جامعة كربلاء

تقييم الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لنبات *Alpinia officinarum* ضد السمية التكاثرية المستحثة بـ Bisphenol في ذكور الجرذان البيض

أطروحة مقدمة إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء وهي جزء
من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة -علم الحيوان

كتبت بوساطة

مهدي حمزه خشان الجبوري

بإشراف

أ.د. رشا عبد الأمير جواد **أ.د. نصير مرزا حمزه**

2023 م **1444 هـ**

بِسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَن يَشَاءُ وَمَن يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ أُوتِيَ خَيْرًا كَثِيرًا وَمَا يَذَّكَّرُ إِلاَّ أُوْلُواْ الأَلْبَابِ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة – الآية 269

الإهداء

إلى ينابيع الرحمة الذين أخرجونا من ظَلامِ الجهلِ إلى نُورِ العِلْم...

الرسول الأكرَم وأهل بيته الغر الميامين ع

إلى مَنْ جادوا بأنفِسهم فرووا أرض المقدسات بدمائهم الزكية...

الشُّهداء الأبـرارْ(طابت أرواحهم)

إلى مصدر السعادة ونبض الحياة الذين خصهم الرحمن بأية الإحسان وجعل برهم سبيلاً لبلوغ المراتب العلى من الأيمان...

والدي (ره) ووالدتي

إلى الشموع المضيئة الذين زَهِدوا بعِلْمِهم وأفاضوا به تَفَضُّلاً وَكَرَماً...

أَساتيذي الأفاضل

إلى جميع أصحابي ورفاق دربي... إلى إخوَتيْ وأَخَواتيْ... إلى زَوْجَتيْ وأولاديْ وبَناتيْ...

أَهدي هذا الجُهد المتواضِعْ

مهدي

شُكر وَتَقّديرْ

الحَمدُ للهِ ربِ العالمينَ وأفضل الصلاة وأتم التسليم على النبي الأمين المبعوثِ رحمَةً للعالمين أبي القاسمِ مُحَمَد وعلى أهل بيتة الطيبين الطاهرين صلوات الله وسلامه عليهم أجمعين.

يَطيب لي فحراً أن أُقَدِّم شكري وامتناني إلى أستاذيَّ الفاضلين الأستاذ الدكتورة رشا عبد الامير جواد والأستاذ الدكتور نصير مرزا حمزه لتفضلها في اقتراح موضوع البحث وإشرافها المتواصل وتوجيهاتها السديدة التي أسهمت بشكل كبير في إخراج هذه الدراسة بشكلها النهائي.

كما أتقدم بشكري وامتناني إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة وشعبة الدراسات العليا وإلى رئاسة قسم علوم الحياة لجهودهم المتواصلة في تسهيل المهام وتذليل العقبات وتوفير ما يلزم من متطلبات الدراسة وأخُص بالشكر أيضاً أساتذتي في قسم علوم الحياة وجميع منتسبي القسم الذين مدّوا لي يد العون والمساعدة طوال مدة الدراسة.

وأُخلص بالشكر والتقدير إلى الأستاذ الدكتورة أشواق كاظم عبيد والأستاذ الدكتور عدنان منصور جاسم (جامعة القاسم الخضراء) لآرائهم العلمية وتوجيهاتهم القيمة, وإلى الأستاذ المساعد الدكتور مهند عبيس عبد الله (جامعة القاسم الخضراء) والمدرس محمد صالح اليعقوبي (جامعة القادسية) لمساعدتهم الكبيرة في توفير بعض مستلزمات العمل.

وأُقدم خالص شكري وثنائي إلى زملائي طلبة الدراسات العليا وأخص بالذكر منهم المدرس المساعد كرار حسين حنيت والمدرس المساعد فرح جواد كاظم والمدرس المساعد محمود نعمه حمود لما أبدوه من عون ومساعدة لإنجاز ما تم إنجازه.

مهدي

إقرار المشرف على الاطروحة

نشهد أن إعداد هذه الاطروحة الموسومة (**تقييم الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لنبات *Alpinia officinarum* ضد السمية التكاثرية المستحثة بـ Bisphenol في ذكور الجرذان البيض**) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فسلفة في علوم الحياة / علم الحيوان .

التوقيع :

الاسم : د. رشا عبد الأمير جواد

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة كربلاء

التأريخ : / 6 / 2023

التوقيع :

الاسم : د. نصير مرزا حمزه

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة كربلاء

التأريخ : / 6 / 2023

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذين المشرفين ، أحيل هذه الاطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. نصير مرزا حمزه

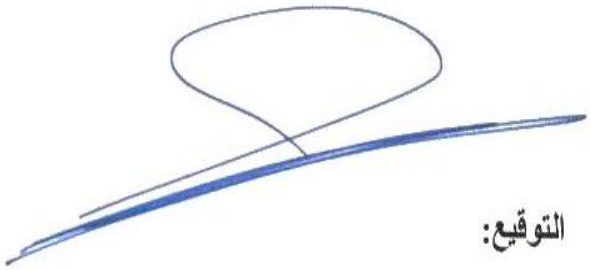
المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء

التأريخ: / 6 / 2023

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الاطروحة الموسومة بـ (**تقييم الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لنبات** ***Alpinia officinarum*** **ضد السمية التكاثرية المستحثة بـ Bisphenol في ذكور الجرذان البيض**) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.



التوقيع:

الاسم : مسلم مالك الأسدي

المرتبة العلمية: أستاذ

الجامعة والكلية: جامعة كربلاء / كلية العلوم الاسلامية

التأريخ : / 6 / 2023

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن رئيس وأعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه بأننا قد اطلعنا على الاطروحة الموسومة " **تقييم الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لنبات *Alpinia officinarum* ضد السمية التكاثرية المستحثة بـ Bisphenol في ذكور الجرذان البيض** " المقدمة من قبل الطالب (**مهدي حمزه خشان**) كجزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراة فلسفة في علوم الحياة / علم الحيوان وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل ما يتعلق بها ووجدنا انها جديرة بالقبول بتقدير (**امتياز**).

رئيس اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. أشواق كاظم عبيد
اللقب العلمي : أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: ٣ / ٧ / ٢٠٢٣

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. تحرير محمد نطاح
اللقب العلمي : أستاذ
مكان العمل : جامعة القاسم الخضراء/ كلية الزراعة
التاريخ: ٣ / ٧ / ٢٠٢٣

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. غصون غانم كطيم
اللقب العلمي : أستاذ
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية العلوم الطبية التطبيقية
التاريخ: ٣ / ٧ / ٢٠٢٣

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. محمد وسام حيدر المحنّا
اللقب العلمي : أستاذ مساعد
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: ٣ / ٧ / ٢٠٢٣

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. علي جاسم جعفر
اللقب العلمي : أستاذ مساعد
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية الطب البيطري
التاريخ: ٣ / ٧ / ٢٠٢٣

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم : د. رشا عبد الأمير جواد
اللقب العلمي : أستاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: ٣ / ٧ / ٢٠٢٣

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم : د. نصير مرزا حمزة
اللقب العلمي : أستاذ
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: ٣ / ٧ / ٢٠٢٣

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في إقرار اللجنة أعلاه

التوقيع
الاسم : د. حميدة عيدان سلمان
المرتبة العلمية: أستاذ
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: ٥ / ٧ / ٢٠٢٣

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في مختبر الدراسات العليا في قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة كربلاء للمدة من شهر شباط 2022 ولغاية شهر كانون الثاني 2023 وقد تضمنت التحليل الكيميائي النباتي للمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر Lesser Galangal (*Alpinia officinarum*) وتقييم دوره الوقائي ضد السمية التكاثرية المستحثة بالبيسفينول أ Bisphenol A (BPA) لدى ذكور الجرذان البيض.

اشتملت الدراسة على تجربتين، هدفت الأولى إلى تحديد التركيز الأكثر فعالية من بين ثلاث تراكيز آمنة للمستخلص، استعمل فيها (24) جرذاً ذكراً بالغاً من سلالة *Ratus ratus* بعمر (14) اسبوعاً تراوحت أوزانها بين (200-220) غرام وزِّعَت عشوائياً إلى أربع مجاميع (6 جرذان لكل مجموعة) تركت الأولى بدون معاملة وعدت مجموعة سيطرة، في حين جرعت المجموعات الثلاث الأخرى فموياً بأحد تراكيز المستخلص الكحولي (100, 200, 400 ملغم/كغم/يوم) ثم أعطيت بعد ساعة واحدة جرعة مفردة من البيسفينول أ (50ملغم/كغم) لمدة (30) يوماً ، بعدها تم سحب عينات الدم لتقدير نشاط أنزيم السوبر أوكسيد دسميوتيز Superoxide dismutase (SOD) الذي أعتمد كمعياراً لتحديد فعالية المستخلص.

صممت التجربة الثانية لتقييم الدور الوقائي للمستخلص بالتركيز الذي تم تحديده وفقاً لنتائج التجربة الأولى وقد استعمل فيها (30) جرذاً ذكراً بالغاً (بنفس الأعمار والأوزان أعلاه) وزِّعَت عشوائياً إلى خمس مجاميع (6 جرذان لكل مجموعة) تركت الأولى بدون معاملة وعدت مجموعة سيطرة، في حين جرعت المجاميع الثانية والثالثة والرابعة فموياً لمدة (60) يوماً بزيت الزيتون، مستخلص الخولنجان (400 ملغم/كغم)، البيسفينول أ (50 ملغم/كغم) على التوالي، أما المجموعة الخامسة فقد أعطيت مستخلص الخولنجان ثم جرعت بعد ساعة واحدة بالبيسفينول أ وعدت مجموعة وقائية.

تم تسجيل أوزان الحيوانات عند بداية ونهاية التجربة وجرت عملية التضحية بالحيوانات بعد (24) ساعة من آخر جرعة. جُمِعَت عيّنات الدم لغرض إجراء الاختبارات الكيموحيوية (مستوى هرمون التستوستيرون Testosterone (T) والهرمونين المحفز للخلايا البينية Interstitial cell stimulating hormone (ICSH) والمحفز للجريبات Follicle stimulating hormone (FSH)، مستوى المالون ثنائي ألدهايد Malondialdehyde (MDA)

والكلوتاثيون Glotathione (GSH) ونشاط أنزيم الكاتاليز Catalase (CAT) في مصل الدم) كما استُئصِلَت الخصى والبرابخ لاستعمالها في دراسة المعايير الأخرى (معالم النطف, التغيرات النسجية, تقدير تلف الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) بعد أن تم تنظيفها وأخذ أوزانها.

