Journal of Agricultural, Environmental and Veterinary Sciences
Volume (5), Issue (5): 30 Dec 2021
P: 1 - 14

ISSN: 2522-3364

مجلة العلوم الزراعية والبيئية والبيطرية
المجلد (5)، العدد (5): 30 ديسمبر 2021م
ص: 1 - 14

Toxic Effect Induced by Cadmium on Some Reproductive Parameters and the Therapeutic Role of Leaves of Lemon Verbena

Mohammad Amer Salaho

Mahmoud Kassem

Faculty of Sciences || Aleppo University || Syria

Abstract: This study was conducted on 28 male Syrian hamsters, and the aim was to confirm the toxic effects of cadmium on the structure and function of the male reproductive system and to test the effectiveness of the alcoholic extract of the lemon verbena plant in the therapeutic of cadmium toxicity.

The results of the study showed the negative effect of cadmium on some reproductive parameters of male Syrian Hamster, where treatment with cadmium (5mg/kg/day) reduced GSI% values for both testis and epididymis, lowered the values of testicular dimensions, testosterone concentration and some physiological parameters of the tail of the epididymis sperm and some histological measurements for testes, numbers of spermatogenesis cells, Sertoli and Leydig, cadmium treatment caused histological disorders in the testicles, compared to the control group.

Dosing male hamsters with lemon verbena leaf extract at two concentrations (250,500mg/kg/day) did not lead to a clear improvement compared to the cadmium group.

Keywords: Lemon verbena, Cadmium, Reproduction.

الأثر السمّي المستحدث بعنصر الكادميوم على بعض المعايير التكاثرية والدور العلاجي لأوراق نبات المليسة

محمد عامر صلاحو

محمود قاسم

كلية العلوم || جامعة حلب || سوريا

المستخلص: أجريت هذه الدراسة على 28 من ذكور الهامستر السوري، وكان الهدف منها هو تأكيد الآثار السميّة للكادميوم على بنية ووظيفة الجهاز التكاثري الذكري واختبار مدى فعالية المستخلص الكحولي لنبات المليّسة في العلاج من سمية الكادميوم.

أظهرت نتائج الدراسة تأثير الكادميوم السلبي على بعض المعايير التكاثرية لدى ذكور الهامستر السوري حيث أدّت المعاملة بالكادميوم (5mg/kg/day) إلى خفض قيم GSI% لكل من الخصية والبربخ، وخفض قيم أبعاد الخصية وتركيز هرمون التستوستيرون وبعض المعايير الفيزيولوجية لنطاف ذيل البربخ وبعض القياسات النسيجية للخصية وأعداد خلايا السلسلة المنوية وسرتولي وليدغ، كما أحدثت المعاملة بالكادميوم اضطرابات نسيجية في الخصية وذلك بالمقارنة مع مجموعة الشاهد، ولم يؤدّ تجريع ذكور الهامستر بمستخلص أوراق المليّسة بالتركيزين (250,500mg/kg/day) إلى تحسّن واضح مقارنة مع مجموعة الكادميوم.

الكلمات المفتاحية: المليسة-الكادميوم-التكاثر.

أولاً-المقدمة.

يوجد عنصر الكادميوم في القشرة الأرضية بنسب نادرة تتراوح بين 0.1 -0.5 ملغ/غ، ويكون مرتبطاً بفلزات أخرى مثل فلزات الزنك والرصاص والنحاس، وقد تم اكتشاف هذا العنصر في عام 1817 بواسطة Stromeyer وذلك كشائبة في كربونات الزنك (Satarug *et al*, 2003).

يزداد تركيز هذا المعدن الثقيل باطّراد على الصعيد العالمي إذ تنجم الانبعاثات الطبيعية للكادميوم من تحلّل الوقود الأحفوري وانتشار جزيئاته وثوران البراكين وحرائق الغابات، وقد عملت النشاطات البشرية الصناعية على زيادة مستويات الكادميوم في الغلاف الجوي والتربة والماء والكائنات الحية بنسبة كبيرة، وأدى ذلك إلى دخوله في السلسلة الغذائية (Moulis and Thevenod, 2010).

يعدّ الاستنشاق الطريق الرئيس لدخول الكادميوم إلى الجسم في المواقع المهنية كمعامل الدهانات والأصبغة والبطاريات وغلفنة المعادن حيث تصل نسبة الكادميوم إلى (2-100 µg) في كل متر مكعب، وتكون نسبة الكادميوم منخفضة في الهواء الطلق البعيد عن أماكن التلوث (Who, 2007).

ينتقل الكادميوم بعد امتصاصه إلى الدم حيث يرتبط معظمه بكريات الدم الحمراء أو بالبروتينات ذات الوزن الجزيئي المرتفع كالألبومين ويتميز الكادميوم بعمر نصف يتراوح بين 3 و4 أشهر في الدم، وفي الكبد بين 4 و19 سنة، وفي الكُلى بين 6 و27 سنة، وأكثر من 30 سنة في العظام والعضلات، وهذا يعكس حقيقة أن الإنسان لا يملك طرق فعالة للتخلص منه (Godt *et al*, 2006).

يؤثر الكادميوم بشكل كبير في نظام الغدد الصم ويسبب اضطراباً في إفراز وتنظيم الهرمونات الجنسية الستيروئيدية، فهو يؤثر بشكل مباشر على المناسل كما أن له تأثير في محور الوطاء-النخامية-المناسل (H-P-G) (Jacob *et al*, 2015)، وذلك من خلال قدرته على توليد الجذور الحرة بكميات مرتفعة بما يكفي للتغلب على مضادات الأكسدة الطبيعية، وينتج عنه حالة تعرف بالإجهاد التأكسدي والتي تعدّ آلية مهمة لسميّة الكادميوم، ويفترض الباحثون أن الكادميوم يحرّض على الإجهاد التأكسدي من خلال ثلاثة مسارات:

الأول إضعاف مضادات الأكسدة الإنزيمية مثل (SOD) و(GPx) ورفع مستويات (MDA)، والثاني التحريض على إنتاج أصناف الأكسجين التفاعلية (ROS) أما المسار الثالث فهو الارتباط بجذور السلفهدريل (SH^-) الموجودة في بروتينات الغشاء الخلوي أو السيتوبلاسما أو الإنزيمات (Termellen, 2008).

