملية تكوين النطف وإنضاجها (Blanco-Munoz *et al*.,2010) .

إلى جانب ذلك، يمكن تفسير انخفاض تركيز النطف بسبب انخفاض تركيز هرمون الشحمون الخصوي حيث أكده الحميداوي (2006) في دراسة تأثير فيتامين C على خصوبة ذكور خنازير غينيا والذي فسر زيادة تركيز النطف بسبب زيادة تركيز هذا الهرمون ، وبالمقابل فان انخفاض تركيز الهرمون يؤدي إلى نقصان أعداد أرومات النطف وانخفاض في تركيز النطف كما وضحه Handelsman وجماعته (1999) في دراسته على ذكور الفئران .

من جهة أخرى، أن حركة النطف ونشاطها تعتبر من أَهم العوامل التي يمكن من خلالها معرفة القدرة التخصيبية للذكور وان إي خلل في نشاط النطف يمنعها من أحداث الإخصاب حتى لو لم يكن هناك نقص في أعدادها (Morales *et al*.,1988) ، وقد يعزى سبب قلّة حركة النطف ونشاطها في هذه الدراسة إلى قلة تجهيز سوط النطفة والمسؤول عن الحركة بالطاقة ATP بسبب تأثير الصبغة على وظيفة المايتوكوندريا وإنتاج الطاقة والايض (Reyes *et al*. , 1996) ، إلى جانب ذلك إن

إنزيم الاستيل كولين ستريز AchEh acetyl-cholinesterase المهم في حركة النطف ونشاطها يثبط هذا الإنزيم بفعل تأثير صبغات الازو مما ينعكس سلبا على نشاط النطف وحركتها (Kaur and Kaur,2015). كذلك من الممكن يكون للجذور الحرة والتي تولدت بفعل الصبغة تأثير سلبي واضح على نشاط وحركة النطف لأنها تسبب اختزال نشاطها وضعف حركتها (Sargazi *et al*.,2015) ، كما إن للأيونات المعدنية دور مهم في حركة النطف وذلك ما أكده Roblero وجماعته (1988) بعد إن تم حضن النطف في مستنبت يحوي على ايونات البوتاسيوم مما أدى إلى زيادة معنوية في النسبة المئوية للنطف المتحركة ، وبالاتجاه نفسه قد يكون السبب بانخفاض النسبة المئوية للنطف المتحركة هو ارتباط الجذور الحرة مع الايونات المعدنية مثل ايونات الحديد والبوتاسيوم والكالسيوم الضرورية لحركة النطف (العنبكي ،2018) .

بالإضافة إلى ذلك، سجلت نتائجنا زيادة واضحة في تشوهات النطف وانخفاض النسبة المئوية للنطف السوية والعيوشة للحيوانات المجرعة للصبغة الشوكولاته حيث وضح Hassan (2010) إن لصبغة الشوكلاتة البنية تأثير سلبي على DNA وهذا يتسبب في تغيرات مورفولوجية للخلايا مما يؤدي إلى تشوهها وموتها ، كذلك توصل Sayed وجماعته (2012) بدراسة على ذكور الفئران إن صبغة غروب الشمس الصفراء (إحدى صبغات الازو) تسبب انحرافات في الكرموسومات في كل من الخلايا الجسدية والخلايا الجرثومية وتجزئة الحمض النووي مما يؤدي إلى حدوث تشوهات مورفولوجية للحيوانات المنوية ، كما أشار Ali وجماعته (2016) إلى أن وجود نطف غير سوية (مشوهة) في السائل المنوي يعطي دليل واضح على سمية صبغة التتترازين الغذائية والتي هي احد أنواع صبغات الازو ، وربما يعزى سبب انخفاض النسبة المئوية للنطف السوية والعيوشة إلى الضرر الذي يسببه الإجهاد التأكسدي على بيوت الطاقة التي توجد في القطعة الوسطية للنطفة وتؤثر سلبا على إنتاج الطاقة مما يزيد من موت و تشوه النطف (Taib *et al*.,2013) ، كما إن الإضرار النسيجية للخصى والبرابخ وتدمير خلايا لايدك والإضرار في بطانة النبيبات المنوية كل ذلك يسبب تسارع الموت المبرمج للخلايا النطفية الطبيعية (Gray *et al*.,1992) ، فضلا عن ذلك، إن عملية تكوين النطف ونضجها تحتاج إلى تآزر العديد من الهرمونات مثل FSH و LH كذلك البرولاكتين وهرمون النمو وجميعها تفرز من الفص الأمامي للغدة النخامية وكذلك ما تفرزه الخصية من هرمون الشحمون الخصوي (Blanco-Munoz *et al*.,2010) ، وان نتائج الدراسة الحالية سجلت انخفاض في اغلب تراكيز هذه الهرمونات ونتيجة لذلك انخفضت النسبة المئوية للنطف السوية والعيوشة .

جدول (4-4) يبين تأثير صبغة الشوكولاتة البنية Chocolate Brown HT E155على بعض معاير

الخصوبة في ذكور الجرذان البيض لمدة 60 يوم .

المعايير / المجاميع	تركيز النطف (مليون/مللتر)	النسبة المئوية للنطف المتحركة %	النسبة المئوية للنطف السوية %	النسبة المئوية للنطف العيوشة %
*السيطرة C	105.00±4.00 B	93.00±0.94 A	90.6±0.812 A	82.4±0.812 A
المعاملة الأولىT1 200 mg/kg	70.00±1.50 B	58.80±2.87 B	71.8±1.39 B	73.4±1.12 B
المعاملة الثانيةT2 400 mg/kg	54.00±3.70 A	51.80±4.24 B	53.4± 1.43 C	55.0±0.83 B
LSD	8.27	7.57	5.33	2.27

- **C تمثل مجموعة السيطرة تضم الحيوانات التي جرعت ماء الشرب الاعتيادي طيلة فترة التجربة.**
- **T1 تمثل مجموعة الاولى جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **T2 تمثل مجموعة المعاملة الثانية جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **الأرقام تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية والحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروق معنوية .**

5-4 التغيرات في المعايير الدمية Changes of Hematological Parameters

سجلت نتائج الدراسة الحالية (الجدول 4-5) وجود ارتفاع معنوي (P<0.05) في أعداد خلايا الدم البيض WBC للمجاميع المعطاة للصبغة (T1) و(T2) بالنسبة إلى مجموعة السيطرة (C) ، وعدم وجود فرق معنوي (P>0.05) بين (T1) و(T2) .

كذلك وضح (الجدول 4-5) حصول انخفاض معنوي (P<0.05) في تركيز هيموغلوبين الدم Hb وحجم الخلايا المرصوص Hct في كل من مجموعتي المعاملة (T1) و(T2) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (C) ، ولم يوجد فرق معنوي (P>0.05) بين (T1) و(T2) . في حين كان هنالك انخفاض معنوي (P<0.05) في إعداد كريات الدم الحُمْر RBC بالنسبة لمجموعة المعاملة الثانية (T2) عن مجموعة السيطرة ، والانخفاض كان غير معنوي (P>0.05) بالنسبة لمجموعة المعاملة الأولى (T1) عن مجموعة السيطرة (C) . إما بالنسبة لمعدل حجم كريات الدم الحُمْر MCV كان هناك فروق

معنوية (P<0.05) بانخفاضها في دم الحيوانات المجرعة بالصبغة (T1) و(T2) عن معدلها في مجموعة السيطرة (C) ، وكان الانخفاض غير معنوي (P>0.05) في (T2) بالنسبة (T1) .

وجاءت النتائج بالنسبة لارتفاع العدد الكلي لخلايا الدم البيض WBC للجرذان المجرعة بصبغة الشوكولاته البنية متفقة مع دراسة (Sharma *et al*.,2005) حول تأثير نفس الصبغة وكذلك اتفقت مع (Bawazir , 2016; Basu and Kumar, 2015: Soltan and Shehata , 2012) الذين درسوا تاثيرات صبغات غذائية اخرى على صورة الدم ،في حين اختلف مع (Al-Shinnawy and Elkattan, 2013; Al-Shinnawy, 2009) اذ وجدا تأثيرا غير معنويا لصبغات الازو على العدد الكلي لخلايا الدم البيض. وقد يعزى سبب هذا الارتفاع في خلايا الدم البيض WBC الذي سجل في الدراسة الحالية كاستجابة للجهاز المناعي على الحالة الالتهابية إذْ أثبتا Soltan and Shehata (2012) إن الملونات الغذائية تغير في التركيب النسيجي للكبد والكلى وتسبب اضطراب الجهاز المناعي والالتهاب الحاد نتيجة لموت الخلايا من قبل الجذور السامة والإجهاد التأكسدي وانخفاض في الإنزيمات المضادة للتأكسد ، كما إن صبغات الازو تتسبب في إضرار نسجية للكبد و وزيادة تركيز أنزيماتها (ALP) و (ALT) وهذا يؤدي إلى زيادة في كريات الدم البيضاء (Al-Shinnawy,2009) ، وقد ينعكس تأثير الصبغات على الطحال وما له من أهمية في إنتاج خلايا الدم البيض وبالأخص في الفئران والجرذان إذ يقوم الطحال بإنتاجها طيلة حياة الحيوان (Sty and Conway ,1985) .كما لاحظ Moutinho وجماعته (2007) إن صبغة التترازين تسبب التهاب و زيادة أعداد الخلايا اللمفاوية وخلايا الحمضة في بطانة المعدة .