أظهرت نتائج الكشوفات الاستدلالية احتواء المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر على القلويدات، الستيرويدات، التربينات، الفينولات، الفلافونويدات، الصابونينات والتانينات في حين بيَّنت نتائج التقدير الكمي احتواء المستخلص على تراكيز عالية من الفينولات والفلافونويدات. كما كشفت نتائج تشخيص وفصل المركبات الفعالة باستعمال جهاز كروماتوغرافيا الغاز المدمج بمطياف الكتلة Gas Chromatography-Mass (GC-MS) Spectrometry عن وجود عدد من المركبات الفعالة التي تباينت في مساحتها وزمن احتجازها.

أشارت نتائج التجربة الأولى إلى وجود انخفاضاً معنوياً ($p<0.05$) في نشاط أنزيم الـ SOD لدى حيوانات مجموعتي المعاملة بالجرعتين 100, 200 ملغم/كغم من المستخلص مقارنة بمجموعة السيطرة التي لم يظهر اختلافاً معنوياً ($p>0.05$) بينها وبين مجموعة المعاملة بالتركيز 400 ملغم/كغم من المستخلص مما قاد إلى اعتماد هذا التركيز (400 ملغم/كغم) في التجربة الثانية لتقييم دوره الوقائي ضد السمية التكاثرية المستحثة بالبيسفينول أ.

بيَّنت نتائج التجربة الثانية وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في معدل الوزن المطلق للخصى والبرابخ , تركيز النطف في الخصية وذيل البربخ, النسبة المئوية للنطف المتحركة والنطف الحية, مستوى هرمونات التكاثر (T , ICSH , FSH) , مستوى GSH ونشاط CAT, أعداد الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي, أقطار النبيبات المنوية وسمك الطبقة الجرثومية, أقطار نبيبات ذيل البربخ وسمك النسيج الظهاري المبطن لها, وارتفاع معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف اللاسوية, مستوى MDA, أعداد النطف التي اظهرت شكل المذنب والنسبة المئوية لمحتوى الذنب من الحامض النووي منقوص الأوكسجين المتجزأ لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ مقارنة بمجموعة السيطرة, في حين لم يلاحظ اختلافاً معنوياً ($p>0.05$) في مقدار الكسب الوزني للجسم بين المجموعتين.

من جهة أخرى, أظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في معدل الوزن المطلق للخصى والبرابخ , تركيز النطف في الخصية وذيل البربخ, النسبة المئوية للنطف المتحركة

والنطف الحية، مستوى هرمون التستوستيرون والهرمونين المحفز للخلايا البينية والمحفز للجريبات، مستوى الكلوتاثيون ونشاط أنزيم الكاتليز، أعداد الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي، أقطار النبيبات المنوية وسمك الطبقة الجرثومية، أقطار نبيبات ذيل البربخ وسمك النسيج الظهاري المبطن لها، وانخفاض معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف اللاسوية، مستوى المالون ثنائي ألدهايد، أعداد النطف التي اظهرت شكل المذنب والنسبة المئوية لمحتوى الذنب من الحامض النووي منقوص الأوكسجين المتجزأ لدى حيوانات مجموعة الوقاية (المجموعة الخامسة) مقارنة بمجموعة السيطرة، كما لم يلاحظ اختلافاً معنوياً ($p>0.05$) في مقدار الكسب الوزني للجسم بين المجموعتين.

أشارت النتائج أيضاً إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مقدار الكسب الوزني للجسم، أوزان الخصى والبرابخ، تركيز النطف في الخصية وذيل البربخ، مستوى هرموني التستوستيرون والمحفز للجريبات، أعداد الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي لدى حيوانات المجموعة الثالثة المعاملة بالمستخلص لوحده مقارنة بمجموعة السيطرة في حين لم يلحظ اختلافاً معنوياً ($p>0.05$) بين المجموعتين في بقية المعايير المدروسة.

بيَّنت المقاطع النسجية وجود تغيّرات مرضيّة في أنسجة الخصية وذيل البربخ لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ مقارنة مع مجموعة السيطرة، تضمنت اتساع المسافات أو الفسح بين النبيبات المنوية، انفصال أو انسلاخ الطبقة الجرثومية عن الغشاء القاعدي مع تفككها بشكل كبير بحث انحسرت حالة الارتباط بين الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي, اختزال كمية النطف في تجاويف اغلب النبيبات المنوية، كما تضمنت عدم انتظام توزيع النبيبات البربخية مع تفكك واتساع النسيج الرابط بينها، انفصال النسيج الطلائي المبطن للنبيبات البربخية عن الغشاء القاعدي في بعض المناطق، إختزال أعداد النطف في أغلب النبيبات البربخية . بالمقابل، أظهرت المقاطع النسجية لحيوانات مجموعة الوقاية انحساراً كبيراً في التغيرات النسجية التي لوحظت في مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ.

إستُنتِجَ من الدراسة الحالية أنَّ المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر بالتركيز (400 ملغم/كغم) يمتلك القابلية على اختزال التأثيرات الضارة على الجهاز التكاثري الذكري والناجمة عن التعرض للبيسفينول أ بالتركيز (50 ملغم/كغم) وتوفير الحماية اللازمة للقيام بالوظائف المطلوبة عن طريق تأثيره المباشر وفعاليته المضادة للأكسدة.

قائمة المحتويات List of contents

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	I
	قائمة المحتويات	IV
	قائمة الجداول	X
	قائمة الأشكال	XII
	قائمة الصور	XIII
	قائمة المختصرات	XV
الفصل الأول: المقدمة		
1-1	المقدمة	1
2-1	الهدف من الدراسة	3
الفصل الثاني: استعراض المراجع		
1-2	المواد المسببة لاضطرابات الغدد الصم	4
2-2	البيسفينول أ Bisphenol A	4
1-2-2	الخصائص الفيزيائية والكيميائية للبيسفينول أ	6
2-2-2	التعرض البشري للبيسفينول أ	7
3-2-2	التأثيرات الصحية للبيسفينول أ	9
4-2-2	آليات تأثير البيسفينول أ على خصوبة الذكور	12
3-2	الاجهاد التأكسدي	15
1-3-2	توليد أنواع الأوكسجين الفعّالة في النطفة	16
2-3-2	مصادر أنواع الأوكسجين الفعّالة في البلازما المنوي	16
3-3-2	التأثيرات الفسلجية والامراضية لـ ROS على وظائف النطفة	18

4-3-2	مضادات الاكسدة	21
4-2	نبات الخولنجان الأصغر	22
1-4-2	تصنيف النبات	23
2-4-2	وصف النبات	23
3-4-2	المركبات الكيميائية في الخولنجان	24
4-4-2	استعمالات نبات الخولنجان الاصغر	25
5-4-2	الفعالية الدوائية للخولنجان الاصغر	26
6-4-2	تقييم السمّية والسلامة لنبات الخولنجان	28
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل		
1-3	المواد	29
1-1-3	المواد الكيميائية	31-29
2-1-3	الأجهزة والأدوات المختبرية	32-31
3-1-3	حيوانات التجربة	32
4-1-3	جمع النبات وتصنيفه	33
2-3	طرائق العمل	33
1-2-3	تحضير المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان	33
2-2-3	الكشوفات النوعية والكمية عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر.	33
1-2-2-3	الكشوفات التمهيدية الاستدلالية عن المركبات الفعالة	33
2-2-2-3	التقدير الكمي للمحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر.	35
3-2-2-3	تشخيص وفصل المركبات الفعالة في مستخلص الخولنجان بواسطة جهاز GC-MS.	35

3-2-3	تصميم تجارب الدراسة	36
4-2-3	مجاميع حيوانات التجربة	38
5-2-3	التضحية بالحيوانات وجمع عينات الدم	39
6-2-3	دراسة معايير النطف	39
1-6-2-3	أعداد النطف في الخصية	39
2-6-2-3	أعداد النطف في ذيل البربخ	40
3-6-2-3	النسبة المئوية للنطف المتحركة	40
4-6-2-3	النسبة المئوية للنطف الحية	40
5-6-2-3	النسبة المئوية للنطف اللاسويَّة	40
7-2-3	تقدير مستويات الهرمونات	41
1-7-2-3	تقدير مستوى هرمون الشحمون الخصوي	41
2-7-2-3	تقدير مستوى الهرمون المحفز للخلايا البينية	42
3-7-2-3	قياس مستوى الهرمون المحفز للجريبات	44
8-2-3	تقدير مستويات عوامل الاكسدة ومضادات الاكسدة في المصل	45
1-8-2-3	تقدير مستوى المالون ثنائي ألدهايد	45
2-8-2-3	تقدير مستوى الكلوتاثيون في المصل	46
3-8-2-3	تقدير فعالية أنزيم الكاتليز	49
9-2-3	الجانب النسجي	50
1-9-2-3	تحضير المقاطع النسجية	50
2-9-2-3	الفحص والتصوير المجهري	52
3-9-2-3	حساب معدل أعداد الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي في النبيبات الناقلة للمني.	52

4-9-2-3	القياسات النسجية	52
1-4-9-2-3	قياس أقطار النبيبات الناقلة للمني وسمك الطبقة الجرثومية	52
2-4-9-2-3	قياس أقطار نبيبات ذيل البربخ وسمك الطبقة الظهارية	52
10-2-3	تقدير الضرر في الحامض النووي للنطف	53
11-2-3	التحليل الاحصائي	54
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
1-4	الكشوفات النوعية والكمية والتشخيصية عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر	55
1-1-4	الكشوفات التمهيدية الاستدلالية عن المركبات الفعّالة	55
2-1-4	التقدير الكمي للمحتوى الكلي من الفينولات والفلافونويدات	55
3-1-4	تشخيص وفصل المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لنبات الخولنجان الأصغر بواسطة جهاز GC-MS.	56
2-4	(التجربة الاولى) : تحديد التركيز الأكثر فعالية لمستخلص رايزومات نبات الخولنجان الأصغر	57
3-4	التجربة الثانية : تقييم الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان (400 ملغم/كغم) ضد السمية التكاثرية المستحثة بالبيسفينول أ لدى ذكور الجرذان البيض	58
1-3-4	التغيرات الوزنية	58
1-1-3-4	التغيّر في وزن الجسم	58
2-1-3-4	التغيّر في وزن الخصية والبربخ	58
2-3-4	التغيرات في معالم النطف	61
1-2-3-4	أعداد النطف في الخصية	61
2-2-3-4	تركيز النطف في ذيل البربخ	61