وعمومًا فإنه يمكن لمضادات الأكسدة الموجودة في النباتات أن تزيل الأنواع الجزيئية من الأكسجين النشط وتقلل من الآثار الضارّة لسميّة الكادميوم (Siraj and Usha, 2003)، وقد عرف الإنسان منذ القدم أهمية النباتات الطبية في العلاج وبالرغم مما وصل إليه الإنسان من تقدم علمي مكنه من تحضير الكثير من المركبات الكيميائية الدوائية، إلا أن هناك عودة إلى استخدام النباتات الطبية نظراً لما ظهر من خطورة لاستخدام المركبات الكيميائية على صحة الإنسان، ويعد نبات المليّسة (*Aloysia Citriodora*) ويسمى أيضاً اللويزة الليمونية أو رعي الحمام من النباتات الطبية المهمة لما تحتويه أوراقه من مركبات تلعب دوراً في تسكين الآلام والتخلّص من الالتهابات وتنظيم مستويات الغلوكوز لدى المصابين بداء السكري وفتح الشهية كما تعمل على إدرار الحليب عند الأم المرضع وتحفيز القدرة الجنسية والعديد من الفوائد الأخرى، ومن أهم هذا المركبات (verbascoside) و (luteolin 7-diglucuronide) و (verbaline) كما تحتوي المليسة على العديد من مضادات الأكسدة المهمة مثل الحموض الفينولية والفينيل بروبانوئيد والفلافونوئيدات ومشتقاتها (Rafiee *et al*, 2016).

أظهرت إحدى التجارب على عينة من الرياضيين الذكور لمدة 21 يوم لتقييم قدرة مستخلص المليسة بالتركيز 600 ملغ/كبسولة حصول تحسّن في تعداد الكريات الحمراء وخلايا اللمفاويات، كما تراجعت مؤشرات الإجهاد التأكسدي في البلازما مثل (protein carbonyl) و(MDA) (Carrera *et al*, 2012).

وبينت إحدى الدراسات أن إضافة مادة verbascoside (3 ملغ في اليوم) إلى علف الأرانب البرية (hares) كان لها دور في الوقاية من تأثير الإجهاد التأكسدي (Mosca *et al*, 2014).

كما بينت إحدى الدراسات أن تجريع الجرذان بمستخلص أوراق المليسة أدى إلى التحسين من القيم الحيوية الكيميائية المتعلقة بالأكسدة، حيث لوحظ حصول ارتفاع في نشاط مضادات الأكسدة الإنزيمية مثل (GPX) و(CAT) و(Gred) كما لوحظ حدوث انخفاض في نشاط إنزيم (MPO) (Pine *et al*, 2013).

وبينت دراسة أخرى تأثير مادة (verbascoside) المضافة إلى الحمية الغذائية عند صغار الأغنام الرُضّع، حيث لوحظ حدوث انخفاض في أصناف الأكسجين التفاعلية (ROS) بالإضافة إلى ارتفاع تراكيز فيتامين A وفيتامين E في الدم (Casamassima *et al*, 2013).

وأجريت دراسة عن تأثير مادة (verbascoside) على إناث البشر استمر لمدة 26 يوم، وبينت نتائج هذه الدراسة حدوث تحسّن في مستويات الهرمونات الجنسية وفي مستوى الغلوبولينات الرابطة للهرمونات الجنسية، وانخفاضاً في مستويات هرمون التستوسترون و17 بيتا استراديول لديهنّ (Mestre *et al*, 2011).

ثانياً- أهداف البحث وأهميته:

شكلت العودة لاستخدام النباتات الطبية في تجنب التأثيرات الضارة التي تحدثها المواد الدخيلة إلى جسم الإنسان أمراً لافتاً في العقود الأخيرة لما أثبتته من فعالية وذلك بالمقارنة مع المستحضرات الكيميائية التي لا تخلو من تأثيرات جانبية، ومن هنا جاءت أهمية هذا البحث في اختبار كفاءة المستخلص الإيتانولي لأحد النباتات الطبية المهمة (أوراق المليسة) بالتركيزين (250,500mg/kg/day) في العلاج من تأثير عنصر الكادميوم بالتركيز (5mg/kg/day) على بعض المعايير التكاثرية لدى ذكور الهامستر السوري.

ثالثاً-مواد البحث وطرائقه.

3-1-تربية الحيوانات وتصميم التجربة:

أجريت هذه التجربة على ذكور من الهامستر السوري الذهبي (*Mesocricetus auratus*) تراوحت أعمارها بين (6-8) أشهر، تمت تربيتها في مختبر قسم علم الحياة الحيوانية في كلية العلوم-جامعة حلب، وخضعت جميع الأفراد إلى ظروف مختبرية متشابهة، وقدّمت العليقة والماء بصورة حرّة للحيوانات، وتم توزيع الحيوانات في أقفاص بلاستيكية مغطاة بشبك معدني (50*30*20سم) وفرشت أرضية الأقفاص بنشارة الخشب وتم تبديلها بمعدّل مرة كل ثلاثة أيام.

قسّمت حيوانات التجربة البالغ عددها 28 ذكراً إلى 4 مجموعات، بمعدل 7 أفراد في كل مجموعة وذلك كما يلي:

- مجموعة الشاهد (T-C): جرّع أفرادها بمحلول فيزيولوجي (0.09%) يومياً لمدة 60 يوماً.
- مجموعة الكادميوم (T-Cd): جرّع أفرادها بتركيز (5mg/kg/day) من كلوريد الكادميوم لمدة 30 يوماً، ثم جرّعت بمحلول فيزيولوجي لمدة 30 يوماً أخرى.

- مجموعة الملّيسة (T-L1): جرّع أفرادها بكلوريد الكادميوم (5mg/kg/day) مدة (30) يوم، وفي اليوم الحادي والثلاثين تمّ تجريع هذه الأفراد بالمستخلص الكحولي لأوراق الملّيسة (250mg/kg/day) حتى اليوم (60).
- مجموعة الملّيسة (T-L2): جرّع أفرادها بكلوريد الكادميوم (5mg/kg/day) مدة (30) يوم، وفي اليوم الحادي والثلاثين تمّ تجريع هذه الأفراد بالمستخلص الكحولي لأوراق الملّيسة (500mg/kg/day) حتى اليوم (60).

3-2-مواد الدراسة:

- تم حلّ كمية محددة من محلول التجريع من مادة كلوريد الكادميوم في محلول فيزيولوجي (على سبيل المثال فإن تحضير كمية من المحلول تحوي 3.5 ملغ من كلوريد الكادميوم تكفي لتجريع مجموعة من مجموعات التجربة تضم سبعة أفراد يبلغ وزن الذكر منها 100 غ بالتركيز 5ملغ/كغ/اليوم)، وقد تم استخدام هذه الجرعة باعتبارها الجرعة المثالية غير القاتلة (Optimal Dose) (Alkhedaide *et al*, 2017).
- تم الحصول على المستخلص الإيتانولي لأوراق المليسة باستخدام جهاز المبخّر الدوّار وذلك بعد تجفيف الأوراق وطحنها ووزن كمية محددة منها، واحتفظ بالمستخلص في درجة حرارة مناسبة، وتم حساب مردود الاستخلاص بأخذ النسبة المئوية للوزن بعد الاستخلاص إلى الوزن الجاف قبل الاستخلاص وكانت قيمته 11.32%.