من جانب أخر ،ان أعداد كريات الدم الحُمْر R B C ونسبة الهيموغلوبين في الدم Hb ونسبة حجم الخلايا المرصوص Hct ومتوسط حجم الكرية الحمْراء MCV وجميع هذه المعايير قد انخفضت في دم الحيوانات المختبرية المعطاة للصبغة ، وهذا يتفق مع (Al-Shinnawy,2009 ; Aboel-Zahab *et al*., 1997) ، ولعل سبب ذلك هو إن عملية تكوين كريات الدم الحُمْر erythropoisis في نقي العظم يتم تثبطها بفعل الإجهاد التاكسدي الناتج من تأثير الصبغة (Al-Shinnawy and Elkattan., 2013) ، كما إن لخلايا نخاع العظم مَزِيَّة انقسامات سريعة الأمر الذي يجعلها قادرة على أتناج خلايا الدم من جهة وتكون أكثر عرضة للتأثر بالسمية الخلوية الناتجة عن الإجهاد التأكسدي من جهة أخرى (Amin *et al*.,2010) ، ومن المحتمل إن تعمل الجذور الحرة على تحلل الهيموغلوبين مما يؤدي إلى ترسبه على جوانب الكريات الحُمْر إذ تشكل أجسام صغيرة تدعى أجسام هاينز Heinz body وهذه الأجسام تلتصق بالغشاء الداخلي للكريات الحُمْر وتقلل من مرونة الغشاء وبذلك تؤدي إلى انحلال الغشاء داخل الأوعية الدموية وتسمى هذه الحالة الانحلال داخل الأوعية الدموية intravascular haemolysis (Kumar *et al*.,2009) ، كما يمكن لأصناف الأوكسجين الفعال من أكسدة مجاميع الكبريت (-SH) في السلسلة الببتيدية لبروتين الهيموغلوبين وتوليد أواصر ثنائية الكبريت (Desnoyers, 2000)، وأكسدة الحديدوز Fe^{+2} إلى الحديديك Fe^{+3} الذي يكون أقل قابلية

لنقل الاوكسجين ، فضلا عن ذلك فأن الجذور الحرة (المتولدة بفعل الصبغة) تهاجم أغشية كريات الدم الحمر وتحطمها وتقوم بأكسدة الدهون غير المشبعة المكونة لها مسببة بيروكسيدة الدهون و محدثتاً خللاً وظيفياً لخلايا الدم ونقصاً في كمية الهيموغلوبين (Hb) في الدم (Lachili *et al*., 2001) ، ومن خلال ما توصلا إليه (Hassan and Selman,2017) من تغيرات نسيجية مرضية في المعدة والأمعاء بسبب تأثير هذه الصبغة قد ينتج عن ذلك نقص في البروتينات الغذائية ومن ثم نقص في بروتينات الدم وهذا يعد من الأسباب المهمة في نقص الهيموغلوبين وأعداد الكريات الدم الحُمْر ، ونتيجة لنقص أعداد كريات الدم الحُمْر وصبغة الهيموغلوبين يحدث نقص في نسبة الكريات الحُمْر ومعدلات حجمها ، إن متوسط حجم كريةMCV تميز أنواع فقر الدم و انخفاض نسبة حجم الخلايا المرصوص Hct تعتبر مؤشر واضح على حدوث فقر الدم (العبدالله ،2012) وهذا ما أكده Bawazer (2016) إذ سببت صبغة اللورا الحمْراء حدوث فقر الدم للحيوانات المجرعة ، وقد يعزى سبب انخفاض Hct وMCV إلى انخفاض نسبة الهيموغلوبين Hb داخل الكريات الحُمْر وتأثيرها المباشر على حجمها .

الجدول(4-5) يوضح تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155على بعض المعايير الدمية في ذكور الجرذان البيض لمدة 60 يوم.

المجاميع	العدد الكلي لخلايا الدم البيضWBC ($\times 10^6$) خلية/ملم^3	العدد الكلي لخلايا الدم الحمراء ( )RBC $\times 10^6$ كرية/ملم^3	تركيز الهيموغلوبين (g/dl) Hb	حجم الخلاية المرصوص % Hct	معدل حجم كريات الدم الحمراء MCV
السيطرة C	13.71±0.28 B	8.28±0.28 A	13.50±0.39 A	43.54±0.89 A	54.86±0.47 A
المعاملة الاولىT1 200 mg/kg	19.44±1.05 A	7.79±0.19 A	12.26±0.081 B	40.26±0.47 B	51.72±0.97 B
المعاملة الثانيةT2 400 mg/kg	21.48±1.48 A	6.95±0.31 B	11.98±0.59 B	39.58±0.81 B	52.98±0.58 B
LSD	2.68	0.68	1.06	3.18	1.79

- **C تمثل مجموعة السيطرة تضم الحيوانات التي جرعت ماء الشرب الاعتيادي طوال مدَّة التجربة.**
- **T1 تمثل مجموعة الاولى جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **T2 تمثل مجموعة المعاملة الثانية جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **الارقام تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**

- **الحروف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية والحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروق معنوية**

6-4 القياسات النسجية Histological measurements

1-6-4 التغيرات النسجية في الخصى والبرابخ Change in Histological of Testis and Epididymis

إن تقييم التغيرات التي تحدث في الأعضاء التناسلية نتيجة التجريع بالصبغات الغذائية تعد مؤشرا مهما لمعرفة التأثيرات السلبية لهذه المواد ، ويتم ذلك من خلال دراسة التغيرات النسجية وأرتباطها الوثيق بوظيفة الأعضاء المتضررة (Luster *et al*.,1988) .

فقد أظهرت نتائج الفحص النسيجي للمقاطع المأخوذة من الأعضاء المدروسة (الخصية والبربخ) لحيوانات المعاملة والسيطرة وكما موضحة بالجدول (4-6) وشكل (4-1) و (4-2) على التوالي انخفاض معنوي ($P<0.05$) في أقطار النبيبات المنوية للخصية و سمك الطبقة الجرثومية germinal layer المبطنة لها في الجرذان المعاملة بالصبغة (T1) و(T2) عند مقارنة مع مجموعة السيطرة وكذلك وحصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في مجموعة المعاملة (T2) بالنسبة لمجموعة المعاملة (T1) .

إما بالنسبة لنبيب البربخ فقد بينت النتائج في الجدول (4-6) حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل قطر انيبيب البربخ وسمك الطبقة الطلائية المبطنة له لمجموعتي المعاملة (T1) و(T2) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (C) وكذالك انخفاض معنوي ($P<0.05$) في مجموعة المعاملة الثانية(T2) بالنسبة لمجموعة المعاملة الأولى(T1) وكما موضحة بشكل (4-3) و (4-4) على التوالي.

ولقد اتفقت هذه النتائج مع دراسة كل من (Mahmoud , 2006 ; Suryavathi *et al*.,2005) ولعل من أهم الأسباب التي أدت إلى انخفاض أقطار النبيبات المنوية وسمك الطبقة الجرثومية المبطنة لها في الخصى و قطر نيبيب البربخ وسمك الطبقة الطلائية المبطنة له هو الإجهاد التأكسدي و إنتاج الجذور الفعالة بسبب الصبغة كما وضحت الدراسة الحالية وهذا يؤثر على الفعاليات الأساسية للأعضاء التناسلية بسبب تراكم الصبغة في هذه الأعضاء ، حيث تعمل الجذور الفعالة بتثبيط إنزيمات السلسلة التنفسية من خلال التأثير على وظيفة المايتوكوندريا وبذلك تحدث تغيرات نسجية مرضية في الخصى والبرابخ وتحطم نسيجي لها (العنبكي ، 2018) ، كما أكد Sjoblom وجماعته (1998) إن الجذور الحرة تسبب تلف للخلايا الظهارية في الأعضاء التناسلية مما يؤدي إلى انكماشها . كما إن الإجهاد التاكسدي يسرع الموت المبرمج للخلايا المكونة للطبقة الظهارية للخصية مما يؤثر على تكوين النطف (Freitas *et al*.,2002). كذالك أشار Heikal وجماعته (2012) إن أغشية خلايا الأعضاء التناسلية تحتوي على نسبة عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة مما يجعلها اكثر عرضه للأكسدة بعملية بيروكسدة الدهون ومن ثمَّ موت خلاياها وتضرر أنسجتها وحصول ضمور بها.