3-2-3-4	النسبة المئوية للنطف المتحركة	61
4-2-3-4	النسبة المئوية للنطف الحية	61
5-2-3-4	النسبة المئوية للنطف اللاسوية	62
3-3-4	التغيرات في مستويات هرمونات التكاثر	64
1-3-3-4	مستوى هرمون التستوستيرون	64
2-3-3-4	مستوى الهرمون المحفز للخلايا البينية	65
3-3-3-4	مستوى الهرمون المحفز للجريب	65
4-3-4	تقدير مستويات المؤكسدات ومضادات الاكسدة	67
1-4-3-4	مستوى المالون ثنائي الالديهايد	67
2-4-3-4	مستوى الكلوتاثيون	67
3-4-3-4	مستوى نشاط الكاتليز	67
5-3-4	الجانب النسجي	70
1-5-3-4	معدل أعداد الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي	70
1-1-5-3-4	معدل أعداد سليفات النطف	70
2-1-5-3-4	معدل أعداد الخلايا النطفية	70
3-1-5-3-4	معدل أعداد أرومات النطف	71
4-1-5-3-4	معدل أعداد خلايا سرتولي	71
2-5-3-4	القياسات النسجية	72
1-2-5-3-4	معدل أقطار النبيبات الناقلة للمني	72
2-2-5-3-4	ارتفاع الطبقة الجرثومية للنبيبات الناقلة للمني	73
3-2-5-3-4	معدل أقطار نبيبات ذيل البربخ	73
4-2-5-3-4	سمك الظهارة المبطنة لنبيبات ذيل البربخ	73

3-5-3-4	التغيرات النسجية - المرضية	76
1-3-5-3-4	التغيرات النسجية – المرضية في الخصى	76
2-3-5-3-4	التغيرات النسجية في ذيل البربخ	80
6-3-4	التغيرات في الحامض النووي	84
الفصل الخامس: الاستنتاجات والتوصيات		
1-5	الاستنتاجات	90
2-5	التوصيات	91
الفصل السادس : المصادر		
1-6	**المصادر العربية والأجنبية**	92
	الملاحق	138
	الخلاصة باللغة الإنكليزية	A-C

قائمة الجداول List of table

رقم الجدول	اسم الجدول	رقم الصفحة
1-3	المواد الكيميائية المستعملة والشركات المجهزة لها.	31-29
2-3	الأجهزة والأدوات المستعملة والشركات المجهزة لها.	32-31
3-3	ظروف الفصل لكروماتوكرافيا الغاز المدمج بمطياف الكتلة	36
1-4	الكشوفات التمهيدية الإستدلالية عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر.	55
2-4	المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر.	56
3-4	المركبات الفعالة المشخصة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر باستخدام جهاز GC-MS	56
4-4	تأثير ثلاثة تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر على مستوى نشاط أنزيم SOD في مصل الدم.	57
5-4	تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) في وزن الجسم وأوزان الخصى والبرابخ	59
6-4	تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر(400 ملغم/كغم) في معايير النطف	62
7-4	تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) في مستوى هرمون التستوستيرون, الهرمون المحفز للخلايا البينية, والهرمون المحفز للجريبات.	65
8-4	تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) في مستوى المالون ثنائي ألدهايد, مستوى الكلوتاثيون ومستوى نشاط أنزيم الكاتليز في مصل الدم	67

9-4	تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) في أعداد سليفات النطف, الخلايا النطفية, أرومات النطف وخلايا سرتولي	71
10-4	تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) في أقطار النبيبات الناقلة للمني, سمك الطبقة الجرثومية للنبيبات المنوية, أقطار نبيبات ذيل البربخ وسمك الطبقة الظهارية لنبيبات ذيل البربخ	74
11-4	تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر(400 ملغم/كغم) في مقدار الضرر في الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA	85

قائمة الأشكال List of figures

رقم الشكل	اسم الشكل	رقم الصفحة
1-2	التركيب الكيميائي لمركبات : diethylstilbestrol والبيسفينول أ والاستراديول .	6
2-2	التعرض البشري للبيسفينول وعمليات الايض الخاصة به	8
3-2	تمثيل تخطيطي لإطلاق البيسفينول أ من البيئية وقدرته المخلة بالغدد الصماء على المستوى الخلوي	10
4-2	توليد أنواع الأوكسجين الفعّالة في النطفة	16
5-2	تأثير الاجهاد التاكسدي في التكاثر الذكري	19
1-3	تصميم التجربة	37
2-3	المنحنى القياسي لتقدير تركيز هرمون الشحمون الخصوي T	42
3-3	المنحنى القياسي لتقدير تركيز الهرمون المحفز للخلايا البينية	43
4-3	المنحنى القياسي لتقدير تركيز الهرمون المحفز للجريبات	45
5-3	المنحنى القياسي لتقدير تركيـــــز الكلوتاثيون GSH	48

قائمة الصور List of photo

رقم الشكل	اسم الشكل	رقم الصفحة
1-2	نبات الخولنجان الأصغر	23
1-4	مقطع مستعرض في خصية جرذ من مجموعة السيطرة.	77
2-4	مقطع مستعرض في خصية جرذ من مجموعة المعاملة بزيت الزيتون.	78
3-4	مقطع مستعرض في خصية جرذ من مجموعة المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر(400 ملغم/كغم).	78
4-4	مقطع مستعرض في خصية جرذ من مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (50 ملغم/كغم)	79
5-4	مقطع مستعرض في خصية جرذ من مجموعة الوقاية المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) ثم بيسفينول أ (50 ملغم/كغم)	79
6-4	مقطع مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة السيطرة	80
7-4	مقطع مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بزيت الزيتون.	81
8-4	مقطع مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم).	81
9-4	مقطع مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (50 ملغم/كغم)	82
10-4	مقطع مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة الوقاية المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) ثم بيسفينول أ (50 ملغم/كغم)	82
11-4	صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة السيطرة.	85

12-4	صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بزيت الزيتون.	86
13-4	صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم).	86
14-4	صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (50 ملغم/كغم).	87
15-4	صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) ثم بيسفينول أ (50 ملغم/كغم).	87

List of abbreviation قائمة المختصرات

الاختصار	المصطلح
8-OHdG	8-hydroxy-2′- deoxyguanosine
ANOVA	Analysis of Variance
β	Beta
BPA	bisphenol A
CRP	C Reactive Protein
CAT	Catalase
DES	diethylstilbestrol
DHT	Dihydrotestosterone
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTNB	5,5 Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
EDC	Endocrine disrupting chemicals
ELIZA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E2	estradiol
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid
FSH	Follicle stimulating hormone
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
GSH	Glutathione
GPX	Glutathione peroxidase
HSV-1	Herpes Simplex Virus-1

INSL3	Insulin-like peptide 3
ICSH	Interstitial Cell Stimulating Hormone
LSD	Least Significant difference
LPO	Lipid peroxidation
MDA	Malondialdehyde
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NP	nonylphenol
OD	Optical Density
OS	Oxidative Stress
PFAS	perfluoroalkyl chemicals
PCOS	polycystic ovarian syndrome
PUFA	polyunsaturated fatty acids
PKA	Protein Kinase A
RNS	Reactive Nitrogen spicies
ROS	Reactive Oxygen Species
RSV	respiratory syncytial virus
SPSS	Statistical package for the Social Sciences
SDS	sulfate Sodium dodecyl
SOD	superoxide dismutase
T	Testosterone

TBA	Thiobarbituric acid
TCA	trichloroacetic acid
TNB	5-(Thio-2-nitrobenzoic acid)
USEPA	U.S. Environmental Protection Agency
UGT2B15	UDP-glucuronosyltransferases 2B15

1-1. المقدمة Introduction

أخذت خصوبة الذكور بالتدهور في جميع أنحاء العالم منذ فترة طويلة وبشكل خاص في الولايات المتحدة الامريكية ودول أوروبا وأستراليا بسبب وجود المواد الكيميائية المسببة لاضطرابات الغدد الصماء Endocrine disrupting chemicals (EDC) في المجتمعات البشرية أو الحيوانية إذ أن تعرض الإنسان للمواد الكيميائية الثابتة وغير الثابتة يرتبط بشكل كبير باضطرابات الغدد الصماء (Ješeta *et al.*, 2021).

تمثل المواد الكيميائية المسببة لاضطراب الغدد الصماء (EDC) مجموعة واسعة من المواد الخارجية من صنع الإنسان والتي يمكن أن تتداخل مع استتباب جهاز الغدد الصماء وتنظيم عملية النمو (Sifakis *et al.*, 2017 ; Dziewirska *et al.*, 2018)، فيما عرفها Ma وجماعته (2019) بأنها مجموعة من المواد الكيميائية الطبيعية أو الاصطناعية تتكون خارج الجسم وتتداخل مع الإنتاج ، التحرير ، النقل ، الأيض ، الارتباط ، الفعل البيولوجي ، أو الاقصاء للهرمونات المسؤولة عن ادامة الاستتباب وتنظيم التطور. تستعمل تلك المواد في تصنيع العديد من المنتجات كاللدائن ومبيدات الآفات (Brehm & Flaws, 2019) وتؤثر على الكائن الحي نتيجة التعرض المستمر لها سواءً بالاستنشاق أو البلع أوالتلامس الجلدي (Gore *et al.*, 2015a).

ترتبط الـ EDC بتغيير الوظيفة التكاثرية في الذكور والإناث من البشر والحيوانات (Rattan *et al.*, 2017 ; Sifakis *et al.*, 2017) عن طريق تأثيرها على تطور نسيج الخصية ، التأثير على مستقبلات الاستروجين والأندروجين ، التأثير فوق الجيني epigenetic المحتمل ، أو التأثير المباشر على النطف وخلايا أنسجة الخصية الأخرى فضلاً عن إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) Reactive Oxygen Species وقد تبين إن زيادة حالات العقم عند الذكور مرتبطة بالتعرض للمواد الكيميائية الثابتة وغير الثابتة التي تسبب اضطرابات الغدد الصماء كالبيسفينولات ومواد البيرفلوروألكيل perfluoroalkyl chemicals (PFAS) (Ješeta *et al.*, 2021) إذ يعد كل من البيسفينول أ (BPA) و النونيلفينول nonylphenol (NP) من المواد المعروفة بتقليد نشاط الأستروجين (Ding *et al.*, 2019).