3-3-معايير الدراسة:

3-3-1-الدراسة الكمية:

- تم سحب الدم من التجويف الحجاجي للعين وحُفظ في أنابيب بلاستيكية لا تحوي مانع تخثر ثم خضعت للتثفيل لمدة 20 دقيقة بسرعة 3000 دورة/دقيقة بهدف الحصول على المصل الذي حفظ في درجة حرارة -20 مئوية، وأخذت الأمصال لتحليل هرمون التستوستيرون بطريقة المقايسة المناعية بالتألق الكيميائي الكهربائي (ECL: Electrochemiluminiscence) وذلك باستخدام جهاز تحليل الهرمونات (Roche, cobas e 411)، والعتيدة الخاصة بهذا بالجهاز (Ayad *et al*, 2018).
- وزنت أفراد المجموعات قبل البدء بالتجربة وعند نهايتها حيث تم الامتناع عن تقديم الطعام لمجموعات التجربة خلال الليلة الفائتة (fasted overnight)، واستؤصلت الأعضاء التكاثرية (الخصية والبربخ) وأزيلت الأجزاء الدهنية والأنسجة المحيطة بها، وتم حساب أوزان الخصى وأبعادها، ووزنت البرابخ ثم حسبت النسبة المئوية لوزن العضو نسبة إلى وزن الجسم (GSI%).
- وضعت الخصى في الفورمالين 10% من أجل إجراء المقاطع النسيجية، في حين ترك البربخ الأيسر في المحلول الفيزيولوجي من أجل دراسة معالم النطاف.

3-3-2-المعايير الوظيفية لنطاف البربخ (Physiological Parameters of Epididymis sperms):

غُمر ذيل البربخ في طبق بتري يحوي (1 مل) من محلول فيزيولوجي، وتم تقطيعه بوساطة مقص طبي دقيق وحاد إلى قطع صغيرة بمعدل 200 عملية قصّ ليتم تحرير محتواه في المحلول الفيزيولوجي، ثم أخذت قطرة من المزيج الناتج ووضعت على شريحة زجاجية تمهيداً لدراستها تحت المجهر بالتكبير (x100) حيث تمت دراسة تركيز النطاف بأخذ متوسط تعداد النطاف في عشرة حقول مجهرية اختيرت بشكل متعرج من الساحة المجهرية لكل فرد من أفراد التجربة، وتم حساب تركيز النطاف (نطفة/1 مل من المزيج) لإجراء دراسة مقارنة بين المجموعات المختلفة (Yavaşoğlu *et al*, 2008)، كما تم حساب حيوية النطاف بأخذ قطرة من المزيج السابق وخلطه مع صبغة

(eosin/nigrosin) وإجراء مسحة على الشريحة الزجاجية ثم تركها لتجفّ في الهواء، وتمّ عدّ 200 نطفة بشكل متعرج حيث بدت النطاف الميتة ملونة بالصبغة في حين لم تتلون النطاف الحية (Elangovan *et al*, 2006)، وتم حساب الحيوية بأخذ النسبة المئوية لعدد النطاف الحية إلى عدد النطاف الإجمالي، وتم استعمال ذات الشرائح التي استعملت لدراسة النسبة المئوية للنطاف الحية وقد اعتبرت النطاف التي تختلف في شكلها عن المظهر السوي للنطفة نطافاً شاذة وتضمنت (مضاعفة الذيل، ملتفة الذيل، مقطوعة الرأس، مقطوعة الذيل..)، وتم حساب 200 نطفة من كل شريحة، ثم تم حساب النسبة المئوية للنطاف الطبيعية بأخذ عدد النطاف الطبيعية إلى العدد الكلي للنطاف (Axiner *et al*, 1990)، وتم حساب النسبة المئوية للنطاف المتحركة، بأخذ قطرة من مزيج النطاف مع ذيل البربخ ووضعها على شريحة زجاجية دافئة وجافة، وتم عد 200 نطفة من كل فرد من أفراد التجربة على التكبير (x400) ثم استخرجت النسبة المئوية للنطاف المتحركة بأخذ عدد النطاف المتحركة إلى العدد الكامل للنطاف (Levine *et al*, 1992).

3-3-3-الدراسة النسيجية:

- تم تحضير المقاطع النسيجية للخصية لدى أفراد مجموعات التجربة المختلفة وفقاً لطريقة (Humason, 1967)، ثم صبغت باستخدام ملون الهيماتوكسيلين ايوزين وفحصت تحت المجهر لتحديد التغيرات النسيجية، وتم استخدام مجهر متعدد الرؤوس من نوع (OLYMPUS BX51) موصول إلى كاميرا رقمية نوع (Nikon D5100 18-55 VR KIT).
- تم قياس أقطار الأنابيب المنوية وثخانة الطبقة الظهارية للأنابيب المنوية باستخدام برنامج (Celestron Digital Imager HD)، وذلك في عشرة أنابيب منوية لكل فرد من أفراد التجربة وأُخذ المتوسط الحسابي لها.
- تم حساب أعداد الخلايا المكونة للنطاف (المنسليات المنوية Spermatogonia والخلايا المنوية Spermatocyteوالمنويات Spermatid) وكذلك أعداد خلايا سرتولي في 20 أنبوب منوي من كل فرد من أفراد التجربة، كما حسبت أعداد خلايا ليدغ المنتشرة بين كل ثلاثة أنابيب منوية وكرّرت الأخيرة في 10 قراءات باستخدام التكبير (x400) (Al-Wachi *et al*, 1986).

4-3-العمل الإحصائي:

أُجريت الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج $SPSS_{18}$ من إنتاج شركة IBM، حيث تم حساب المتوسط الحسابي والخطأ المعياري لجميع النتائج، كما تمَ استخدام اختبار تحليل التباين (One -Way ANOVA) لإظهار الفروق في قيم GSI% وأبعاد الخصى ومعايير نطاف البربخ وتركيز هرمون التستوستيرون والقياسات المورفومترية للأنابيب المنوية وتعداد الخلايا المنوية وليدغ وسرتولي لدى جميع أفراد المجموعات، حيث تكون القيمة الاحتمالية معنوية عندما ($P<0.05$)، وأُجري اختبار LSD لترتيب المجموعات التي أحدثت تحسّناً في معايير الدراسة (Afeefy *et al*, 2016).

رابعاً- نتائج البحث.

4-1-معدل وزن الأعضاء التكاثرية (الخصية والبربخ) نسبة إلى وزن الجسم:GSI%

تم حساب قيم GSI% لخصى وبرابخ المجموعات (T-C, T-Cd, T-L1, T-L2) حيث سجّل وجود فرق معنوي بينها (P<0.05)، وبيّنت نتيجة اختبار LSD أن الكادميوم يؤثر بشكل سلبي على هذه القيم، وأن للمليسة بالتركيز(500mg/kg/day) تأثير أفضل من التركيز(250mg/kg/day)، الجدول (1).