من جانب أخر ، إن انخفاض تراكيز هرمونات النخامية FSH و LH وهرمون التيستستيرون التي سجلتها الدراسة الحالية أدى إلى تثبيط الفعاليات البنائية التي تقوم بها هذه الهرمونات وقد يرافق ذلك تغيرات نسجية مرضية في الأنسجة الظهارية المولدة في النيبيبات المنوية للخصية وكذلك الطبقة المبطنة للبربخ إذ إن نمو هذه الأنسجة يعتمد على الاندروجينات ومن أهمها هرمون الشحمون الخصوي الذي تنتشر مستقبلاته في الطبقة الظهارية الجرثومية المبطنة للنبيبات الناقلة للمني في هذه الأعضاء (Blanco-Munoz *et al*.,2010; 2006 ، الحميداوي ;Turner and Bagnar , 1976) .

بالإضافة إلى ذلك ، ربما يعود سبب هذه التغيرات النسيجية في الخصية والبربخ إلى تنشيط إنزيم Caspase نتيجة للإجهاد التاكسدي ، وذلك لان هذا الإنزيم يعتبر الإنزيم الرئيس في مسار Mitochondria – dependent – caspase وهو المسار المسؤول عن نقل الإشارة الخلوية لبدء عملية الموت المبرمج للخلايا وتعد الخلايا النطفية حديثة الانقسام من بين الخلايا الأكثر حساسية لذلك ، كما تقوم الجذور الحرة بتنشيط فعالية Nitric – oxide- synthase الذي يؤثر على الحامض الاميني L-arginine المسؤول عن معظم الوظائف البيولوجية ، مِمَّا يسبب تغيراً في الوسائط الالتهابية وتحطم الخلايا (Abdel-Raheem and Abdel-Ghany , 2009).

جدول (4-6) يوضح تأثير صبغة الشكولاتة البنية Chocolate Brown HT E155على معدل أقطار النبيبات المنوية للخصى ونبيبات البرابخ (مايكرومتر) وعلى سمك الطبقة المبطنة للنبيبات للخصى والبرابخ (مايكرومتر) لذكور الجرذان البيض لمدة 60 يوم .

المجاميع	اقطارالنبيبات المنوية للخصى (مايكرومتر)	سمك الطبقة الجرثومية للخصى (مايكرومتر)	أقطار نبيبات البرابخ (مايكرومتر)	سمك الطبقة المبطنة لنبيبات البرابخ (مايكرومتر)
السيطرة C	260.40±0.67 A	55.60±0.66 A	148.20±1.06 A	24.00±1.37 A
المعاملة الاولىT1 200 mg/kg	257.60±0.87 B	46.00±0.44 B	133.40±1.32 B	18.80±0.86 B
المعاملة الثانيةT2 400 mg/kg	249.48±0.40 C	43.80±0.37 C	121.60±1.53 C	16.00±0.89 C
LSD	1.74	1.28	3.29	2.66

- **C تمثل مجموعة السيطرة تضم الحيوانات التي جرعت ماء الشرب الاعتيادي طوال مدَّة التجربة.**
- **T1 تمثل مجموعة الاولى جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **T2 تمثل مجموعة المعاملة الثانية جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**

- **الارقام تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة تشير إلى وجود فروق معنوية والحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروق معنوية .**

2-6-4 قياس معدل أعداد خلايا المنشأة للنطف وخلايا لايدك Rate number of spermatogenic cells and leydig cells

إن معاملة ذكور الجرذان البيض بصبغة الشوكلاتة البنية أدى إلى حدوث تلف في أنسجة الخصى والبربخ وحصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل أعداد سليفات النطف Spermatogonia ، معدل أعداد الخلايا النطفية Spermatocyte ، معدل أعداد ارومات النطف Spermatid و معدل خلايا لايدك Leydig cells في مجموعة المعاملة (T1) والمجموعة (T2) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (C) وكذلك انخفاض معنوي ($P<0.05$) لمجموعة (T2) بالنسبة لمجموعة (T1) كما موضحة في الجدول (4-7) والشكلين (4-5) و(4-6) على التوالي .

اتفقت هذه النتائج مع (Fernandes *et al*.,2015; Mahfouz and Moussa 2015; Visweswaran and Krishnamoorthy, 2012) في دراسات مماثلة إذ لاحظوا انخفاض معدلات هذه الخلايا في الحيوانات المختبرية المعاملة بصبغات ازو الغذائية المختلفة ، وقد يعزى سبب الانخفاض إلى إتلاف المكونات الخلوية للحيوانات المنوية كالبروتينات والدهون وتضرر أغشيتها أو عن طريق التأثر على DNA الخلايا واختلاف في توازن الطاقة بتأثير الصبغة على المايتوكوندريا وهذا يعرقل نشأة النطف ومراحل انقسامها مما يسبب موتها (Agarwal *et al*.,2016 ;Suryavathi *et al*.,2005) ، كما أكد Bal وجماعته (2012) يمكن للجذور الحرة إن تسهمَ في انخفاض معدلات الخلايا المنشاة للنطف و ضعف الخصوبة الذكرية من خلال ضعف تخليق النطف باليات مختلفة منها إتلاف DNA والأكسدة الدهنية وأكسدة البروتينات وتثبيط إفراز الهرمونات المحررة GnRH والهرمونات السترويدية.

وقد يكون سبب هذه النتيجة هو تأثير الصبغة على إنزيم Topo II الذي يعمل على زيادة هجرة Polyamine وتقليل من تركيزه داخل الخلايا المهم في انقسام الخلايا وتمايزها مما يحفز إنزيم الهدم Spermidin/spermine-N1 acetyltransferase (SSAT) الذي يقوم بتثبيط النمو ويؤدي إلى موت الخلايا (Porter *et al*.,1991) ، كما إن الموت المبرمج للخلايا الجرثومية وخلايا لايدك وخلايا سرتولي تسبب في انخفاض أعداد الخلايا النطفية Spermatocyte ، وهذا يؤدي إلى الانخفاض في وظائف الخصية و تغيير النمط النسجي للعضو (Makhlouf *et al*.,2008) . ومن المحتمل إن الانخفاض الحاصل في معدلات الخلايا ناتج عن التنكس الذي أصاب خلايا لايدك بفعل الجذور الحرة مما أدى لزيادة تحطيمها وقلة عددها وبالمقابل انخفضت معدلات الخلايا المنشاة للنطف بسبب انخفاض

تركيز هرمون الشحمون الخصوي المفرز من خلايا لايدك و المهم في عملية نشأة النطف وبالأخص في مراحل تكوينها الأخيرة (Codelia *et al*.,2010).

وقد يعزى سبب الاختلاف الحاصل في معدلات الخلايا المنشاة للنطف هو انخفاض تركيز هرمون LH وحسب النتائج المسجلة للدراسة مما يتسبب في التأثير السلبي على نمو خلايا لايدك وعملها وبذلك ينخفض تركيز هرمون التيستستيرون المفرز منها ، كذلك انخفاض تركيز هرمون FSH مما يؤثر على خلايا سرتولي ودورها المهم في عملية نشوء النطف وتمايزها كما تمتلك هذه الخلايا على أغشيتها مستقبلات هرمون و التيستستيرون بذلك يكون الخلل واضحاً في تكامل هذه العملية ومعدلات الخلايا المنشاة للنطف لان هذه الهرمونات تعتبر أساسية في ديمومة عملية نشاة النطف والمحافظة على أعداد الخلايا المنشاة للنطف وان انخفاضها يؤدي إلى انخفاض سليفات النطف (Ganong, 2005; Mclachlan *et al*., 2002) . كما أكد Martin- du (2007) إن حصول اضطرابات في محور تحت المهاد - النخامية- الخصية يؤدي الى ضمور وركود في انسجة الخصية ومن ثمَّ انخفاض أعداد الخلايا المنشأة للنطف .

جدول(4-7) يوضح تأثير صبغة الشوكلاتة البنية Chocolate Brown HT E155على أعداد الخلايا المنشأة للنطف وخلايا لايدك لذكور الجرذان البيض لمدة 60 يوم .

المجاميع	سليفات النطف	الخلايا النطفية	اورمات النطف	معدلات خلايا لايدك
السيطرة C	73.60±0.60 A	106.00±1.64 A	160.40±0.50 A	20.80±0.58 A
المعاملة الأولى T1 200 mg /kg	68.60±0.74 B	99.80±0.96 B	154.80±1.31 B	15.80±0.73 B
المعاملة الثانية T2 400 mg/ kg	63.20±1.62 C	90.40±0.81 C	149.20±2.59 C	12.60±0.74 C
LSD	2.71	2.97	4.24	1.72

- **C تمثل مجموعة السيطرة تضم الحيوانات التي جرعت ماء الشرب الاعتيادي طوال مدَّة فترة التجربة.**
- **T1 تمثل مجموعة الاولى جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 200 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **T2 تمثل مجموعة المعاملة الثانية جرعت 1 مل من صبغة الشوكولاتة البنية بتركيز 400 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم طيلة فترة التجربة.**
- **الأرقام تمثل المعدلات ± الخطأ القياسي .**
- **الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية والحروف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فروق معنوية .**

الاستنتاجات Conclusions

من خلال النتائج التي أظهرتها الدراسة الحالية من الممكن التوصل للاستنتاجات الآتية:

1- أدت المعاملة بصبغة الشوكلاتة البنية إلى تثبيط محور تحت المهاد- النخامية - الخصية مما نتج عنه انخفاض مستوى تركيز هرمون GnRH من تحت المهاد وتثبيط الهرمونات المحفزة للأعضاء التناسلية FSH و LH من النخامية وانخفاض تركيز هرمون الشحمون الخصوي من الخصية .