البيسفينول أ مادة كيميائية شائعة الاستخدام في المجال الصناعي لذا يتعرض لها الإنسان بشكل متكرر ومن المتوقع أن تتداخل مع الوظائف الكيميائية لمستقبلات هرمون الاستروجين (Nuñez *et al.*, 2021) وعلى الرغم من توفر منتجات خالية من BPA إلا أنه لا يزال موجوداً بشكل عام في

المنتجات الاستهلاكية (Ma *et al.*, 2019) ومنها يتسرب إلى البيئة بما في ذلك التسرب إلى الماء والغذاء والهواء وقد تم الكشف عنه في البول والدم وحليب الأم (Azzouz *et al.*, 2016).

بيَّنت احدى الدراسات إن التعرض للـ BPA بتراكيز منخفضة يؤدي الى مجموعة من الاستجابات الاستروجينية الخلوية ذات كفاءة وقوة مساوية أو أكبر من الاستراديول في حد ذاته. بهذا المعنى ، يمكن أن يؤثر الـ BPA بشكل مباشر على وظيفة الغدد الصماء ويسبب تأثيرات فسيولوجية في الأعضاء المستهدفة (Ma *et al.*, 2019).

من المعروف أن التعرض BPA يزيد انتاج ROS كجذور الهيدروكسيل وبيروكسيد الهيدروجين وأنيون الأوكسيد الفائق في الجسم (Ho *et al.*, 1998) لذا يتسبب بإحداث السمية الإنجابية وإضعاف عملية تكوين الحيوانات المنوية عن طريق إنتاجه لتلك الأنواع وإضعافه لمضادات الأكسدة الطبيعية (Hales *et al.*, 2005) .

تُستعمل الأعشاب الطبية التقليدية على نطاق واسع في أجزاء مختلفة من العالم وربما تكون مصدراً بديلاً للطب لتحسين حالات العقم وقد شغلت اهتمام العلماء في الوقت الحاضر نظراً لقلة أو انعدام آثارها الجانبية (Rabeh, 2016)، كما إن العلاجات التقليدية القائمة على إعطاء محرضات أو مناهضات موجهات المناسل Gonadotropins والأندروجين ليست فعالة في علاج الرجال الذين يعانون من انخفاض جودة السائل المنوي (Madhukar & Rajender, 2009 ; Patel *et al.*, 2019) ولا تزال إدارة هؤلاء المرضى تمثل تحدياً حتى اليوم إذ يوجد ما يقارب 30-40٪ من الرجال المصابين بالعقم يبحثون عن خيارات علاج بديلة كالمغذيات، المكملات الغذائية، المنتجات الصحية الطبيعية والطب النباتي (Ly *et al.*, 2015 ; Pramodh, 2021) .

يعد نبات *Alpinia officinarum* (الخولنجان الأصغر Lesser galangal) من أبرز أنواع العائلة الزنجبيلية Zingiberaceae وقد أخذ حيزاً من اهتمام الباحثين لما يتمتع به من كيميائية نباتية وفعالية دوائية إذ تم التعرف على أكثر من 90 مركب كيميائي وعزلها منه وقد اشتملت على عدد كبير من الفينولات ومركبات الـ diarylheptanoids المعزولة من الرايزومات والتي تعد أكثر المكونات نشاطاً حيوياً. يستخدم الخولنجان الأصغر تقليدياً منذ عقود عديدة في علاج كثير من الحالات إذ يتم إعداده في آسيا وتركيا والمغرب وإيران على شكل مغلي أو عصير أما بمفرده أو بالاشتراك مع أعشاب أو أطعمة أو مشروبات أخرى لعلاج مشاكل الصحة العامة بما في ذلك البرد والالتهابات واضطرابات الجهاز الهضمي (Abubakar *et al.*, 2018)، كما أشارت الدراسات الحديثة إلى أهمية مستخلصات رايزومات الخولنجان الأصغر، نتيجة لتأثيراتها المضادة للأكسدة

والالتهابات، في تحسين الإجهاد التأكسدي Oxidative stress (OS) الذي ينتج عن استخدام الأدوية أو الاصابة بأمراض مختلفة والذي يؤثر بشكل كبير على الكثير من أعضاء الجسم (Bebars *et al.*, 2021; Heidari *et al.*, 2021) .

2-1: الهدف من الدراسة

هدفت الدراسة الحالية إلى :

1- الكشف العام عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات *A. officinarum*

2- تقييم الدور الوقائي للمستخلص ضد التغيرات السمية في الجهاز التكاثري والناجمة عن المعاملة بمادة البسفينول أ.

3- تقييم كفاءة المستخلص على تحسين وظائف الجهاز التكاثري لذكور الجرذان البيض.

المعايير المدروسة :

1- **الأوزان :** عن طريق تقدير الكسب الوزني للجسم والأوزان المطلقة للخصى والبرابخ.

2- **معايير النطف :** عن طريق حساب أعداد النطف في الخصية والبربخ , والنسبة المئوية للنطف المتحركة والنطف الحية والنطف اللاسوية في ذيل البربخ.

3- **الهرمونات :** عن طريق تقدير مستويات هرمون الشحمون الخصوي Testosteron (T) والهرمونين المحفز للخلايا البينية Interstitial cell stimulating hormone (ICSH) والمحفز للجريبات Follicle stimulating hormone |(FSH) في مصل الدم.

4- **عوامل الأكسدة ومضادات الأكسدة :** عن طريق تقدير مستوى المالون ثنائي ألدهايد Malondialdehyde (MDA) والكلوتاثيون Glotathione (GSH) ونشاط أنزيم الكاتليز Catalase (CAT) في مصل الدم.

5- **الجانب النسجي:**

- حساب أعداد الخلايا المولدة للنطف (سليفات النطف، الخلايا النطفية، أرومات النطف) وخلايا سرتولي) في النبيبات المنوية.
- قياس معدل أقطار النبيبات الناقلة للمني ومعدل سمك الطبقة الجرثومية
- قياس معدل أقطار نبيبات ذيل البربخ ومعدل سمك البطانة الظهارية.
- دراسة التغيرات النسجية – المرضية في الخصية والبربخ

6- **تقدير درجة تلف الحامض النووي DNA** : عن طريق اختبار المذنب Comet Assay.

2. استعراض المراجع Literature Review

2-1.المواد المسببة لاضطراب الغدد الصم Endocrine Disrupters Chemicals (EDC)

يتعرض البشر لمجموعة متنوعة من المواد الكيميائية التي لديها القدرة على إحداث خلل في استتباب جهاز الغدد الصم يطلق عليها المواد المسببة لاضطراب الغدد الصم (EDC) وخاصة في البلدان التي تعاني عن وفرة في وجود تلك المواد ويكون الجهاز التناسلي الذكري من أكثر الاجهزة عرضة لتأثيرات أنواعها الثابتة persistent كمواد البريفلوروالكيل(PFAS) perfluoroalkyl وغير الثابتة nonpersistent كالبيسفينولات bisphenols, وقد أشارت العديد من الدراسات إلى الارتباط بين انخفاض معايير السائل المنوي والتعرض القصير أوطويل الأمد للعديد من المواد المسببة لاضطراب الغدد الصماء (Levine *et al.*, 2017; Rehman *et al.*, 2018) .

يمكن لهذه المجموعة من المواد الكيميائية أن تعمل كمنبهات أو مناهضات لمستقبلات الهرمونات وبذلك يمكن أن تؤثر بشكل كبير على عدد من العمليات الفسيولوجية وقد تؤثر سلبًا على التكاثر البشري عن طريق التأثير على تطور الغدد التناسلية وتكوين الأمشاج والتطور اللاحق للأجنة ويمكن أن تمتد الآثار السلبية لمسببات اضطراب الغدد الصم على التكوُّن الجيني للحيوانات المنوية وخصوبة الذكور بشكل عام (Ješeta *et al.*, 2021) .

تدخل المواد المسببة لاضطراب الغدد الصم إلى البيئة في المقام الأول عن طريق مياه صرف الأنشطة الصناعية ومياه ري المناطق الزراعية وحرق النفايات وإلقائها في البيئة، ويمكن أن يتعرض الإنسان لهذه المواد عند تناول الأغذية وشرب المياه واستنشاق الغبار والغازات والجسيمات في الهواء وملامسة تلك المواد للجلد (Hotchkiss *et al.*,2008) .

يشتبه بوجود حوالي ألف مادة كيميائية تتداخل مع وظائف الغدد الصماء وتعد البيسفينولات، الفثالات, مواد البيرفلورو ألكيل ومواد البولي فلورو ألكيل ذات أهمية خاصة فيما يتعلق بالعقم عند الذكور(Radke *et al.*, 2018; Ješeta *et al.*, 2019a) .

2-2. البيسفينول أ Bisphenol A (BPA)

البيسفينول أ (BPA) مادة كيميائية تم استخدامها لأكثر من (50) عاماً في مجموعة متنوعة من التطبيقات الصناعية لإنتاج البولي كربونات وراتنجات الايبوكسي والبوليمرات الأخرى إذ تعد من بين أكثر المواد الكيميائية المنتجة في جميع أنحاء العالم (Lehmler *et al.*, 2018)، وقد اكتسب أهمية كبرى نظراً لفرصه العالية للتعرض البشري وإصابة الأفراد بالأمراض المختلفة حتى عند تراكيز منخفضة للغاية (Khan *et al.*,2021)، وتم تصنيعه بوساطة Alexander Dianin وهو

متاح تجارياً منذ عام 1957 (Hoque, 2019). زاد إنتاجه العالمي تدريجيًا من (5 – 8) ملايين طن متري خلال الفترة 2010-2016 (Experts, 2016 ; Staples *et al.*, 2018) إذ كانت نسبة الزيادة في الانتاج بمقدار 37٪ و 84٪ في الولايات المتحدة الامريكية وأوروبا على التوالي خلال الفترة من 1995 إلى 2014 وتحققت معظم الزيادة في الإنتاج بين عامي 1995 و 2000 (Staples *et al.*, 2018) .

يعد البيسفينول أ الآن أحد أكثر المواد الكيميائية استخداماً في العالم لتصنيع المواد الاولية التي تدخل في صناعة المنتجات الاستهلاكية كعلب الطعام والمشروبات, الحاويات البلاستيكية, زجاجات الأطفال والماء, المعدات الرياضية, الأقراص المدمجة, الأجهزة الطبية, الإلكترونيات المنزلية (Manfo *et al.*, 2014 ; Huo *et al.*, 2015)، الطلاء الورقي، المواد اللاصقة ومانعات التسرب للأسنان (Alabi *et al.*, 2019).