الجدول (1): متوسط قيم GSI% لدى مجموعات التجربة±الخطأ المعياري

المجموعات	T-C	T-Cd	T-L1	T-L2
GSI % الخصية	3.30±0.1	2.59±0.1	2.60±0.04	2.66±0.01
GSI %البربخ	1.65±0.07	1.23±0.03	1.25±0.05	1.27±0.01

4-2-أبعاد الخصى:

لدى إجراء دراسة إحصائية لأبعاد (طول وعرض) خصى أفراد المجموعات (T-C, T-Cd, T-L1, T-L2) تبين وجود فروق معنوية بين أطوال الخصى اليمنى (P<0.05) وعروضها (P<0.05)، ووجود فروق معنوية بين أطوال الخصى اليسرى (P<0.05) وعروضها (P<0.05)، ولتبيان المجموعات التي ظهرت فيها الفروق المعنوية تم استخدام اختبار (LSD) فكان لتجريع الكادميوم أثر سلبي على أبعاد الخصى مقارنة بالمجموعات الأخرى، بينما أدى تجريع المليسة بالتركيزين (500،250mg/kg/day) إلى تحسين قيم هذه الأبعاد، الجدول (2).

الجدول (2): متوسط أبعاد الخصى لدى مجموعات التجربة±الخطأ المعياري

المجموعات	T-C	T-Cd	T-L1	T-L2
طول الخصية اليمنى	19.40±0.31	12.66±0.08	13.10±0.09	12.86±0.12
عرض الخصية اليمنى	12.63±0.32	6.78±0.20	7.66±0.13	7.45±0.17
طول الخصية اليسرى	19.47±0.32	12.67±0.12	13.15±0.11	12.95±0.13
عرض الخصية اليسرى	12.69±0.34	6.83±0.19	7.70±0.14	7.36±0.11

4-3-تركيز هرمون التستوستيرون:

لوحظ حصول انخفاض في متوسط تركيز هرمون التستوستيرون لدى مجموعة الكادميوم (T-Cd) مقارنة مع مجموعة الشاهد (T-C)، حيث ظهر فرق معنوي(p<0.05) بين أفراد المجموعات (T-C, T-Cd, T-L1, T-L2)، ونتيجة لاستخدام اختبار LSD تبين أن للكادميوم تأثير سلبي على تركيز الهرمون، وأن للمليسة بالتركيز (250mg/kg/day) دور أفضل من التركيز (500mg/kg/day)على قيمة الهرمون، الجدول (3).

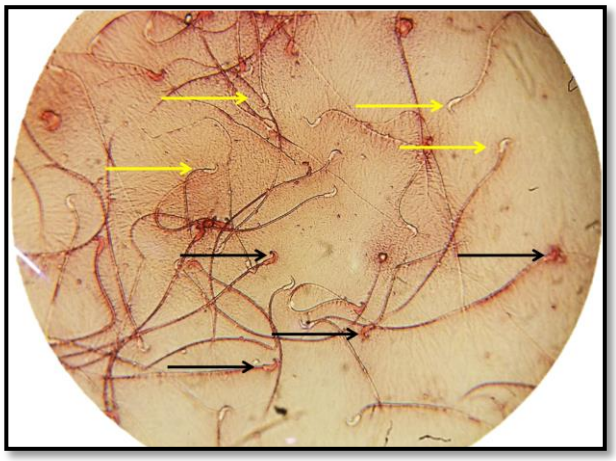
الجدول (3): متوسط تركيز التستوستيرون لدى مجموعات التجربة(ng/ml)± الخطأ المعياري

المجموعات	T-C	T-Cd	T-L1	T-L2
التركيز(ng/ml)	3.03±0.03	0.83±0.05	1.07±0.03	0.95±0.05

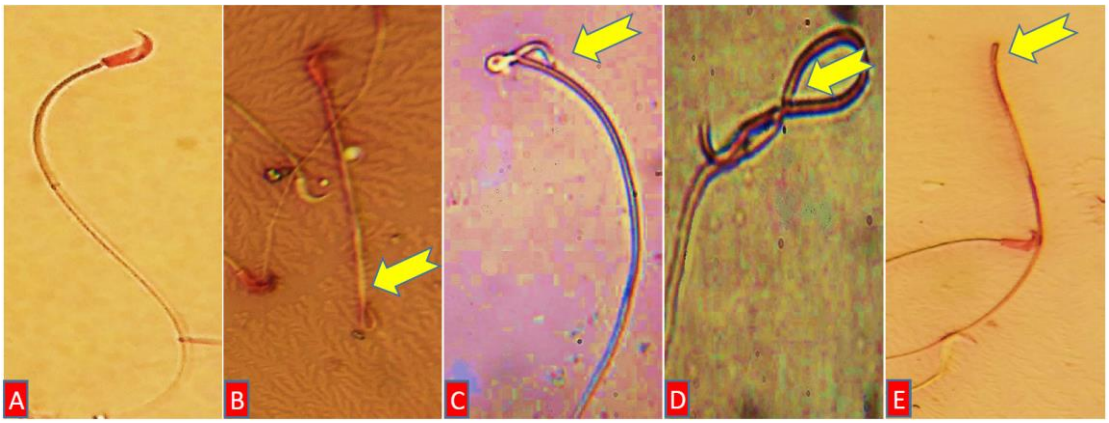
4-4-المعايير الوظيفية لنطاف البربخ:

بينت النتائج وجود انخفاض في قيمة الدلالة الإحصائية (p<0.05) في كل من اختبارات تركيز النطاف وحيوية النطاف والنسبة المئوية للنطاف الطبيعية والنسبة المئوية لحركية النطاف بين المجموعات (T-C, T-Cd, T-L1,

T-L2)، وبعد استخدام اختبار LSD وجد أن لتجريع الكادميوم دور سلبي في هذه المعايير، وقد كان لمستخلص المليسة بالتركيز (500mg/kg/day) تأثير إيجابي على تركيز النطاف يليه التركيز (250mg/kg/day)، بينما كان للتركيز(250mg/kg/day) تأثير إيجابي على اختبارات النسب المئوية لكل من النطاف الحية والنطاف الطبيعية وحركية النطاف يليه التركيز(500mg/kg/day)، الجدول (4)، ويبين الشكل (1) ساحة مجهرية للنطاف، ويبين الشكل (2) نماذج من نطاف مشوّهة.