2– إن لصبغة الشوكلاتة البنية تأثير سلبي واضح على الخصوبة في الذكور من خلال انخفاض تركيز النطف وتثبط حركتها وارتفاع في نسبة النطف المشوهة وانخفاض نسبة عيوشتها .

3- إن صبغة الشوكلاتة البنية تسببت في انخفاض مستوى الإنزيمات المضادة للتأكسد وحدوث الإجهاد التأكسدي وزيادة بيروكسدة الدهون .

4- أدت المعاملة بصبغة الشوكلاتة البنية إلى حصول تغيرات في بعض المعايير الدمية كارتفاع أعداد خلايا الدم البيض وانخفاض أعداد الكريات الحُمْر وكذلك انخفاض نسبة هيموغلوبين الدم وحجم الخلايا المرصوص وحجم الكرية الحُمْراء .

5- اظهرت الدراسة النسجية حدوث تغيرات نسجية في الأعضاء التناسلية نتيجة المعاملة بصبغة الشكولاتة البنية مما أدى إلى انخفاض أقطار النبيبات المنوية ، وقطر نيبيب البربخ وسمك الطبقة المبطنة لهما وانخفاض أعداد الخلايا المنشأة للنطف وخلايا لايدك .

التوصيات Recommendations

1- التقليل من استهلاك المواد الغذائية الحاوية على الصبغات الاصطناعية بشكل عام وصبغة الشوكلاتة البنية بشكل خاص بسبب تأثيراتها السلبية على أعضاء الجسم وأجهزته.

2- على مصنعي الأغذية التقليل من إضافة الصبغات الاصطناعية واستخدام بدائلها من الصبغات الطبيعية وذلك لأنها اقل ضرر على صحة الإنسان.

3. اجراء دراسة جزيئية لمعرفة تأثيرات صبغة الشوكلاتة البنية على DNA الخلايا النطفية .

4- اجراء دراسة جزيئية لمعرفة تأثيرات صبغة الشوكلاتة البنية على خلايا الغدة النخامية وتحت المهاد.

5- دراسة التأثير السلبي لصبغة الشوكلاتة البنية على الولادات الجديدة من خلال معاملة الإناث الحوامل من الحيوانات المختبرية بالصبغة.

.

المصادر العربية :

الحميداوي ، حسين عباس . (2006) . تأثير فيتامين C على الخصوبة في خنازير غينيا . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة القادسية .

الخفاجي ، اسيل نجاح . (2015) . تأثير بنزوات الصوديوم كمادة حافظة في مستويات بعض الهرمونات و المعايير الكيموحيوية في ذكور الجرذان البيض . أطروحة دكتوراه .كلية التربية . جامعة القادسية .

الراوي ، خاشع محمود . (2000) . مدخل إلى الإحصاء . الطبعة الثانيـــة ، كليـــة الزراعة والغابات، جامعة الموصل .

العبد الله ، شتيوي . (2012).علم وظائف الأعضاء. الطبعة الأولى. دار الميسرة للنشر والتوزيع والطباعة. عمان. 60-70.

العنبكي، علي عبد الامير مظلوم .(2018). التقييم الفسيولوجي للأثر ألتآزري للكيورستين والهسبردين في كفاءة الجهاز التناسلي الذكري للجرذان البيض المعاملة بالايتوبوسايد. أطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة القادسية.

فجر ،علي نوري . (2017) . دراسة تأثير الاصباغ الغذائية على محتوى الاجهاد التأكسدي ودور فيتاميني C و E في ذكور الجرذان. أطروحة دكتورا . كلية العلوم . جامعة بابل

الكناني، ليلى محمد زكي.(2001) . الغذاء وتغذية حيوانات المزرعة . دار الكتب للطباعة و النشر. جامعة بغداد. ج 2 .ص : 470-474.

محي الدين، خير الدين ؛ سيف، وليد حميد و حنة ، سعد حسين.(1990). فسلجة الغدد الصم والتكاثر في الثديات والطيور . دار الحكمة للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

المختار، كواكب عبد الرزاق ؛ العلاف، سهيلة محمود و العطار، عدنان عبد الله.(1982). التحضيرات المجهرية ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد .

المصادر الأجنبية :

Aboel-Zahab, H., El-Khyat, Z., Sidhom, G., Awadallah, R., Abdel-Al, W., &Mahdy, K. (1997). Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Bollettinochimicofarmaceutico*, *136*(10), 615-627.

Abdel-Aziz, K.B. and Al-Ashmawy, H. (1993). Detection of tartazine-toxic effects using different techniques, J. Egyp. Germ. Soc. Zool., 12(C): 171-183.

Abdel-Raheem, I. T., & Abdel-Ghany, A. A. (2009). Hesperidin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *J Egypt Natl Canc Inst*, *21*(2), 175-184.

Aebi, H. (1974). Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition), Volume 2* (pp. 673-684).

Agarwal, A., Cho, C. L., &Esteves, S. C. (2016). Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation?. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *28*(3), 164-171.

Aguilar, F., Charrondiere, U. R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., ... & Larsen, J. C. (2010). Scientific opinion on the re-evaluation of Brown HT (E 155) as a food additive. *EFSA J*, *8*, 1536-1567.

Ajiboye, T. O. (2012). Oxidative Insults of 2, 2-dichlorovinyl-dimethyl phosphate (DDVP), an Organophosphate Insecticide in Rats Brain. Fountain Journal of Natural and Applied Sciences, 1(1).

AL-Awady, M. A., & AL-Zamely, H. A. (2016). Effect of quercetin on gene expression of male hormone in adult Wistar rats exposure to the oxidative stress by lead acetate. *AL-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, *15*(2), 47-52.

Ali, K., Reza, N. G., Syamak, S., Aref, H., Ehsan, H., Leila, R., ... & Esmaiel, G. (2011). Protective effect of selenium on diazinon induced determination impact on the testes in mature male rats. *Global Vet*, *7*, 370-380.

Ali, F. A., Abdelgayed, A. S., EL-Tawil, S. O., & BaNeer, M. A. (2016). Toxicological and histopathological studies on the effect of tartrazine in male albino rats. *Int J Bio Biomol Agri Biotech Eng*, *10*(8), 473-8.

Allan, C. M., Kalak, R., Dunstan, C. R., McTavish, K. J., Zhou, H., Handelsman, D. J., & Seibel, M. J. (2010). Follicle-stimulating hormone increases bone mass in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(52), 22629-22634..

Alonso, V., Linares, V., Bellés, M., Albina, M. L., Sirvent, J. J., Domingo, J. L., & Sánchez, D. J. (2009). Sulfasalazine induced oxidative stress: a possible mechanism of male infertility. *Reproductive toxicology*, *27*(1), 35-40.

Al-Shinnawy, M. S. (2009). Physiological effect of a food additive on some haematological and biochemical parameters of male albino rats. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci*, *2*(1), 143-151.

Al-Shinnawy, M. S., &Elkattan, N. A. (2013). Assessment of the changes in some diagnostic parameters in male albino rats fed on an Azo Dye. *Int J Environ SciEng*, *4*, 85-90.

Alwachi,.S. N., Alkobaisi, M. F., Mahmoud, F. A.and Zahide, Z. R. (1986). Possible effect of nicotine on the spermatogenesis and teticular activity. Res.,17 : 185-194.

Amin, K. A., Hameid II, H. A., &Elsttar, A. A. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(10), 2994-2999.

Anand, S. P., & Sati, N. (2013). Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *4*(7), 2496.

Anderson, J. E., Farr, S. L., Jamieson, D. J., Warner, L., &Macaluso, M. (2009). Infertility services reported by men in the United States: national survey data. *Fertility and sterility*, *91*(6), 2466-2470.

Axnér, E., Linde-Forsberg, C., &Einarsson, S. (1999). Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology*, *52*(5), 767-778.

Bal, R., Naziroğlu, M., Türk, G., Yilmaz, Ö., Kuloğlu, T., Etem, E., & Baydas, G. (2012). Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function*, *30*(6), 492-499.

Bamba, K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*, *29*(6), 1245-1251.

Bancroft, J. D., Stevens, A., & Turner, D. R. (1996). Theory and practice of histological techniques: Churchill Livingstone New York. *the text*, 766.

Bansal, A. K., Bansal, M., Soni, G., & Bhatnagar, D. (2005). Modulation of N-nitrosodiethylamine (NDEA) induced oxidative stress by vitamin E in rat erythrocytes. *Human & experimental toxicology*, *24*(6), 297-302.

Basu, A., & Kumar, G. S. (2015). Interaction of toxic azo dyes with heme protein: biophysical insights into the binding aspect of the food additive

amaranth with human hemoglobin. *Journal of hazardous materials*, *289*, 204-209.