يوجد البيسفينول أ في المكونات البيئية غير الحية , كالهواء (Hines *et al.*, 2017) ، التربة (Chakraborty *et al.*, 2019a)، الرواسب (Chakraborty *et al.*, 2019b)، الماء (Santhi *et al.*, 2012) والغذاء (Vandenberg *et al.*, 2007)، كما يوجد في أجسام الكائنات الحية كالبشر والحيوانات البرية (Corrales *et al.*,2015) والمائية (Canesi and Fabbri, 2015) إذ تم العثور عليه في أنسجة المشيمة وسوائل الجسم كالبلازما ودم الحبل السري ولبن الام (Loganathan and Kannan, 2011) .

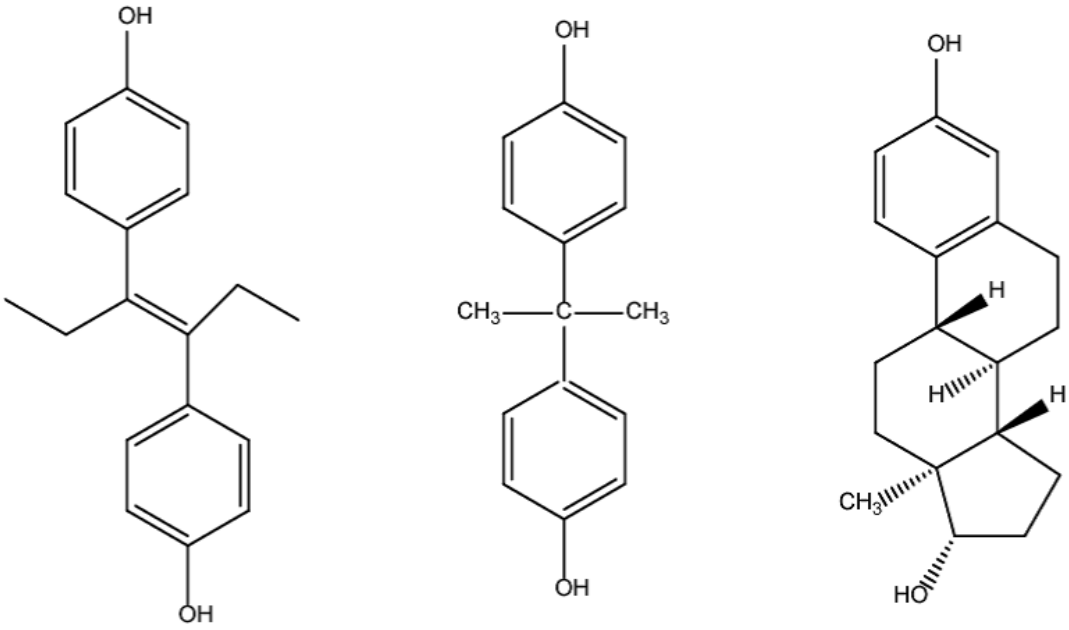
أشار Mohapatra وجماعته (2010) إلى أن المصادر الأساسية لـ BPA هي النفايات السائلة من الصناعة التحويلية، مياه الصرف الصحي، محطات معالجة مياه الصرف الصحي، الرشح من مدافن النفايات، مياه الأنهار والمياه الجوفية في حين أشار Xue و Kannan (2019) إلى أن كفاءة الازالة السلبية لمحطات معالجة مياه الصرف الصحي قد تكون ناتجة عن تحلل الجسيمات البلاستيكية الحاوية على مشتقات مختلفة من البسفينول.

تتواجد مادة البيسفينول أ في الغلاف الجوي على الرغم من كونها مادة منخفضة التطاير عن طريق الالتصاق بالجسيمات الدقيقة particular matter (Graziani *et al.*, 2019) وقد أشارت وكالة حماية البيئة الامريكية U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) (2018) إلى أن الجسيمات الدقيقة عبارة عن مزيج من الجسيمات الصلبة (الغبار أو الأوساخ أو السخام أو الدخان) والقطرات السائلة في الهواء ويتم ربط BPA بسهولة بالجسيمات الصلبة. لوحظت مستويات عالية

من BPA في قناني مياه الشرب المعرضة لأشعة الشمس مما يؤكد انتقاله من المنتجات البلاستيكية إلى الماء (Elobeid *et al.*, 2012).

1-2-2. الخصائص الفيزيائية والكيميائية للبيسفينول أ

البيسفينول أ مركب عضوي صلب صيغتة الكيميائية $(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$, وزنه الجزيئي 228.29 غم/مول، درجة انصهاره تتراوح بين 150-155 درجة سيليزية وكثافته 1.20غم/سم^3 له قابلية ذوبان قليلة في الماء في حين أنه قابل للذوبان تماماً في المذيبات العضوية (Kubwabo *et al.*,2009) . يوجد BPA على شكل بلورات بيضاء أو حبوب أو رقائق ولا يوجد حراً في الطبيعة وعندما يتعرض للهواء يخضع لأكسدة ضوئية وتدهور ينتج عنه عمر نصف منخفض (0.2 يوم) في حين أن عمر النصف له في الرواسب يبلغ 340 يوم وهو الاعلى مقارنة بالماء (38 يوم) والتربة (75 يوم) (Corrales *et al.*, 2015). يتكون BPA من تكثف الفينول مع الاسيتون ويمتلك ضغط بخار واطئ وقابلية تبخر منخفضة (Shareef *et al.*, 2006) ويحتوي هيكله البنائي على حلقتين غير مشبعتين من الفينول كما في diethylstilbestrol (DES) (Fenichel *et al.*, 2013) ويوضح الشكل (2-1) التركيب الكيمائي لمركبات BPA , DES والاستراديول estradiol (E2) (Vandenberg *et al.*,2009).



شكل (2-1) التركيب الكيميائي لمركبات diethylstilbestrol (DES) والبيسفينول أ Bisphenol A (BPA) والاستراديول estradiol (E2) (Vandenberg *et al.*,2009).

2-2-2. التعرض البشري للبيسفينول أ

يتم التعرض البشري للبيسفينول عن طريق ثلاثة مسارات رئيسة هي الابتلاع والتلامس الجلدي والاستنشاق (Sunderland *et al.*, 2019).

- المسار الأول: يكون عن طريق الابتلاع وهو الأكثر شيوعاً إذ يتم بوساطة استهلاك الأطعمة والمشروبات التي تم تخزينها في حاويات أو زجاجات مصنوعة من مواد بلاستيكية تحتوي على BPA بهيئة بوليمر, خاصة بعد تعرضها لدرجات حرارة عالية، يمكن إطلاق مونومراته في الاطعمة أو الاشربة التي يتم تناولها (Le *et al.*,2008) كما يمكن أن تساهم حشوات الأسنان في إعطاء BPA عن طريق الفم بوساطة إطلاقه في اللعاب بعد فترة وجيزة من وضع الحشوة (Joskow *et al.*, 2006). يمتص BPA من قبل الجهاز الهضمي ويتم استقلابه بسرعة في الكبد عن طريق مسارين رئيسين هما مسار الكلوكورونيد ومسار السلفنة. يعد إنزيم الكبد UDP-glucuronosyltransferases 2B15 (UGT2B15) المسؤول عن مسار الكلوكورونيد (شكل 2-2) الذي ينتهي بإخراج BPA من الجسم بوساطة الصفراء أو البول على شكل BPA glucuronide (Thongkorn *et al.*, 2019 ; Khan *et al.*, 2021)، في حين يعد انزيم sulfotransferase المسؤول عن مسار السلفنة إذ يتم استقلاب جزء من البيسفينول المستلم إلى كبريتات البيسفينول (Lušin *et al.*, 2012). يتم استقلاب اكبر كمية من البيسفينول على شكل BPA glucuronide وهو غير نشط بيولوجياً (Hanioka *et al.*, 2008) قابل للذوبان في الماء يتم إفرازه في البول بعمر نصف من 5.4 إلى 6.4 ساعات (Castellini *et al.*,2020). يمكن أن يحدث مسار الكلوكورونيد خارج الكبد، في الأمعاء وبدرجة أقل في الكلى(Lušin *et al.*, 2012). يمر BPA الذي يتم تناوله فموياً بعملية إزالة السموم الفعالة نسبياً في الجهاز الهضمي إذ يتم التخلص من 99 ٪ منه في غضون 24 ساعة (Thayer *et al.*, 2015)

يؤدي الخلل في إنزيم UGT2B15 إلى ارتفاع تركيز BPA غير المقترن في الجسم وقد بيَّنت الدراسات وجود أشكال غير مقترنة منه في سوائل جسم الإنسان كالبول، حليب الأم, السوائل التي تحيط بالجنين وسوائل المشيمة (Vandenberg *et al.*, 2010 ; Inadera, 2015) .

أشارت الدراسات إلى احتمالية امتصاص BPA في تجويف الفم وبالتالي تجنب المعالجة الأيضية الأولية في الكبد (Gayrard *et al.*,2013 ; Guignard *et al.*, 2016) ومع ذلك، أكد Teeguarden وجماعته (2015) إن تركيز BPA الحر في مجرى الدم يزداد بشكل ضئيل جداً نتيجة الامتصاص داخل الفم.

تدخل مركبات BPA التي لا يتم استقلابها في الكبد أو في الأمعاء الدقيقة بالدرجة الأولى إلى الدورة الدموية في شكلها غير المرتبط وأن طبيعتها المحبة للدهون تسمح بتوزيعها على أهداف مختلفة كالأنسجة الدهنية (Vénisse *et al.*, 2019)، الدماغ (Van der Meer *et al.*, 2017)، أنسجة الثدي (Dualde *et al.*, 2019)، الأعضاء التناسلية (Karrer *et al.*, 2018 ; Ješeta *et al.*, 2019b) والبروستات (Prins *et al.*, 2014) .