الشكل (1): نطاف ميّتة مصبوغة الرأس بملوّن (ايوزين نيجروسين) ونطاف حيّة غير مصبوغة الرأس،400x



الشكل (2): أشكال النطاف لدى مجموعات الدراسة

A-نطفة طبيعية B-نطفة مقطوعة الذيل C-نطفة مشوّهة الجسم المتوسط D-نطفة ملتفة E-نطفة مقطوعة الرأس

الجدول (4): متوسط معايير نطاف البربخ لدى مجموعات التجربة±الخطأ المعياري

المجموعات	تركيز النطاف	حيوية النطاف %	النطاف الطبيعية %	حركية النطاف %
T-C	86.1±1.89	91.6±0.14	87.9±0.8	78.31±0.83
T-Cd	34.5±1.78	43.7±0.24	48.35±0.4	39.41±1.13
T-L1	35±0.89	45.9±0.48	56.14±0.32	52.12±0.04
T-L2	36.2±0.60	44.6±0.14	56.04±0.15	49.21±0.73

4-5-القياسات النسيجية (أقطار الأنابيب المنوية وثخانة ظهارة الأنابيب المنوية):

أظهرت نتائج دراستنا حصول انخفاض في متوسط أقطار الأنابيب المنوية وثخانة ظهارة الأنابيب المنوية لدى أفراد مجموعة الكادميوم (T-Cd) مقارنة مع مجموعة الشاهد (T-C)، وأظهر التحليل الإحصائي وجود فرق معنوي ($p<0.05$) بين المجموعات (T-C, T-Cd, T-L1, T-L2) وكان لمستخلص المليسة بالتركيز (250mg/kg/day) دور أفضل من التركيز (500mg/kg/day) في التحسين من قيم الأقطار، بينما كان للتركيز (500mg/kg/day) تأثير أكبر من التركيز (250mg/kg/day) في زيادة ثخانة ظهارة الأنابيب المنوية، الجدول (5).

الجدول (5): متوسط أقطار الأنابيب المنوية وثخانة ظهارة الأنابيب لدى مجموعات التجربة±الخطأ المعياري

المجموعات	T-C	T-Cd	T-L1	T-L2
متوسط أقطار الأنابيب المنوية (µm)	259.14±3.7	193.28±0.17	197.85±0.39	193.42±3.35
ثخانة ظهارة الأنبوب المنوي (µm)	72.14±1.68	59.57±1.28	60±0.32	61.85±1.03

4-6-تعداد خلايا السلسلة المنوية وخلايا سرتولي وليدغ:

تبيّن من خلال إجراء الدراسة الإحصائية لقيم متوسطات كل من المنسليات المنوية والخلايا المنوية والمنويات وخلايا سرتولي وخلايا ليدغ وجود فرق معنوي ($p<0.05$) بين المجموعات (T-C, T-Cd, T-L1, T-L2)، وقد كان للكادميوم تأثير سلبي على هذه الاختبارات وكان للمليسة بالتركيزين (250, 500mg/kg/day) تأثير إيجابي عليها، الجدول (6).

الجدول (6): متوسط أعداد الخلايا المنوية وليدغ وسرتولي لدى مجموعات التجربة±الخطأ المعياري

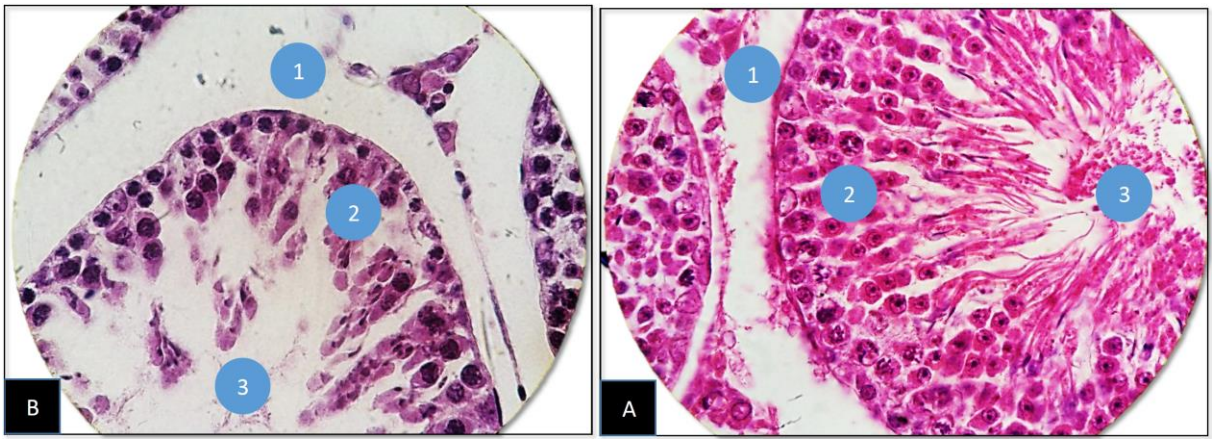
المجموعات	عدد Spermatogonia	عدد Spermatocyte	عدد Spermatid	عدد Sertoli	عدد Leydig
T-C	69±0.09	77.55±0.87	89.55±0.3	19.2±0.15	14.5±0.04
T-Cd	38.45±0.16	43.28±0.08	48.14±1.08	9.21±0.17	4.75±0.07
T-L1	41 ±0.97	47.48±1.89	55.48±0.51	9.64±0.11	7.02±0.05
T-L2	39.7±0.24	46.94±0.26	56.91±0.51	9.9±0.09	7.15±0.01

4-7-دراسة نسيج الخصية:

أظهر الفحص النسيجي بنية طبيعية للمقاطع المأخوذة من خصى أفراد مجموعة الشاهد (T-C) تمثلت بأنابيب منوية متوسعة وممتلئة بالنطاف، ويلاحظ أيضاً تكامل عملية تشكل الحيوانات المنوية spermatogenesis من حيث انتشار الخلايا المنوية الأولية primary spermatocyte والثانوية secondary spermatocyteوالمنويات spermatids والحيوانات المنوية spermsوخلايا سرتولي Sertoli cells في لمعة الأنابيب المنوية، ووجود خلايا ليدغ Leydig cells في النسيج البيني للأنابيب المنوية، الشكل (3-A).