Bawazir, A. E. (2012). Effect of chocolate brown HT with olive oil on some neurotransmitters in different brain regions, physiological and histological structure of liver and kidney of male albino rats. *J EvolBiol Res*, *4*(1), 13-23.

Bawazir, A. E. (2016). Effects of Food ColourAllura Red (No. 129) on some neurotransmitter, Antioxidant Functions and Bioelement Contents of Kidney and Brain Tissues in male albino Rats. *Life Science Journal*, *13*(12).

Berryman, A. M., Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins III, J. B. (2005). Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol, β-carotene, and α-lipoic acid on parameters of oxidative stress. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *18*(6), 345-352.

Bhat, G. K., Mahesh, V. B., Lamar, C. A., Ping, L., Aguan, K., & Brann, D. W. (1995). Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin-releasing hormone neurons and co-localization with N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroendocrinology*, *62*(2), 187-197.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., &Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9.

Biswas, S. J., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2005). Cytotoxic and genotoxic effects of the azo-dye p-dimethylaminoazobenzene in mice: a time-course study. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *587*(1), 1-8.

Blanco-Muñoz, J., Morales, M. M., Lacasaña, M., Aguilar-Garduño, C., Bassol, S., & Cebrián, M. E. (2010). Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. *Human reproduction*, *25*(7), 1787-1795.

Caro, Y., Anamale, L., Fouillaud, M., Laurent, P., Petit, T., &Dufosse, L. (2012). Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. *Natural products and bioprospecting*, *2*(5), 174-193.

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(4), 377-399.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, *51*, 15-25.

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2015). Natural food additives: Quo vadis?. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 284-295.

Chatterjea, M. N., & Shinde, R. (2002). Serum enzymes in heart diseases. Textbook of Medical Biochemistry (5th ed.) Jappe brothers, New Delhi, Med. Publ. Ltd, 555-557.

Chanlon, S., Joly-Pottuz, L., Chatelut, M., Vittori, O., & Cretier, J. L. (2005). Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography. *Journal of Food Composition and Analysis*, *18*(6), 503-515.

Ciechanowska, M., Łapot, M., Mateusiak, K., & Przekop, F. (2010). Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reproductive biology*, *10*(2), 85-124.

Clasadonte, J., & Prevot, V. (2018). The special relationship: glia–neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nature Reviews Endocrinology*, *14*(1), 25.

Codelia, V. A., Cisterna, M., Alvarez, A. R., & Moreno, R. D. (2010). p73 participates in male germ cells apoptosis induced by etoposide. *Molecular human reproduction*, *16*(10), 734-742.

Combes, R. D., &Haveland-Smith, R. B. (1982). A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Research/Reviews in genetic toxicology*, *98*(2), 101-243.

Creemers, L. B., Den Ouden, K., Van Pelt, A. M., & De Rooij, D. G. (2002). Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertalspermatogonial cell culture. *Reproduction*, *124*(6), 791-799.

Cunningham, J. G. (2002). Control of ovulation and the corpus luteum. *Textbook of veterinary physiology. Philadelphia: WB Saunders*, 382-388.

Dacheux, J. L., Castella, S., Gatti, J. L., & Dacheux, F. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. Theriogenology, 63(2), 319-341.

Davies, K. J. (2000). An overview of oxidative stress. *IUBMB life*, *50*(4-5), 241-244.

De Campos Ventura-Camargo, B., & Marin-Morales, M. A. (2013). Azo dyes: characterization and toxicity–a review. *Textiles and Light Industrial Science and Technology*.

De Rooij, D. G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, *121*(3), 347-354.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, *40*(3), 173-289.

Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of

oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, *15*(4), 316-328.

Demirkol, O., Zhang, X., &Ercal, N. (2012). Oxidative effects of Tartrazine (CAS No. 1934-21-0) and New Coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells. *Journal fürVerbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, *7*(3), 229-236.

Desnoyers, M. (2000). Anemias associated with Heinz bodies. *Schalm's veterinary hematology*, 178-184.

Dessouki, A. A., Hassan, A. G., Ali, S. A., Loutfy, N. M., & Ahmed, M. T. (2013). Alterations in P53 gene, testicular and hepatic tissues of albino rats due to profenofos administration: A Possible protective effect of vitamin C. *Immunol. Toxicol*, *1*, 26-34.

Dhandapani, K.M. and Brann,D.W.(2002). Orphanin FQ inhibits GnRH secretion from rat hypothalamic fragments but GT1-7 neurons. Neuroreport.13(10): 1247-1249.

Dias, G., Lino-Neto, J., Mercati, D., &Dallai, R. (2016). The sperm structure and spermiogenesis of the heteropteranCoptosomascutellatum (Geoffroy) with emphasis on the development of the centriole adjunct. *Micron*, *82*, 33-40.

Diemer, T., Allen, J. A., Hales, K. H., & Hales, D. B. (2003). Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology*, *144*(7), 2882-2891.

Dong, Y. S., Hou, W. G., Li, Y., Liu, D. B., Hao, G. Z., Zhang, H. F., ... & Li, W. (2016). Unexpected requirement for a binding partner of the syntaxin family in phagocytosis by murine testicular Sertoli cells. *Cell death and differentiation*, *23*(5), 787.

Dohle, G. R., Halley, D. J. J., Van Hemel, J. O., Van Den Ouwel, A. M. W., Pieters, M. H. E. C., Weber, R. F. A., &Govaerts, L. C. P. (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human reproduction*, *17*(1), 13-16.

Durairajanayagam, D., Agarwal, A., & Ong, C. (2015). Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive biomedicine online*, *30*(1), 14-27.

European Food Safety Authority Panel on Food Additives and Nutrient Sources (ANS). (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of Brown HT (E 155) as a food additive. *EFSA Journal*, *8*(4), 1536.

European Food Safety Authority Scientific Committee. (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*, *9*(9).

Ezer, N., & Robaire, B. (2002). Androgenic regulation of the structure and functions of the epididymis. In *The epididymis: from molecules to clinical practice* (pp. 297-316). Springer, Boston, MA.

Fathollahi, A.; Jasemi, M. and Saki,G.(2011). C52 Effect of noise stress on fertility of male rats the protective effect of vitamin C and vitamin E on its potential harmful effect .Eur.Uro.Supp. 10(9): 625-626.

Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., & Foresta, C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reproductive biomedicine online*, *14*(6), 734-745.

Fernandes, F. H., Bustos-Obregon, E., & Salvadori, D. M. F. (2015). Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. *Reproductive Toxicology*, *53*, 75-81.

Ferrari, C. K. B. (2001). Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *INTERNATIONAL MEDICAL JOURNAL-TOKYO-*, *8*(3), 175-184.

Fijer, A. N., & Al-Mashhedy, L. A. M.,2012. Influence of Carmosine (E122) on oxidative stress status and the protective effect of vitamins C and E in male rats.

Freitas, F. E., Cordeiro-Mori, F., Sasso-Cerri, E., Lucas, S. R., & Miraglia, S. M. (2002). Alterations of spermatogenesis in etoposide-treated rats: a stereological study. *Interciencia*, *27*(5), 227-235.

Gabrielsen, J. S., & Tanrikut, C. (2016). Chronic exposures and male fertility: the impacts of environment, diet, and drug use on spermatogenesis. Andrology, 4(4), 648-661.

Ganong, W. F. (2003). Review of Medicinal physiology. 21st ed. Lavg Medical Books / Mc graw Hill. London, Mexico, San Francisco, Chicago, Toronto, Madrid, New Jersey.

Ganong, W. F. (2005). Synaptic and junctional transmission. *Review of medical physiology. 22nd ed. Boston: McGraw Hill*, 85.

Gao, Y., Li, C., Shen, J., Yin, H., An, X., & Jin, H. (2011). Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. *Journal of food science*, *76*(6), T125-T129.

Gautam, D., Sharma, G., & Goyal, R. P. (2010). Evaluation of toxic impact of tartrazine on male Swiss albino mice. *Pharmacologyonline*, *1*, 133-40.

Gopal, N., Selvam, A., Srinivasan, A. R., Saha, S., & Muddegowda, P. H. (2012). Serum Gamma GlutamylTransferase levels in Obese South Indian adults with reference to atherogenic lipid risk factors and lipid peroxides. *Int J Med Health Sci*, *1*(2), 35-42.

Gore, A. C., Attardi, B., & DeFranco, D. B. (2006). Glucocorticoid repression of the reproductive axis: effects on GnRH and gonadotropin subunit mRNA levels. *Molecular and cellular endocrinology*, *256*(1-2), 40-48.

Granger, D. L., Taintor, R. R., Boockvar, K. S., & Hibbs Jr, J. B. (1996). Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. In *Methods in enzymology* (Vol. 268, pp. 142-151). Academic Press.

Gray Jr, L. E., OSTBY Jr, J. S., Kavlock, R. J., & Marshall, R. (1992). Gonadal effects of fetal exposure to the azo dye congo red in mice: infertility in female but not male offspring. *Toxicological Sciences*, *19*(3), 411-422.