شكل (2-2) : التعرض البشري للبيسفينول وعمليات الايض الخاصة به. (Khan *et al.*, 2021)

●المسار الثاني: يتم عبر الجلد ويحصل بشكل رئيس عن طريق الاقتران مع الورق الحراري المستعمل على شكل إيصالات (Thayer *et al.*, 2015) إذ يوجد BPA بشكله الحر بالمليغرام لكل غرام من الورق على عكس البلاستيك الذي يكون فيه البيسفينول بشكله المبلمر (Biedermann *et al.*, 2010). يتجنب BPA الممتص عن طريق الجلد الاستقلاب الأولي في الكبد مما يزيد بشكل كبير من تركيز الأشكال الحرة النشطة بيولوجياً من البيسفينول في مجرى الدم (Hormann *et al.*, 2014) . في عموم السكان، يتم نقل ما يقرب من 1 ميكروغرام من البيسفينول لكل إصبع واحد بعد الإمساك بالورق الحراري لمدة 5 ثوانٍ مع زيادة في حالة الأصابع المبللة أو الدهنية إلى 23 ميكروغرام لكل إصبع (Biedermann *et al.*, 2010).

أشار Heinälä وجماعته (2017) إلى وجود تراكيز عالية من BPA في عينات البول لدى عمال صناعة الورق الحراري تتراوح بين (1000-1500 ميكروغرام / لتر) ولدى عمال تصليب الطلاء السائل (بحدود 100-170 ميكروغرام / لتر) مما يفسر الطريق المحتمل للتعرض له عن طريق ملامسة الجلد .

تم تحديد عمر النصف لـ d6-BPA الحر الذي يدخل عبر الجلد بـ 17.6 ساعة، وهو أطول بثلاث مرات منه في حال دخوله عن طريق الفم إذ أن إفراز البيسفينولات التي تدخل الجسم عبر الجلد يكون بشكل أبطأ (Sasso *et al.*, 2020)، وقد أوضح Liu و Martin (2017) أن مادة BPA المُعلَّم من الممكن اكتشافها في البول بعد 51 ساعة من ملامسة الجلد.

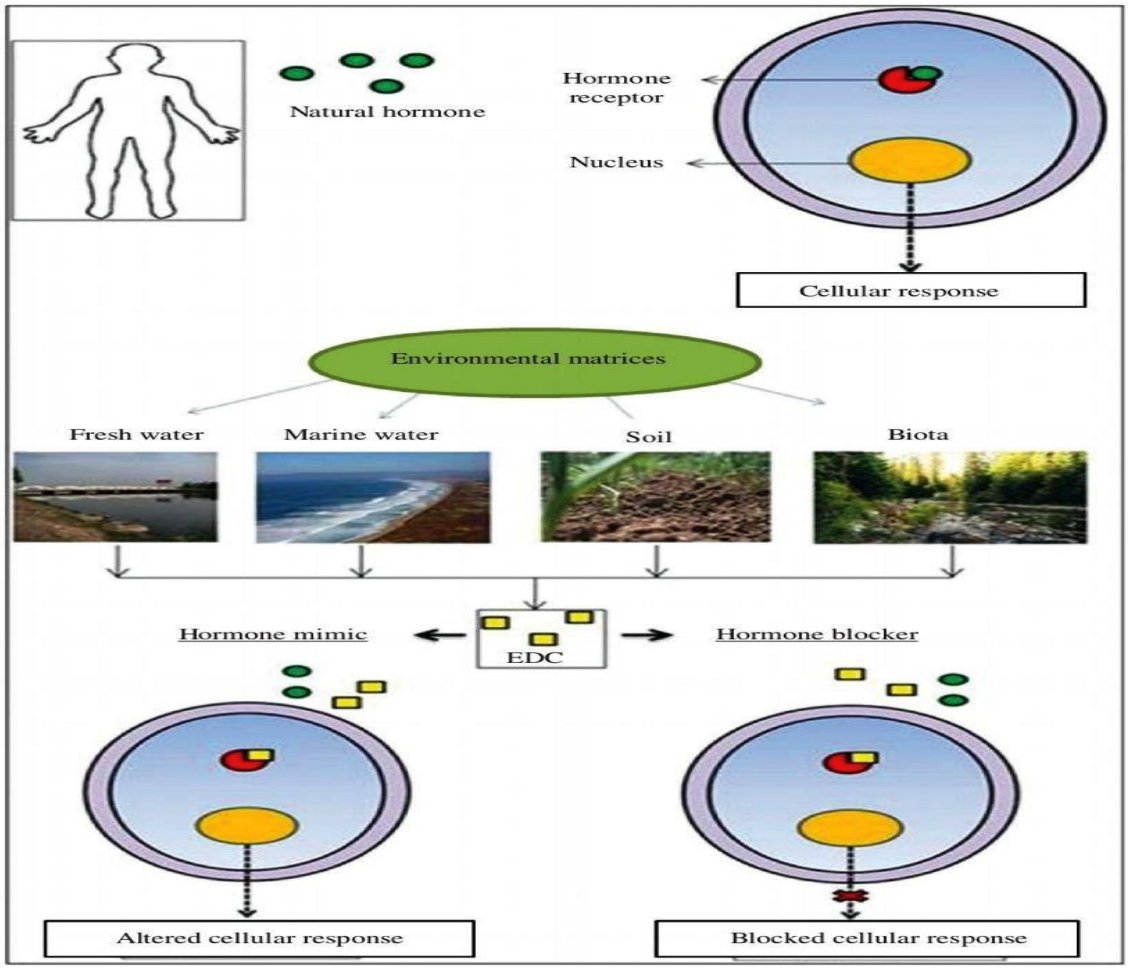
- المسار الثالث: يعد الاستنشاق من مسارات دخول البيسفينول أ للجسم وخاصة عند عمال المصانع المنتجة للسلع الحاوية على هذا المركب (Hines *et al.*, 2018) إلا أنه يعد أقل أهمية من مسار الجلد أو مسار الفم بالنسبة لمعظم السكان (Geens *et al.*, 2009) .

يؤثر التعرض لـلبيسفينول على العديد من مسارات الإشارات بما في ذلك التداخل مع وظائف المستقبلات الخلوية ، إذ تعد مستقبلات الاستروجين والأندروجين ومستقبلات هرمون الغدة الدرقية أهدافاً رئيسة لـلبيسفينول أ، أو استهداف العديد من المسارات الأنزيمية المتعلقة بالتخليق الحيوي والتمثيل الغذائي للستيرويدات المرتبطة بالغدد الصماء والأنظمة التناسلية وأن عمليات التعديل modulation في هذه المسارات ترتبط بتطور السرطانات إذ يؤدي التعبير غير الطبيعي لمستقبلات الإستروجين إلى تطور سرطان الثدي والمبيض والكبد وبطانة الرحم (Gao et al. 2015a)، وقد ذكر Wang وجماعته (2010) إن الآلية الأولية للتسرطن المحفّز بـالبيسفينول أ تكون بسبب نشاطه الاستروجيني إذ يرتبط بمستقبلات الإستروجين الغشائية والنووية ويغير مسارات الإشارات الجينومية وغير الجينومية مما يقود إلى تغير الوظائف البيولوجية الطبيعية التي تؤدي إلى التسرطن، ويوضح الشكل (3-2) المصادر البيئية لإطلاق البيسفينول وآليات تأثيره على المستوي الخلوي (Abraham and Chakraborty, 2020).

2-2-3. التأثيرات الصحية للبيسفينول أ

يتسبب البيسفينول أ بحدوث تأثيرات صحية كبيرة على البشر نظراً لكونه أحد مسببات اضطراب الغدد الصم إذ يحتوي على بنية مشابهة لبنية E2 و DES مما يؤهله لتحفيز الاستجابة الخلوية عن طريق الارتباط بمستقبلات هرمون الاستروجين (Rubin, 2011).

يؤدي التعرض لـ BPA الى حساسية الجلد أو التهابات الجلد المرتبطة بالحساسية allergic contact dermatitis لدى العاملين بمصانع المنتجات القائمة على البلاستيك كقفازات كلوريد البولي فينيل، الدهانات الإيبوكسية، الأشرطة اللاصقة ومانعات التسرب للأسنان ويمثل الطفح الجلدي الذي يظهر على اليدين أو الساقين أو الوجه أبرز اعراض الأصابة (Aalto-Korte *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2007) ويمكن أن يؤدي التعرض لـ BPA أثناء الحمل إلى القلق والاكتئاب والسلوك العدواني وفرط النشاط لدى الأطفال (Staples *et al.*, 2018).



شكل (2-3) تمثيل تخطيطي لإطلاق البيسفينول أ من البيئية وقدرته المخلة بالغدد الصماء على المستوى الخلوي. (Abraham and Chakraborty, 2020)

أظهرت العديد من الدراسات داخل الجسم وخارجه أن مادة BPA تسبب الإجهاد التأكسدي عن طريق إطلاق أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) وإضعاف الدفاعات المضادة للأكسدة (Xin *et al.*, 2014 ; Moghaddam *et al.*, 2015)، كما تبيّن أن الأنواع المختلفة من البيسفينول يمكن أن تزيد الضرر الذي يلحق بالجزيئات الحيوية الدقيقة التي تعد الهدف الرئيس للإجهاد التأكسدي (Huang *et al.*, 2020)، في حين أظهرت نتائج تحليل تأثير الملوثات على البشر أن مركبات

MDA و 8-hydroxy-2′- deoxyguanosine (8-OHdG) وهي نواتج أكسدة الدهون وضرر الحامض النووي الناجمة عن الإجهاد التأكسدي تكون مرتبطة بتركيز بيسفينول البول مما يشير إلى دوره في إحداث الإجهاد التأكسدي (Valavanidis *et al.*, 2009).

ترتبط زيادة تركيز BPA في البول بتشخيص أمراض القلب والأوعية الدموية والسكري والخلل الوظيفي في إنزيمات الكبد لدى السكان البالغين في الولايات المتحدة (Lang *et al.*, 2008)، كما وجد أنها ترتبط بشكل كبير مع بروتين التفاعل C Reactive Protein (CRP) لدى النساء بعد سن اليأس (Yang *et al.*, 2009) ومع الهرمون المحفز للجريب (FSH) لدى العمال الذكور (Hanaoka *et al.*, 2002) مما يدل على أن البيسفينولات تعزز اضطراب المناعة والغدد الصم .

كشفت الدراسة التي أجريت على أناث الفئران الآثار الضارة لـ BPA الذي أدى إلى انخفاض قوة العظام ومحتواها من المعادن والموت المبرمج لبانيات وناقضات العظم جنبًا إلى جنب مع تثبيط تكوين البانيات (Chin *et al.*, 2018)، في حين بيَّنت دراسة أخرى أجريت على النساء ارتباط التعرض لـ BPA بانخفاض الانغراس ومتلازمة المبيض المتعدد الكيسات polycystic ovarian syndrome (PCOS) (Peretz *et al.*, 2014)، كما لوحظ تغيير في النمو التناسلي والخصوبة ووظيفة المشيمة لدى البشر والقوارض بسبب التعرض لـ BPA (Fowler *et al.*, 2012).