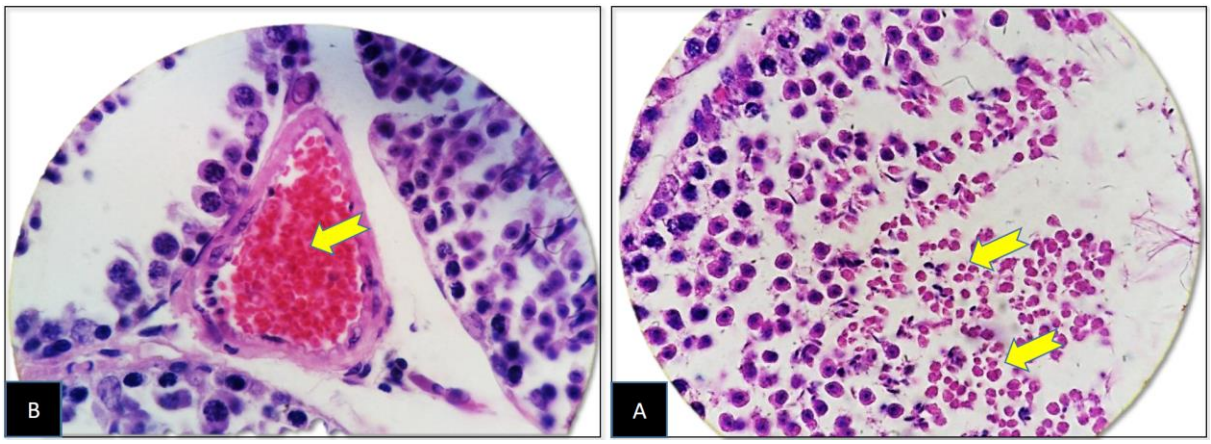
أما بالنسبة للمجموعة المجرّعة بالكادميوم (T-Cd) فلوحظ تفكّك في الخلايا المشكّلة للسلسلة المنوية، وكذلك تثبيط على نطاق واسع لعملية تشكل النطاف، حيث تظهر لمعة الأنابيب المنوية مملوءة بالحطام الخلوي مع انخفاض كبير في غزارة النطاف وتشوّه الكثير منها، كما يظهر النخر الخلوي في الخلايا داخل الأنابيب المنوية الشكل (4-A) مع انسلاخ الظهارة المنوية عن الغشاء القاعدي للأنابيب المنوية، بالإضافة إلى انخفاض كبير في غزارة خلايا ليدغ ووجود احتقان في الأوعية الدموية في الحيّز بين الأنابيب المنوية، الشكل (3-B) و(4-B).

من جهة أخرى أبدت المقاطع النسيجية لخصى أفراد المجموعتين المعالجتين بالمليسة بالتركيزين (250, 500mg/kg/day) تحسناً بسيطاً مقارنة مع مجموعة الإصابة (T-Cd) حيث ظهرت الفراغات بين الخلايا المشكّلة للسلسلة المنوية، وكان انخفاض تعداد خلايا ليدغ واضحاً بين الأنابيب المنوية، والنخر الخلوي وتشوّه النطاف وعدم الانتظام في الخلايا المنوية لا يزال ظاهراً في لمعة الأنابيب المنوية، مع تسجيل تحسّن ضعيف في عدد الخلايا المشكّلة للسلسلة المنوية والنطاف في لمعة الأنبوب المنوي، الشكل (5).



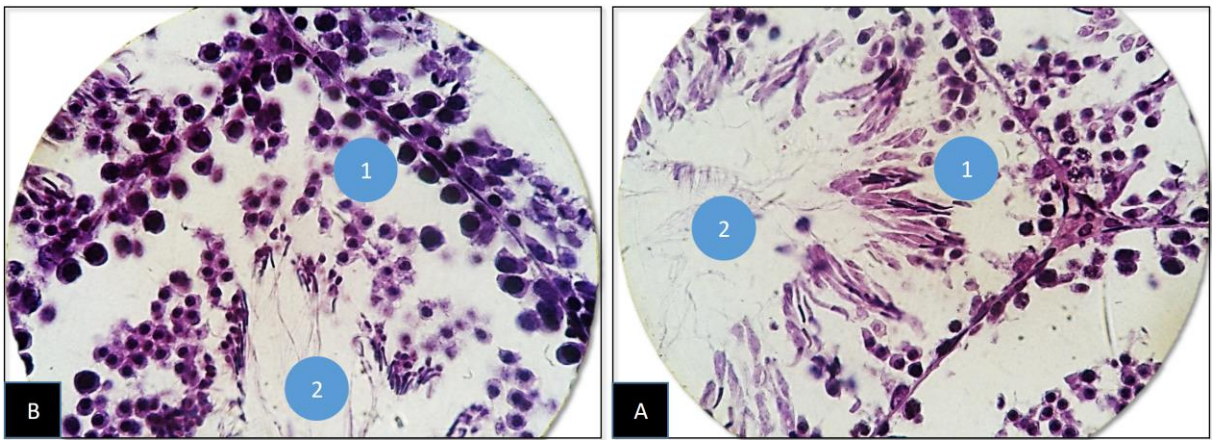
الشكل (3): مقطع نسيجي في خصية هامستر، A-مجموعة الشاهد (T-C)، B-مجموعة الكادميوم (T-Cd)

1-الحيّز بين الأنابيب المنوية الحاوي على خلايا ليدغ، 2-مراحل السلسلة المنوية، 3-لمعة الأنبوب المنوي



الشكل (4): مقاطع نسيجية في خصية من مجموعة الكادميوم (T-Cd)

A-نخر خلوي (necrosis)، B-احتقان دموي (congestion) في الحيّز بين الأنابيب المنوية



الشكل (5): مقاطع نسيجية في خصية هامستر معالج بالمليّسة، A-(250mg/kg)، B-(500mg/kg)
1-الفراغات بين مراحل السلسلة المنوية 2-لمعة الأنبوب المنوي

خامساً-المناقشة:

أدى تجريع أفراد التجربة في دراستنا الحالية بكلوريد الكادميوم (5mg/kg/day) إلى أذية واضحة في الجهاز التكاثري الذكري، وهذا ما أشارت إليه العديد من الدراسات (Othman *et al*, 2014) (Jacob *et al*, 2015) (Alkhedaide *et al*, 2017).

لوحظ حدوث انخفاض في أبعاد الخصى لدى أفراد مجموعة الكادميوم مقارنة مع مجموعة الشاهد، وقد يكون ذلك عائد إلى النخر الخلوي الذي أصاب خلايا الخصية والانخفاض الواضح في غزارة خلايا السلسلة المنوية وضعف تمايزها إلى نطاف (Wang *et al*, 2007).

كما سجّل في دراستنا هذه حصول انخفاض في قيم المعايير الوظيفية للنطاف، وربما يعزى ذلك إلى أن الكادميوم ينافس الكالسيوم على الارتباط مع كالمودولين (calmodulin)، ومن المعروف عن هذا المركب دوره المهم في التحسين من هذه المعايير، حيث تؤدي مثبطات الكالمودولين إلى انخفاض في حركة وحيوية النطاف (Schlingmann *et al*, 2007).

كما بينت نتائج دراستنا حدوث انخفاض في تركيز هرمون التستوستيرون لدى مجموعة الكادميوم، وقد يعود ذلك إلى تراكم الكادميوم في الوطاء والغدة النخامية والخصية وتأثير ذلك المحتمل على محور الوطاء -الغدة النخامية –المناسل (H-P-G) (Anunciacion *et al*, 2001) كما أشارت إحدى الدراسات إلى أن تعريض مزارع من خلايا ليدغ للكادميوم أدى إلى تثبيط نشاطها الإفرازي لهرمون التستوستيرون، وبالتالي زيادة تحرير الهرمون الموجه للغدد التناسلية من الوطاء (GnRH) (Murugesan *et al*, 2007).