Griswold, M. D. (2015). Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological reviews*, *96*(1), 1-17.

Guidet, B. R., & Shah, S. V. (1989). In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *256*(1), F158-F164.

Gupta, V. K., & Sharma, S. K. (2006). Plants as natural antioxidants.

Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). (2013). Reproduction in farm animals. John Wiley & Sons.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. *Drugs & aging*, *18*(9), 685-716.

Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. *Biochemical Journal*, *401*(1), 1-11.

Halliwell, B., &Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (2000). The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action?. *Free radical research*, *33*(6), 819-830.

Handelsman, D. J., Spaliviero, J. A., Simpson, J. M., Allan, C. M., & Singh, J. (1999). Spermatogenesis without gonadotropins: maintenance has a lower testosterone threshold than initiation. *Endocrinology*, *140*(9), 3938-3946.

Harrison, K. L. (1998). Semen parameter defects and toxin contact related occupation in infertility patients. *Middle East Fertil. Soc. J*, *3*, 3-10.

Hashem, M. M., Atta, A. H., Arbid, M. S., Nada, S. A., & Asaad, G. F. (2010). Immunological studies on Amaranth, Sunset Yellow and Curcumin as food colouring agents in albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(6), 1581-1586.

Hassan, A. J., & Salman, H. A. (2017). The Effect Study of Using Different Concentrations of Chocolate Brown Dye (Chocolate Brown HT E155) on Some Physiological Parameters and Histological Structure of Stomach and Intestine on Albino Rats. *Al-Qadisiyah Journal Of Pure Science*, *21*(2).

Hassan, G. M. (2010). Effects of some synthetic coloring additives on DNA damage and chromosomal aberrations of rats. *Arab J Biotech*, *13*(1), 13-24.

Heikal, T. M., El-Sherbiny, M. A. H. M. O. U. D., Hassan, S. A., Arafa, A., & Ghanem, H. Z. (2012). Antioxidant effect of selenium on hepatotoxicity induced by chlorpyrifos in male rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, *4*(4), 603-609.

Helal, E. G., Zaahkouk, S. A., &Mekkawy, H. A. (2000). Effect of Some Food Colorants (Synthetic and Natural products) of Young Albino Rats I-

Liver and Kidney Functions. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*, *1*, 103-113.

Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., & Smith, C. E. (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microscopy research and technique*, *73*(4), 241-278.

Hess, R. A., &De Franca, L. R. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In *Molecular mechanisms in spermatogenesis* (pp. 1-15). Springer, New York, NY

Himri, I., Bellahcen, S., Souna, F., Belmekki, F., Aziz, M., Bnouham, M., ... & Saalaoui, E. (2011). A 90-day oral toxicity study of tartrazine, a synthetic food dye, in wistar rats. *Group*, *300*, 00.

Hinting, A. (1989). *Methods of semen analysis in: Assessment of Human Sperm Fertilizing ability* (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis by Hinting, A., University of Michigan state).

Hirschbruch, M. D., &Bawazir, A. E. (2012). Effect of chocolate brown HT with olive oil on some neurotransmitters in different brain regions, physiological and histological structure of Toxicologia de alimentos: umadiscussäo. *Hig. aliment*, *12*(53), 21-5.

Hong, M. N., Suh, H. J., Lee, O. H., Chun, H. S., & Lee, C. (2014). Improved analytical method of synthetic food colour additive, Brown HT by high-performance liquid chromatography. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food*, *2*, 68-75.

Huybrechts, I., Sioen, I., Boonb, P. E., De Neve, M., Amiano, P., Arganini, C., ... &Hirvonen, T. (2010). Long-term dietary exposure to different food colours in young children living in different European countries. *EFSA Supporting Publications*, *7*(5).

Ishida, H. (1996). Levels of preservatives in toothpastes and possibility of their intake during brushing of teeth. *Food Hygiene and Safety Science (ShokuhinEiseigakuZasshi)*, *37*(4), 234-239_1.

Junqueira,C.;Carneiro,J.&Kelley,R.O.(1995). Basic histology 8th edition .Alange Medical book .pp:407-422.

Kaur, S., & Kaur, A. (2015). Variability in antioxidant/detoxification enzymes of Labeo rohita exposed to an azo dye, acid black (AB). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *167*, 108-116.

Kim, B., Park, K., & Rhee, K. (2013). Heat stress response of male germ cells. *Cellular and molecular life sciences*, *70*(15), 2623-2636.

Khatun, A., Sarkar, K., Nath, P. P., Mondal, M., Pal, S., & Paul, G. (2017). Chocolate brown HT impairs the function of the ovary by depressing the hypothalamic-hypophyseal-ovarian servomechanism in albino rat.

Kobayashi, N., Miyauchi, N., Tatsuta, N., Kitamura, A., Okae, H., Hiura, H., ... &Arima, T. (2017). Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. *Scientific reports*, *7*, 42336.

Kuiri-Hänninen, T., Sankilampi, U., & Dunkel, L. (2014). Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Hormone research in paediatrics*, *82*(2), 73-80.

Kulkarni, C., Deshpande, A., & More, S. (2010). Assessment of microbial contamination in commercial herbal oral medicinal liquids. *Int J Pharm Res Dev*, *2*(9), 191-193.

Kumar, L., Yadav, S. K., Kushwaha, B., Pandey, A., Sharma, V., Verma, V., ... & Gupta, G. (2016). Energy Utilization for Survival and Fertilization—Parsimonious Quiescent Sperm Turn Extravagant on Motility Activation in Rat. *Biology of reproduction*, *94*(4), 96-1.

Kumar, V., **Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. (2009).** Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition: Expert Consult-Online Robbins Pathology Kindle Locations 33498-33499.

Lachili, B., Hininger, I., Faure, H., Arnaud, J., Richard, M. J., Favier, A., & Roussel, A. M. (2001). Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biological trace element research*, *83*(2), 103-110.

Lector, C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, *1*, e78-86.

Leo, M.L.; Nollet, A. and Fidel, T (2012). Food analysis by HPLC (3ed Ed), CRC Press, P: 513-525.Madsen, C. (1997). Chemicals in food and allergy: food fiction. Environ. Toxicol. Pharmacol., 4(1-2): 115-120.

Levine, R. J., Brown, M. H., Bell, M., Shue, F., Greenberg, G. N., &Bordson, B. L. (1992). Air-conditioned environments do not prevent deterioration of human semen quality during the summer. *Fertility and sterility*, *57*(5), 1075-1083.

Li, X. F. ; Mitchell, J. C. ; Wood, S. ; Coen, C. W. ; Lightman, S. L. and O'Byrne, K.T. (2003). The effect of oestradiol and progesterone on hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release and on corticotrophin-releasing hormone RNA expression in the rat. J. Neuroendocrinol. 15(5): 468–476.

Lindgren, I., Giwercman, A., Axelsson, J., &Giwercman, Y. L. (2012). Association between follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms and reproductive parameters in young men from the general population. *Pharmacogenetics and genomics*, *22*(9), 667-672.

Luster, M. I., Munson, A. E., Thomas, P. T., Holsapple, M. P., Fenters, J. D., White Jr, K. L., ... & Dean, J. H. (1988). Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Toxicological Sciences*, *10*(1), 2-19.

Mahmoud, N. H. (2006). Toxic effects of the synthetic food dye brilliant blue on liver, kidney and testes functions in rats. *J Egypt SocToxicol*, *34*, 77-84.

Mahfouz, M. E., & Moussa, E. A. (2015). the impact of curcumin administration on the food colouring sunset yellow-induced damage in testes and liver of male rat: gene expression and ultrastructural studies. *the egyptian journal of experimental biology (Zoology)*, *11*(1), 43-60.

Maitra, S. K., & Mitra, A. (2008). Testicular functions and serum titers of LH and testosterone in methyl parathion-fed roseringed parakeets. *Ecotoxicology and environmental safety*, *71*(1), 236-244.

Makhlouf, M. M., Eldien, H. M., Zagloul, D. A., Dief, E. A., & ElHaliem, N. A. (2008). The effect of lead acetate on testicular structure and protective effect of vitamin E in adult albino rat. *Egypt J. Histol*, *31*(2), 406-418.

Mann, T., & Lutwak-Mann, C. (2012). *Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology*. Springer Science & Business Media.

Marcon, L., Hales, B. F., & Robaire, B. (2008). Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics bleomycin, etoposide, and cisplatin on spermatogenesis, fertility, and progeny outcome in the male rat. *Journal of andrology*, *29*(4), 408-417.

Martin-Du, R. P. (2007). Androgen deficiency in women: indication and risks of testosterone or DHEA treatment. *Revue medicale suisse*, *3*(104), 792-796.

Martini, A. C., Tissera, A., Estofán, D., Molina, R. I., Mangeaud, A., de Cuneo, M. F., & Ruiz, R. D. (2010). Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. Fertility and sterility, 94(5), 1739-1743.

Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, *52*, 1-15.

Masone, D., &Chanforan, C. (2015). Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. *Computational biology and chemistry*, *56*, 152-158.