يؤدي التعرض طويل الأمد لـ BPA إلى تغيير وظائف الغدد الصم مما يتسبب في العديد من الأمراض كالسكري، السمنة، أمراض القلب والأوعية الدموية، أمراض الجهاز التنفسي المزمن، أمراض الغدة الدرقية، أمراض الجهاز المناعي، السرطانات (Leemans *et al.*, 2019 ; Ma *et al.*, 2019) ، الضعف الجنسي عند الذكور (Li *et al.*, 2010) والنضج الجنسي المبكر لدى الاناث (Watkins *et al.*, 2017). وقد أشار Gore وجماعته (2015b) إلى ارتباط البيسفينول أ بمجموعة من الأضرار على الجهاز التناسلي والجهاز المناعي وعمليات التمثيل الغذائي (الاختلالات الأيضية) .

للبيسفينول أ تأثيرات ضارة على الجهاز التكاثري الذكري إذ يتسبب في إضعاف حركة النطف واختزال أعداد النطف المتحركة ويؤثر سلباً على شكلها العام (Sakaue *et al.*, 2001) كما تسبب الزيادة في تركيزه اختزال الانتاج اليومي للنطف إذ يؤثر بشكل مباشر على محور تحت المهاد – الغدة النخامية – الخصية ويؤثر على عملية تكوين النطف في الثدييات (Manfo *et al.*, 2014)، وإضعاف نوعية السائل المنوي وزيادة التحطم في الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA فضلا عن سمية الخلايا الجرثومية (Meeker *et al.*, 2010).

يؤدي التعرض للبيسفينول أ إلى اختزال وزن الخصية والبربخ وأعداد النطف فيهما, انخفاض مستوى هرمون التستوستيرون وزيادة تشوهات النطف (Al-Hiyasat *et al.*, 2004) كما يثبط تخليق الستيرويدات في خلايا لايدك عن طريق اختزال التعبير الجيني للانزيمات وتقليل إفراز الهرمون المحفز للخلايا البينية (Akingbemi *et al.*, 2004).

يمكن للبيسفينول أ أن يمنع ارتباط التستوستيرون بمستقبلات الأندروجين (Ermler *et al.*, 2011) مما يؤدي إلى انخفاض جودة السائل المنوي (Hass *et al.*, 2016)، وقد بين Usman و Ahmad (2016) إن التعرض للبيسفينول خلال مدة التطور المحيطة بالولادة يضر بوظائف الخصية عند المراهقة والنضج.

2-2-4. آليات تأثير البيسفينول أ على خصوبة الذكور

1- التأثير على مستقبلات الاستروجين (فرط الاستروجين) :

تتنافس جزيئات البيسفينول أ مع هرمون الاستروجين وبيتا استراديول عبر مستقبلات هرمون الاستروجين وتؤثر على العديد من الوظائف الفسيولوجية مما يؤدي إلى اضطراب بناء الستيرويدات (Lagarde *et al.*, 2015) وقد ذكر Li وجماعته (2020) إن BPA يؤثر على خلايا لايدك عبر مستقبلات هرمون الاستروجين (1 و 2) أوعبر مستقبلاته الغشائية المقترنة مع بروتين G وجميعها معبر عنها في تلك الخلايا، فيما ذكر Fitzgerald وجماعته (2015) إن مستقبلات الاستروجين المقترنة مع بروتين G تعد هدفًا رئيسًا لتأثير البيسفينول أ الشبيه بالإستروجين.

2- التأثير على مستقبلات الاندروجين (التأثير المضاد للاندروجين) :

تنتج خلايا لايدك نوعين من الهرمونات هما التستوستيرون و Insulin-like (INSL3) peptide 3 إذ يبنى هرمون التستوستيرون من الكوليسترول الستيرويدي عن طريق تنشيط مسار إشارات(Protein Kinase A (PKA الذي يؤدي إلى نقل الكوليسترول إلى المايتوكوندريا ليتم تكوين البريغنينولون الذي يمر بعد ذلك إلى الشبكة الإندوبلازمية الملساء لتخليق التستوستيرون. يؤثر BPA عند التراكيز العالية على إنتاج هرمون التستوستيرون بشكل مباشر عن طريق تعطيل الإنزيمات الشبكة الإندوبلازمية المشاركة في التصنيع (Ye *et al.*, 2011) وقد بيَّنت دراسة الباحث Maamar وجماعته (2015) تأثير البيسفينول أ على خلايا خصية الجنين إذ تسبب بانخفاض كبير في إنتاج هرمون التستوستيرون.

يتم تنشيط التستوستيرون أيضياً إلى ثنائي هيدروتستوستيرون dihydrotestosterone (DHT) الذي يعد ضرورياً لتطور القناة التناسلية الذكرية بوساطة انزيم 5-reductas, وغالبًا ما تعمل

مسببات اضطراب الغدد الصم كمثبطات لهذا الانزيم وبالتالي منع عملية التحول في الأندروجينات (Sweeney *et al.*, 2015). يؤثر الـ BPA على إنتاج هرمون التستوستيرون في خصيتي الجنين (Naciff *et al.*, 2005) مما يؤدي إلى عدد من التشوهات أبرزها صغر القضيب (Conlon, 2017) .

3- التعديلات فوق الجينية Epigenetic Modifications

غالبًا ما توجد مسببات اضطراب الغدد الصم بتراكيز منخفضة جداً دون أي مظاهر سريرية لكنها يمكن أن تقود إلى العقم "مجهول السبب" أو مشاكل صحية أخرى مع أعراض غير محددة ويبدو أن التعديلات اللاحقة لعملية الترجمة لبعض البروتينات المهمة هي فعل شائع لتلك التراكيز المنخفضة إذ تؤدي العديد من مسارات عمل مسببات اضطراب الغدد الصم إلى تغييرات في الحامض النووي لا تتعلق بتسلسل النيوكليوتيدات كحالة المثيلة methylation للجينوم. تؤدي الطفرات الفوقية إلى تغيير النشاط النسخي للجينوم مما يقود إلى العديد من التأثيرات السلبية المحتملة كالفشل في البحث عن أنواع الأوكسجين التفاعلية وإصلاح تلف الحامض النووي فضلاً عن تعطيل التكوين الحيوي للمايتوكوندريا (Martens *et al.*, 2011).

4- تحفيز إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية في النطف

أشار Ullah وجماعته (2018a) إلى أن البيسفينول أ يحفز الإجهاد التأكسدي في أنسجة الخصية لدى الجرذان وبالتالي يضعف وظائفها التكاثرية فيما بين Domínguez-Rebolledo وجماعته (2010) إن التعرض للبيسفينول أ يزيد من نشاط أنواع الأوكسجين التفاعلية وأكسدة الدهون مما يقود إلى الإجهاد التأكسدي وتلف الحامض النووي DNA في نطف الجرذان إذ ينتج عن الزيادة في نشاط أكسدة الدهون فقدان سلامة الغشاء البلازمي وزيادة نفاذية الخلية وتعطيل الإنزيمات وإلحاق الضرر الهيكلي بالحامض النووي. أيضاً يمكن أن يؤدي إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية إلى تنشيط موت الخلايا المبرمج مباشرة (Muratori *et al.*, 2015).

وجد Ullah وجماعته (2019 a) إن احتضان عينات النطف باستخدام المواد المسببة لاضطراب الغدد الصم أدى إلى زيادة نشاط انزيم الـ Superoxide dismutase (SOD) نتيجة لزيادة انتاج الجذور الحرة فيما لاحظ Wang وجماعته (2017b) إن تعريض خلايا سرتولي للفئران لمادة البيسفينول أ في المختبر تسبب في زيادة إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية وقاد إلى خلل وظيفي في المايتوكوندريا أدى بالنهاية إلى الموت المبرمج.

5- التأثير المباشر على النطف

تؤثر مادة البيسفينول أ على النطف مباشرة بعدة طرق إذ يمكن أن تحفز تفاعل الجسم الطرفي في وقت مبكر جداً وفي المكان الخطأ (Schiffer *et al.*, 2014) أو تزيل حساسية النطف للعوامل الأنثوية التي تنشطها بشكل طبيعي كما وأن حركة وحيوية النطف ووظائف المايتوكوندريا ومستويات ATP داخل الخلايا تتأثر سلباً بالبيسفينول أ عن طريق تنشيط Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ، phosphatidylinositol 3-kinase وأنزيم PKA (Rahman *et al.*, 2016).

أظهرت دراسة حديثة أجريت على المرضى الذين يعانون من ضعف الخصوبة إن تركيزات البيسفينول أ ارتبطت بانخفاض جودة السائل المنوي وزيادة تلف الحامض النووي DNA للنطف (Omran *et al.*, 2018) في حين كشفت دراسة سابقة عن نتائج تتعلق بتراكيز BPA في البول وارتباطه مع جودة السائل المنوي وسلامة الحامض النووي DNA للنطف (Vitku *et al.*, 2016).

6- تعطيل الحاجز الدموي الخصوي

يعمل الحاجز الدموي الخصوي على حماية الخلايا الجرثومية من المواد السامة الخارجية وإذا ما تعرض للتلف سيتم إنتاج الأجسام المضادة التي تقود إلى الاستجابات المناعية وتعرض النطف إلى مخاطر المناعة الذاتية مما يؤدي في النهاية إلى العقم (Cheng and Mruk, 2012). يمكن للمواد المسببة لاضطراب الغدد الصم ان تؤثر على الحاجز الدموي الخصوي مما ينعكس سلباً وبشكل مباشر على تكوين النطف لدى البالغين وكذلك على التطور الجنيني لأنسجة الخصية وقد تبين إن BPA يعمل على تعطيل هذا الحاجز عن طريق التأثير على تخليق البروتينات الضرورية لإحكام الارتباطات بين الخلايا مما يؤدي إلى اضطراب شامل في سلامته ينتج عنه تطور هجمات المناعة الذاتية (Li *et al.*, 2009) وقد لوحظ سابقاً أن مادة BPA تؤثر على الوصلات التي تربط أورمات النطف بخلايا سرتولي (Toyama *et al.*, 2004) وربما يؤدي التأثير إلى متلازمة خلايا سيرتولي عندما يهبط تنظيم بروتينات الاتصال بين خلايا سيرتولي وامهات النطف spermatogonia. (Li *et al.*, 2009 ; Gao *et al.*, 2015b)

ذكر Adegoke وجماعته (2020) إن التعرض للبيسفينول أ يؤدي إلى خلل وظيفي في المايتوكوندريا, موت الخلايا المبرمج , تلف الحامض النووي في خلايا سرتولي واضطراب سلامة الحاجز الدموي الخصوي.