وقد يعود سبب انخفاض تركيز التستوستيرون إلى حدوث اضطراب في إيقاع التحرير اليومي للنورأدرينالين (circadian pattern release) الذي يعدّ منظّماً لإفراز هرمونات الوطاء (Lafuente *et al*, 2004) ومن المحتمل أيضاً أن يعود إلى ضعف نظام إزالة الماء الأوكسجيني (H_2O_2) وتراكمه في خلايا الخصية (Diemer *et al*, 2003).

وتقترح دراسات أخرى حدوث انخفاض في مستوى إنزيم P450scc (الإنزيم الرئيس المنظّم لعملية تشكيل الستيروئيد) نتيجة معاملة حيوانات التجربة بالكادميوم، وقد يعزى انخفاضه إلى انخفاض فعالية الكوليسترول في غشاء الميتوكوندريا الداخلي، لذلك يعتقد أن الانخفاض الواضح في مستويات تعبير الـ DNA الخاص بهذا الإنزيم هو عامل إضافي يسهم في إضعاف تشكّل الهرمون الستيرويدي (Barlow *et al*, 2003) (Alkhedaide *et al*, 2017).

كما تشير دراسة أخرى إلى أن المعاملة بالكادميوم تؤدي إلى خفض تنظيم (downregulation) التعبير المورثي للإنزيمات المشاركة في عملية تشكيل التستوستيرون (3β-HSD) و(17β-HSD) و(AR) (Lin *et al*, 2006).

توافقت نتائج دراستنا النسيجية للأنابيب المنوية في خصى الأفراد المعاملة بالكادميوم مع نتائج العديد من الدراسات التي بينت حصول تراجع في بنية الوصلات الضيقة لخلايا سرتولي (tight junctions)، حيث يمنع الكادميوم تجمّع خلايا سرتولي إلى بعضها البعض مما يخلق فراغاً بينها، كما يقلّل من تركيب وتعبير البروتينات الموجودة في الوصلات الضيقة بين خلايا سرتولي مثل (Occludin, Vimentin, N-cadherin)، وقد أدت زيادة الجرعات التراكمية من الكادميوم (التركيز مضروبًا في زمن التعرض) إلى انخفاض حيوية خلايا سرتولي تلاها تلف هذه الخلايا غير القابل للإصلاح (irreversible) وموتها(Sayed *et al*, 2014) تتسبب التراكيز المنخفضة والمتوسطة من الكادميوم في أنظمة

زراعة الخلايا بحدوث الموت الخلوي المبرمج، وعند التراكيز الأعلى يصبح النخر الخلوي واضحاً، وهذا ما تمت ملاحظته عند الدراسة النسيجية للخصية لدى مجموعة الكادميوم (Zhou *et al*, 2000).

ومن بين الآليات المقترحة الأكثر انتشاراً لتفسير السمية الخلوية للكادميوم هي التغيّرات المورفولوجية والوظيفية التي يحدثها في الأوعية الدموية في الخصية والبربخ، حيث أنّ التغيرات النسيجية المسجّلة قد تعود إلى الخلل في نفاذية (permeability) الأوعية الدموية (Souza *et al*., 2010) وحدوث وذمة، ونزيف، والتهاب، ونقص أكسجة، وتنخّر خلوي في الخصية (Marettov *et al*, 2013)، وهذا يتوافق مع نتائج دراستنا التي بينت حصول أذية وعائية تمثلت بالاحتقان الدموي بين الأنابيب المنوية لخصى الأفراد المجرعة بالكادميوم.

لا يوجد حتى الآن علاج نوعي فعّال للتسمّم الحادّ بالكادميوم على الرغم من بعض الآراء التي تعتبر أن العلاج بالحقن الوريدي لمركب (EDTA) يزيد من طرح الكادميوم عن طريق البول، إلا أن الأبحاث التي تدعم دور هذا المركّب لا تزال قليلة، إضافة إلى أن المعالجة بالخلب (chelation therapy) قد تزيد من التقاط (uptake) خلايا الكلية للكادميوم مسببة بذلك حدوث سمية كلوية (nephrotoxicity) (Fulgenzi *et al*, 2010).

كما أن العلاج بالخلب في حالات التعرّض المزمن لا يزال مثار جدل بسبب طول عُمر النصف للكادميوم (half life)، إضافة إلى توزع المعدن وانتشاره في مواقع لا يمكن الوصول إليها بالمواد الخالبة إضافة إلى الألفة المرتفعة للارتباط بين الكادميوم والميتالوثيونين، لذلك يعتقد أنه لا فائدة من خلب الكادميوم بعد (24-48) ساعة من التعرّض له، وربما يفسّر هذا الأمر ضرورة اعتماد الإجراءات الوقائية كحلّ أفضل من الإجراء العلاجي، حيث أن استخدام المواد والمستخلصات كدور وقائي من سمية الكادميوم أفضل من اعتمادها للدور العلاجي وهذا ما بينته نتائج دراسة أظهرت بأنّ استخدام المستخلص الكحولي لأوراق نبات الملّيسة كدور وقائي من سمية الكادميوم حسّن من قيم هرمون التستوستيرون ومن البنية النسيجية للخصية والبربخ والقناة الناقلة للنطاف لدى أفراد الهامستر بشكل أفضل من نتائج اعتماد ذات المستخلص كعلاج في الدراسة الحالية (صلاحو وقاسم، 2020) حيث يرتبط التسمّم بالكادميوم بعدة أمور من أهمها قدرة خلايا الجسم على تخليق الميتالوثيونين وتحقيق الارتباط بينه وبين الكادميوم وبالتالي تأمين الحماية للجسم، ومن هنا تأتي أهمية تدعيم تشكيل هذا المعقد البروتيني لدى الأشخاص المحتمل تعرضهم للكادميوم وذلك كإجراء وقائي من خلال احتواء الغذاء المتناول بشكل خاص على المعادن ومضادات الأكسدة.

سادساً-قائمة المراجع.

6-1-المراجع العربية:

1- صلاحو، محمد عامر وقاسم، محمود.، "الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لنبات المليسة في الحد من التأثير السمي للكادميوم على بنية ووظيفة الجهاز التكاثري الذكري عند الهامستر السوري"، مجلة بحوث جامعة حلب، العدد141، 2020.

6-2-المراجع الإنجليزية:

1- Afeefy A, Salah M, Tolba A., "The role of vitamin E in reducing aluminum hydroxide effects on testes of albino rats: a histological and immunohistochemical study", *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 10(4):369-379, 2016.

2- Alkhedaide A, alshehri Z, Sabry A, Abdel-ghaffar T, Soliman M and Attia H., "Protective effect of grape seed extract against cadmium-induced testicular dysfunction", *Molecular medicine reports,* 13:3101-3109, 2017.