Mathur, N., Mehta, M., & Chaudhary, V. (2005). Sperm abnormality Induction by Food colour metanil yellow. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*, *5*(3/4), 157.

Mclachlan, R. I., O'Donnell, L. I. Z. A., Meachem, S. J., Stanton, P. G., De Kretser, D. M., Pratis, K., & Robertson, D. M. (2002). Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *Journal of andrology*, *23*(2), 149-162.

McLachlan, R. I., O'donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., De Kretser, D. M., Pratis, K., & Robertson, D. M. (2002). Identification of

specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research*, *57*(1), 149-179.

McNeilly, A. S., Crawford, J. L., Taragnat, C., Nicol, L., & McNeilly, J. R. (2003). The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. *reproduction-cambridge-supplement-*, 463-476.

Mister, S., &Hathcock, J. (2012). Under the law, FDA must grant different standards for new dietary ingredients and food additives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *62*(3), 456-458.

Montaser, M. M., &Alkafafy, M. E. (2013). Effects of Synthetic Food Color (Carmoisine) on Expression of Some Fuel Metabolism Genes in Liver of Male Albino Rats. *Life Science Journal*, *2*, 10.

Morales, P., Katz, D. F., Overstreet, J. W., Samuels, S. J., & Chang, R. J. (1988). The relationship between the motility and morphology of spermatozoa in human semen. *Journal of andrology*, *9*(4), 241-247.

Moutinho, I. L. D., Bertges, L. C., & Assis, R. V. C. (2007). Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n° 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Brazilian journal of biology*, *67*(1), 141-145..

Nass, R., & Evans, W. S. (2019). Physiologic and Pathophysiologic Alterations of the Neuroendocrine Components of the Reproductive Axis. In *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)* (pp. 473-519).

Neshe, S. A., Arefin, S., Hussain, M. S., Das, A., Karmakar, P., & Hossain, M. S. (2016). Safety evaluation of chocolate brown dye in Swiss albino mice. *J Nutr Disorders Ther*, *6*(195), 2161-0509.

Nirmala, A., Saroja, S., & Devi, G. G. (2011). Antidiabetic Activity of Basellarubra and its Relationship with the Antioxidant Property.

Ohtsuki, T., Sato, K., Sugimoto, N., Akiyama, H., & Kawamura, Y. (2012). Absolute quantitative analysis for sorbic acid in processed foods using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Analyticachimicaacta, 734, 54-61.

Oliveira, P. F., Alves, M. G., Rato, L., Silva, J., Sa, R., Barros, A., ... & Socorro, S. (2011). Influence of 5α-dihydrotestosterone and 17β-estradiol on human Sertoli cells metabolism. *International journal of andrology*, *34*(6pt2).

Oseen, K. L., &Wassersug, R. J. (2002). Environmental factors influencing calling in sympatric anurans. *Oecologia*, *133*(4), 616-625.

Osman MA, Afifi A, Hussein RM, Kamilia B, Abdel AI, et al. (1995) Long-Term Biochemical and Genotoxicity Studies of Four Synthetic Food And Drug Colorants in Mice. Bulletin of Faculty of Pharmacy: Cairo University 1: 13-21.

Otani, J .(2015).spreparation of novel azo pigments and clarification of the emitting state of a unique fluorescent pigment.Ritsumeikan University,3,89-109.

Owen, D. H., & Katz, D. F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. Journal of andrology, 26(4), 459-469.

Palmieri, B., &Sblendorio, V. (2007). Oxidative stress tests: overview on reliability and use. *European review for medical and pharmacological sciences*, *11*(6), 383-399.

Popa, S. M., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2008). The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu. Rev. Physiol.*, *70*, 213-238.

Porter, C. W., Ganis, B., Libby, P. R., & Bergeron, R. J. (1991). Correlations between polyamine analogue-induced increases in spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity, polyamine pool depletion, and growth inhibition in human melanoma cell lines. *Cancer Research*, *51*(14), 3715-3720.

Rafii, F., Hall, J. D., &Cerniglia, C. E. (1997). Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by Clostridium species from the human intestinal tract. *Food and chemical Toxicology*, *35*(9), 897-901.

Reyes, F. G. R., Valim, M. F. C. F. A., &Vercesi, A. E. (1996). Effect of organic synthetic food colours on mitochondrial respiration. *Food Additives & Contaminants*, *13*(1), 5-11.

Roblero, L., Guadarrama, A., Ortiz, M. E., Fernández, E., & Zegers-Hochschild, F. (1988). High potassium concentration improves the rate of acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertility and sterility*, *49*(4), 676-679.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2018). Natural food pigments and colorants. In *Bioactive Molecules in Food* (pp. 1-35). Springer, Cham.

Rosati, F., Sturli, N., Cungi, M. C., Morello, M., Villanelli, F., Bartolucci, G., ... & Danza, G. (2011). Gonadotropin-releasing hormone modulates cholesterol synthesis and steroidogenesis in SH-SY5Y cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *124*(3-5), 77-83.

Saafi, E. B., Louedi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M. F., Hammami, M., & Achour, L. (2011). Protective effect of date palm fruit extract (Phoenix dactylifera L.) on dimethoate induced-oxidative stress in rat liver. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *63*(5), 433-441.

Sadate-Ngatchou, P. I., Pouchnik, D. J., & Griswold, M. D. (2004). Identification of testosterone-regulated genes in testes of hypogonadal mice using oligonucleotide microarray. *Molecular Endocrinology*, *18*(2), 422-433.

Santosh, B. T., Chitme, H. R., Rabbani, G., & Jafar, M. (2011). Effect of Leptadenia reticulate Linn. On stress modulated sexual behavior of male rats. *Int Res J Pharm*, *2*(10), 27-36.

Sargazi, Z., Nikravesh, M. R., Jalali, M., Sadeghnia, H., Anbarkeh, F. R., & Mohammadzadeh, L. (2015). Gender-related differences in sensitivity to diazinon in gonads of adult rats and the protective effect of vitamin E. *IJWHR Sci*, *3*, 40-47.

Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., ... &Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *519*(1), 103-119.

Sayed, H. M., Fouad, D., Ataya, F. S., Hassan, N. H., & Fahmy, M. A. (2012). The modifying effect of selenium and vitamins A, C, and E on the genotoxicity induced by sunset yellow in male mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *744*(2), 145-153.

Scheuer, D. A. (2010). Regulation of the stress response in rats by central actions of glucocorticoids. *Experimental physiology*, *95*(1), 26-31.

Schieber, M., &Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, *24*(10), R453-R462.

Selvakumar, E., Prahalathan, C., Sudharsan, P. T., & Varalakshmi, P. (2006). Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*, *217*(1), 71-78.

Sharma, A., Goyal, R. P., Chakravarty, G., & Sharma, S. (2005). Haemotoxic effects of chocolate brown, a commonly used blend of permitted food colour on Swiss albino mice. *Asian J. Exp. Sci*, *19*(2), 93-103.

Sharma G, Gautam D, Goyal RP (2009) Tartrazine Induced Haematological and Serological Changes in Female Swiss albino Mice, Mus musculus. Pharmacologyonline 3: 774-788.

Sharma, R., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. In *Sperm Chromatin* . Springer, New York, NY. (pp. 19-44).

Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric oxide*, *26*(4), 259-266.

Sjöblom, T., West, A., & Lähdetie, J. (1998). Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin, and diepoxybutane. *Environmental and molecular mutagenesis*, *31*(2), 133-148.

Smith, A. A. (2011). Preservatives in food products–review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, *2*(2).

Soltan, S. S., &Shehata, M. M. (2012). The effects of using color foods of children on immunity properties and liver, kidney on rats. *Food and Nutrition Sciences*, *3*(07), 897.

Stoddart, A. M., & Levine, W. G. (1992). Azoreductase activity by purified rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochemical pharmacology*, *43*(10), 2227-2235.

Stuppia, L., Franzago, M., Ballerini, P., Gatta, V., &Antonucci, I. (2015). Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle

on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clinical epigenetics*, *7*(1), 120.

Suryavathi, V., Sharma, S., Sharma, S., Saxena, P., Pandey, S., Grover, R., ... & Sharma, K. P. (2005). Acute toxicity of textile dye wastewaters (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice. *Reproductive Toxicology*, *19*(4), 547-556.

Sty, J. R., & Conway, J. J. (1985). The spleen: development and functional evaluation. In *Seminars in nuclear medicine*, 15 (3), 276-298. WB Saunders.

Taib, I. S., Budin, S. B., Ghazali, A. R., Jayusman, P. A., Louis, S. R., & Mohamed, J. (2013). Fenitrothion induced oxidative stress and morphological alterations of sperm and testes in male sprague-dawley rats. *Clinics*, *68*(1), 93-100.

Tanaka, T. (2005). Reproductive and neurobehavioural effects of bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in a cross-mating toxicity study of mice. *Food and chemical toxicology*, *43*(4), 581-589.

Toledo, M. C. (1999). Regulatory Aspects In The Use Of Natural Colorants [regulamentação De Uso De CorantesNaturais.]. *ArchivosLatinoamericanos de Nutricion*.

Tsai, S. C., Lu, C. C., Lin, C. S., & Wang, P. S. (2003). Antisteroidogenic actions of hydrogen peroxide on rat Leydig cells. *Journal of cellular biochemistry*, *90*(6), 1276-1286.

Turner, C. D., & Bagnara, J. T. (1976). Endocrinology of the ovary. *General endocrinology*, *3*, 365-409.

Turner, R. M. (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?. Journal of andrology, 24(6), 790-803.

Uchida, M. C., Bacurau, R. F. P., Navarro, F., Pontes Jr, F. L., Tessuti, V. D., Moreau, R. L., ... & Aoki, M. S. (2004). Alteration of testosterone: cortisol ratio induced by resistance training in women. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, *10*(3), 165-168.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., &Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, *266*(1-2), 37-56.

Vanaja, R., & Palanimuthu, M. (2014). Effect of organophosphorous compounds poisoning on the metabolism of liver. *International journal of analytical, pharmaceutical and biomedical sciences*, *3*(2), 47-50.

Visweswaran, B., & Krishnamoorthy, G. (2012). Oxidative stress by tartrazine in the testis of Wistar rats. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, *2*(3), 44-49.

Vojdani, C. (2015). Immune reactivity to food coloring. *Alternative therapies in health and medicine*, *21*, 52.

Walker, W. H. (2011). Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*, *1*(2), 116-120.

Ward, R. J. (1970). The Vitamins Requirements of Laboratory Animals. In: Tavernor, W.D. (ed.), Nutritional and Disease in Experimental Animals. Bailliere, Tindal and Cassell, London. p24.

Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., &Nieschlag, E. (2010). Physiology of testicular function. In *Andrology* .Springer, Berlin, Heidelberg. (pp. 11-59).

Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. (2013). A role for glucocorticoids in stress-impaired reproduction: beyond the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, *154*(12), 4450-4468.

Wroblewska, B. (2009). Influence of food additives and contaminants (nickel and chromium) on hypersensitivity and other adverse health reactions–a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *59*(4).

Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., ... & Li, H. B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International journal of molecular sciences*, *18*(1), 96.

Yadav, A., Kumar, A., Tripathi, A., & Das, M. (2013). Sunset yellow FCF, a permitted food dye, alters functional responses of splenocytes at non-cytotoxic dose. *Toxicology letters*, *217*(3), 197-204.

Yamjala, K., Nainar, M. S., &Ramisetti, N. R. (2016). Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry–a review. *Food chemistry*, *192*, 813-824.

Yanagimachi, R. (2017). *The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration*. Cambridge University Press.

Yang, H. C., Chuang, J. Y., Jeng, W. Y., Liu, C. I., Wang, A. H. J., Lu, P. J., ... & Hung, J. J. (2014). Pin1-mediated Sp1 phosphorylation by CDK1 increases Sp1 stability and decreases its DNA-binding activity during mitosis. *Nucleic acids research*, *42*(22), 13573-13587.

Yousef, M. I., Abdallah, G. A., & Kamel, K. I. (2003). Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, *76*(1-2), 99-111.

الملحق رقم (1)

جدول يوضح أرقام كودات المضافات الغذائية حسب الهيئة الأوربية للأغذية والأدوية

الرقم	المادة
E100-E199	الملونات Colours
E200-E299	المواد الحافظة Preservatives
E300-E399	مضادات الأكسدة antioxidant,acidants,acidity regulators ، الأحماض ، منظمات
E400-499	مكثفات والمثبتات وعوامل الاستحلاب thickeners , stabilizers, emulsifiers
E500-E599	معدلات الحامضية ومضادات التكتل Acidity regulators, anti caking agents
E600-E699	النكهات Flavour enhancers
E700-E799	مضادات حيويةantibiotics
E900-E999	عناصر ملمعة ومحليات Glazing agents , sweeteners
E1000-1999	مواد أضافية أخرى لم تصنف سابقا additional chemically

مكونات العليقة المركزة المعطاة للجرذان اثناء مدة الدراسة

التسلسل	المادة العلقية	النسبة%	لكل 10 كغم
1	حليب مجفف كامل الدسم	20	2 كغم
2	جريش الحنطة	17	1.7 كغم
3	دقيق الحنطة	17	1.7 كغم
4	جريش الشعير	20	2 كغم
5	جريش الذرة	25.5	2.5 كغم
6	ملح الطعام	1	0.1 كغم

مقادير العليقة حسب (Ward,1970)

الملحق رقم (3)

مكونات صبغة الأيوسين – النكروسين

تم تحضير هذه الصبغة باستخدام 1غم من ملون الايوسين Eiosin تذاب في 100 مل من محلول سترات الصوديوم 3% وإذابة 5 غم من صبغة النكروسين Necrosi تذاب في 100 مل من محلول سترات الصوديوم 3% ثم يمزج كل أربعة أجزاء الأيوسين مع جزء واحد من النكروسين .

الملحق رقم (4)

مكونات صبغة الهيماتوكسين – أيوسين

مكونات صبغة الهيماتوكسلين (Harris-hematoxylin)

التسلسل	المادة	مقدارها
1	مسحوق الهيماتوكسلين	5غم
2	كحول اثيلي مطلق	50 مل
3	شب البوتاسيوم Potassium alum	100غم
4	اوكسيد الزئبق Mercuric oxide	2.5غم
5	حامض الخليك الثلجي	2مل

ماء الكحول المحمض Acid alcohol

التسلسل	المادة	مقدارها
1	حامض الهيدروكلوريك HCl	1مل
2	كحول الايثانول 70%	99مل

مكونات صبغة الايوسين Eosin

التسلسل	المادة	مقدارها
1	مسحوق الايوسين	10غم
2	ماء مقطر	1000مل

According to statistical analysis, there was a significant increase in the level of o Malondialdehyde (MDA) and in the Nitrogen Oxides (NO) concentration and low Catalase enzyme levels in both the groups (T1) and (T2) as to the control group (C).

After measuring the sperm parameters, the results showed a significant decrease ($P \leq 0.05$) in the Sperm count **,**the percentage of motility sperm, normal sperm **and** live sperm between in (T1) and (T2) when compared with control group.

The results of the current study also showed a significant increase in the number of white blood cells of the animals that were given the dye in (T1) and (T2), in comparison to control group (C), but the number of red blood cells and the proportion of hemoglobin decreased and the size of the cells, as well as the size of the red blood cells in the blood of the rats who were given the dye in (T1) and (T2) in comparison to the control group (C).

The results of the histological examination showed that tissue changes were evident in the testis and epididymis of the rats that were given the dye by decreasing the diameter of seminal tubules, the diameter of epididymis tubules as well as the thickness of their lining layer in comparison with the testis of the animals in the control group (C). Also, there is a decrease in the rates of spermatogonia, and spermatocyte, as well as spermatid. Moreover, the rate number of the leydig cells decreased in the animals of the treatment groups (T1) and (T2) as compared to the cells in the control group (C).

Finally, we concluded that the dye of chocolate brown has clear negative effects on the tissue and function of reproductive system, as well as the work and efficiency of genital organs in general, and male fertility in particular.

Summary

This study was carried to know the effects of Chocolate Brown HT E155 on body, testis , epididymis weight and The sperm count, its mobility and mortality and some Biochemical parameters such as calculating the level of antioxidant enzymes and lipid peroxidation, as well as calculating some of the Hematological parameters **,** and Histological study to testis and epididymis.

This experiment was conducted in the animal house / College of Education at the University of Qadisiyah. The study included (30) adult male albino rats at the age of (14-16) weeks and with similar weights (180-200) grams. The animals were divided into three equal groups, of which each included ten animals. The first group is the control group (C) that was given 1 ml of normal water for a period of (60) days. The second group is the first treatment group (T1) that was given 1 ml of the pigment of Chocolate Brown HT E155 with a concentration of (200) mg/kg of the body weight, for a period of (60) days. Then, there is the second treatment group (T2) that was given 1 ml of the pigment of chocolate brown with a concentration of (400) mg/kg of the bodyweight for a period of (60) days.

At the end of the experiment, the animals were sacrificed, its blood taken out, and its genitals removed for the purpose of observing the effect of the dye according to the study criteria, as the following:

The results of the statistical analysis showed a significant decrease ($P < 0.05$) in the rate of body weight and the ratio of the weight of the Reproductive Organs (testes and Epididymis)to the body weight in first treatment group (T1)and the second treatment group (T2) compared with the control group (C).

Our results showed that significant decreased ($P<0.05$) in the level of FSH, LH, GnRH and testosterone hormone in T1 and T2 group when compared with control group.

University of Al-Qadisiya
College of

Biology

The effect of Chocolate Browne HT E155 On Some Fertility Parameters in male White Rats

A Thesis

Submitted To The Council of the College Of Education University Of AL-Qadisiy In Partial Fulfillment Of the Requirements For The Degree Of Master Of Science

In

Zoology

By

Jabbar Raheem Abbas

Supervised By

Dr.Hussein Abbas Selman

1440 A.H. **2019 A.D.**