3- Al-Wachi S.N, Al-kabaasi M.F, Mahmoud F.A and Zahide Z.R., "Possible effect of nicotine on the spermatogenesis and testicular activity", *J. Bio Sci. Res*, 17:185-194, 1986.

4- Anunciacion L, Nuria M, Maria P, David P and Ana I., "Cadmium Effect on Hypothalamic- Pituitary-Testicular Axis in Male Rats", *Experimental Biology and Medicin*, 226: 605- 611, 2001.

5- Axiner E, Malqvist M, Forsberyg C and Rodringuez H., "Regginal histology of the duct epididymis in the domestic cat", *J. Report. Develop*, 45:151-160, 1990.

6- Ayad A, Mokhtar B and Benbarek, H., "The ability of human electrochemiluminescence immunoassay to measure testosterone and progesterone in plasma ovine", *Malaysian journal of veterinary research,* 9(1): 22-32, 2018.

7- Barlow N, Phillips S, Wallace D, Gaido K and Foster P., "Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate", *Toxicol Sci*, 73: 431-441, 2003.

8- Carrera Q, Funes L, Viudes L, Tur E, Micol J, Roche V, and Pons E., "Antioxidant effect of lemon verbena extracts in lymphocytes of university students performing aerobic training program", *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 22 (4): 454–461, 2012.

9- Casamassima D, Palazzo M, D'alessandro A, Colella G, Vizzarri F and Corino C., "The effects of lemon verbena (Lippia citriodora) verbascoside on the productive performance, plasma oxidative status, and some blood metabolites in suckling lambs", *J. Anim. Feed. Sci*, 22: 204–212, 2013.

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

11- Elangovan N, Chiou T, Tzeng W and Chu S., "Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice", *Toxicology*, 222: 60–70, 2006.

12- Fulgenzi A, Vietti D and Ferrero ME., "EDTA Chelation Therapy in the Treatment of Neurodegenerative Diseases", *Biomedicals*, 8:269, 2020.

13- Godt A, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A and Groneberg DA., "The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health", *J. Occup Med. Toxicol,* 1: 22, 2006.

14- Humason G.L., "Animal tissue techniques", 2nd. Ed.W.H. *Freeman and company*, San Francesco and London, P: 560-569, 1967.

15- Jacob K, Argos M and Turyk M., "Associations of lead and cadmium with sex hormones in adult males", *Environmental Research*, 142: 25–33, 2015.

16- Lafuente A, González A, Romeroa A, Canob P and Esquifino A., "Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels", *Toxicology Letters*,146: 175–182, 2004.

17- Levine R.J, Brown M.H, Bell M, Shue F, Greenberg G.N and Brodson B.L., "Air-conditioned environments do not prevent deterioration of human semen quality during the summer", *Fertil. Steril*, 57: 1065- 1083, 1992.

18- Lin T, Chien S, Hsu P and Li L., "Mechanistic study of polychlorinated biphenyl 126-induced CYP11B1 and CYP11B2 up-regulation", *Endocrinol*, 147: 1536-1544, 2006.

19- Marettov E, Maretta M and Legáth J., "Effect of Cd with or without Se supplementation on spermatogenesis and semen quality in the rooster (Gallus gallus)", *Avian Biol.Res*, 6: 275–280, 2013.

20- Mestre A, Ferrer M, Sureda A, Tauler P, Martinez E, Bibiloni M., Micol V, Tur J and Pons A., "Phytoestrogens enhance antioxidant enzymes after swimming exercise and modulate sex hormone plasma levels in female swimmers", *Eur. J. Appl. Physiol*, 111:2281–2294, 2011.

21- Mosca M, Ambrosone L, Semeraro F, Casamassima D, Vizzarri F and Costagliola C., "Ocular tissues and fluids oxidative stress in hares fed on verbascoside supplement", *Int. J. Food Sci. Nutr*, 65: 235–240, 2014.

22- Moulis JM and Thevenod F., "New perspectives in cadmium toxicity: an introduction", *Biometals*, 23: 763 -768, 2010.

23- Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K and Arunakaran J., "Effects of vitamins C and E on steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rat Leydig cells", *Toxicology*, 232:170-182, 2007.

24- Othman S, Nada A, Zaki H and Abdel Moneim E., "Effect of Physalis peruviana L. on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Rats", *Biol Trace Elem,* 159(3):278-287, 2014.

25- Pine Q, Lopez M, Funes L, Linares B, Micol V, Segura A and Gutierrez A., "Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of Lippia citriodora in rats", *Phytomedicine,* 20:1112–1118, 2013.

26- Rafiee F, Mazhari M, Ghoreishi M and Esmaeilipour O., "Effect of lemon verbena powder and vitamin C on performance and immunity of heat-stressed broilers", *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr*, 100:807–812, 2016.

27- Satarug, S, Baker JR, Urbenjapol S, Elkins MH, Reilly P, Williams D and Moore R., "A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population", *Toxicology Letters*, 137: 65-83, 2003.

28- Sayed M, Khaled M and Senosy W., "Protective effects of thymoquinone and l-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats", *Toxicology Reports*, 1:612–620, 2014,

29- Schlingmann K, Michaut M, McElwee J, Wolff C, Travis A and Turner R., "Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a Motility related calcium/calmodulin pathway", *J Androl*, 28: 706–716, 2007.

30- Siraj BP and Usha RA., "Cadmium induced antioxidant defense mechanism in fresh water teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia)", *Ecotoxicol. Environ*, 56:218 – 21, 2003.

31- Souza F, Aparecida M and Dolder H., "Testis responses to low doses of cadmium in Wistar rats", *Experimental pathology*, 19(2):125-131, 2010.

32- Termellen K., "Oxidative stress and male infertility- a clinical prespective", *Hum Reprod*, 14:243–258, 2008.

33- Wang B, Schneider S, Dragin N, Girijashanker K, Dalton T, He L, Miller M, Stringer K, Soleimani M, Richardson D and Nebert D., "Enhanced cadmium-induced testicular necrosis and renal proximal tubule damage caused by gene-dose increase in a Slc39a8-transgenic mouse line", *Am J Physiol Cell Physiol*, 292:523–535, 2007.

34- WHO., "Health risks of heavy metals from long-rang Trans boundary air pollution", *WHO Regional Office for Europe*, ISBN 978 92 890 71796, 2007.

35- Yavaşoğlu A, Karaaslan M., Uyanikgil Y, Sayim F, Ateş U and Yavaşoğlu N., "Toxic effects of anatoxin-a on testis and sperm counts of male mice", *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60: 391–396, 2008.

36- Zhou T, Zhou G, Song W, Eguchi N, Lu W, Lundin E, Jin T and Nordberg G., "Cadmium induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats", *Toxicology*, 142(1):1-13, 2000.