3-2 . الاجهاد التأكسدي

يتم توليد أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) عن طريق عمليات داخلية وخارجية مختلفة ومع ذلك تتم معادلتها بوساطة مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية ويؤدي عدم التوازن بين توليد تلك الأنواع ومعادلتها إلى التقدم نحو حالة الإجهاد التأكسدي (OS) الذي يؤدي بدوره إلى ظهور أمراض واضطرابات مختلفة فضلاً عن الشيخوخة التي من خصائصها الفقدان التدريجي لوظائف الأنسجة والأعضاء (Hajam *et al.*, 2022).

أشار Pizzino وجماعته (2017) إلى أن الجذور أو الجزيئات الأكثر انتشاراً والتي تتمتع بفاعلية عالية تتضمن بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، الأوكسيد الفائق ($O_2^{\bullet}$)، والهيدروكسيل (OH•)، أوكسيد النيتريك (NO•)، والبيروكسينيتريت ($ONOO^-$) , وأن حالة الإجهاد التأكسدي حالة ناتجة عن عدم التوازن بين إنتاج الأنواع التفاعلية في الخلايا والأنسجة وقدرة النظام البيولوجي على إزالة سميتها والحد من تأثيراتها.

تتولد أنواع الأكسجين التفاعلية ، جنباً إلى جنب مع البيروكسيدات العضوية ، في التمثيل الغذائي التأكسدي للمايتوكوندريا أثناء تنفس الخلية (Starkov, 2008) كما يتم انتاجها بفعلٍ إنزيمي لتدمير مسببات الأمراض ولكن ثبت أنها لا تستطيع التفريق بين الخلايا المضيفة والعوامل المسببة للعدوى، إذ يؤدي إنتاجها المفرط إلى ضعف الخلية المضيفة والأعضاء (Yadav *et al.*, 2016).

تحدث التفاعلات غير الأنزيمية المسؤولة عن وجود أنواع الأكسجين التفاعلية أثناء الخطوات الوسطية لاختزال الأوكسجين الجزيئي في السلسلة التنفسية فالتفاعل الشامل يكون ممثلاً عن طريق اختزال الأوكسجين لتكوين الماء لكن التفاعلات الجانبية غير المرغوب فيها تولد أنواع الأكسجين التفاعلية (Cheignon *et al.*, 2018).

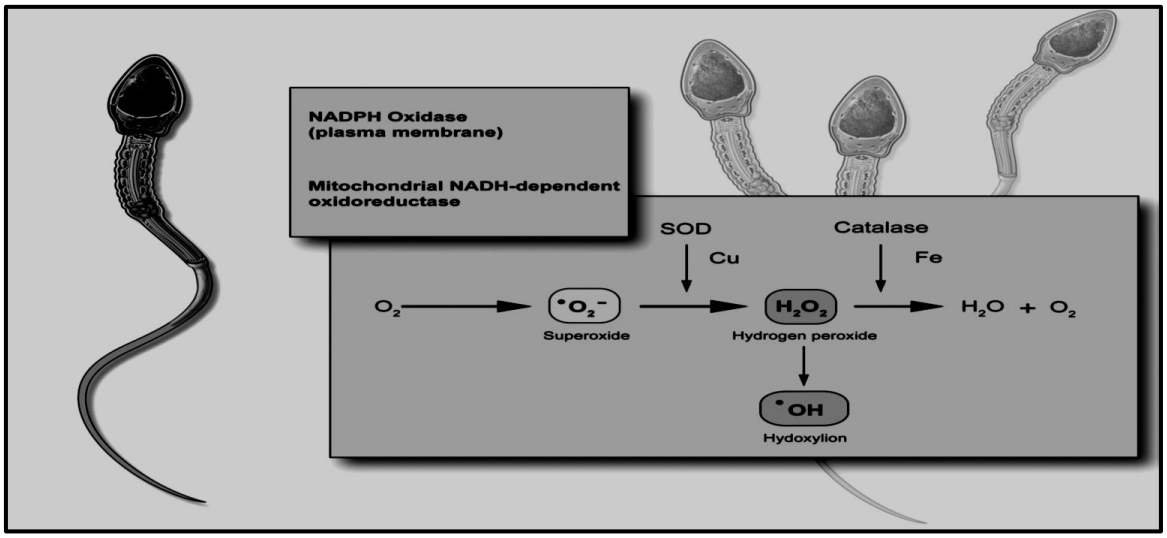
تنتج ROS وأنواع النتروجين التفاعلية(Reactive Nitrogen spicies (RNS أيضاً في عمليات إنزيمية غير مرتبطة بسلسلة نقل الإلكترون في المايتوكوندريا إذ تم تحديد أكثر من 30 إنزيم خلوي لإنتاج H_2O_2 (Go *et al.*, 2015) .

تتضمن مصادر المؤكسدات الخارجية دخان السجائر ، التلوث البيئي ، الإشعاع المؤين / الشمسي (الأشعة فوق البنفسجية ، الأشع المرئية ، الأشعة تحت الحمراء) والنظام الغذائي (Go and Jones, 2014 ; Sies, 2018) .

2-3-1. توليد أنواع الأوكسجين الفعّالة في النطفة

تُنتَج أنواع الأوكسجين التفاعلية في النطفة عن طريق نظام Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase (NADPH oxidase) على مستوى الغشاء البلازمي أو عن طريق تفاعلات الأكسدة والاختزال المعتمدة على مركب Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) على مستوى المايتوكوندريا وتمثل الميكانيكية الأخيرة المصدر الرئيس لهذا الإنتاج كون النطفة غنيَّة بالمايتوكوندريا الضرورية لتحقيق تجهيز مستمر من الطاقة اللازمة للحركة (Henkel, 2011). ينتج عن النطف الفاقدة لوظيفتها في المني زيادة كبيرة في توليد هذه الأنواع وهذا بدوره يؤثر سلباً على وظائف المايتوكوندريا وقدرتها على الحركة (Henkel, 2011;Chen *et al.*, 2013) .

تمثل جذور الأوكسيد الفوقي ($O_2^{\cdot-}$) المُنتَج الرئيس من الجذور الحرة المتولدة في نطفة الإنسان وهي تتفاعل بتأثير انزيم السوبرأوكسيد دسميوتيز لتكوين بيروكسيد الهيدروجين وبوجود معادن الانتقال مثل الحديد Fe والنحاس Cu يدخل بيروكسيد الهيدروجين وجذور الأوكسيد الفوقي في تفاعل Haber-Weiss لإنتاج جذر الهيدروكسيل $OH^{\cdot-}$ الشديد التفاعل (شكل 2-4) والذي بدوره يدخل بقوة في سلسلة تفاعلات الأكسدة الفائقة للدهون مما يؤدي إلى فقدان النطفة لوظيفتها بسبب تدمير سيولة الغشاء البلازمي (Sikka , 2001 ; Chen *et al.*, 2013).



شكل (2-4) : توليد أنواع الأوكسجين الفعّالة في النطفة (Chen *et al.*, 2013)

2-3-2. مصادر أنواع الأوكسجين الفعّالة في البلازما المنوي

المصادر الداخلية: يحتوي السائل المنوي على أنواع مختلفة من الخلايا تتضمن النطف الناضجة وغير الناضجة والخلايا المستديرة في المراحل المختلفة من نشـأة النطفة فضلاً عن الخلايا الطلائيـة والخلايا البيض وتمثل الخـلايا البيض (خاصة العدلات والبلعمات الكبيرة) والنطف غير الناضجة المصدر الداخلي الرئيس لإنتاج أنواع الأوكسجين الفعّالة (Choudhary *et al.*, 2010 ; Gharagozlo and Aitken, 2011) .

تعد غدة البروستات والحويصلات المنوية مصدراً للخلايا البيض في السائل المنوي والتي تقوم بانتاج الـ ROS بمقدار (100) ضعف مقارنة بالحالة الطبيعية عندما تستحث بالاصابات أو الاستجابات الالتهابية كجزء من آليات الدفاع (Agarwal *et al.*, 2003).

ينبثق السايتوبلازم من النطف المتطورة (في الظروف الاعتيادية) لكي تتمايز إلى نطف ناضجة ولكن قد يؤدي الكبح أو التوقف في عملية تكوين النطف إلى الاحتفاظ بالسايتوبلازم الزائد حول القطعة الوسطية للنطف التالفة وهذا السايتوبلازم الزائد المتبقي قادر على تنشيط نظام NADPH عبر مسار الهكسوز أحادي الفوسفات ، والذي يعد مصدراً للإلكترونات لإنتاج الـ ROS (Rengan *et al.*, 2012) .

بين Cho وجماعته (2016) وجود ارتفاع ملحوظ في مؤشرات الاجهاد التأكسدي المتمثلة بـ ROS و Lipid peroxidation (LPO) في عينات السائل المنوي لدى الرجال المصابين بالعقم بسبب دوالي الخصية مقارنة مع الرجال الخصبين العاديين إذ إن المستويات العالية من ROS في المني ترتبط ارتباطاً مباشراً بدوالي الخصية (Will *et al.*, 2011) .

المصادر الخارجية : بيَّن Esteves (2002) أن المصادر الخارجية للـ ROS في البلازما النووي تتمثل بأنمـاط الحياة (كالتدخين واستهلاك الكحول) والعوامـل البيئيـة (كالإشعاع والسموم) إذ يمكن للإشعاع الصادر من الهواتف المحمولة أن يحفز انتاج أنواع الأكسجين التفاعلية في السائل المنوي البشري مما يضعف جودة السائل المنوي ويؤدي إلى تلف الحامض النووي للحيوانات المنوية وبالتالي يؤثر على عدد النطف وحركتها وحيويتها (Aitken *et al.*, 2016) كما يمكن للموجات الكهرومغناطيسية بالترددات الراديوية أن تضعف تدفق الإلكترون داخل الخلايا على طول الأغشية الداخلية بسبب العديد من الجزيئات المشحونة في السايتوبلازم مما يؤدي إلى تعطيل الأداء الطبيعي للخلايا الجرثومية (Houston *et al.*, 2016 : Sabeti *et al.*, 2016) .

قد تؤثر السموم من المنتجات المنزلية أو الصناعية على الجسم وتحفز إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية في الخصيتين مما يضعف بنية ووظيفة النطف كما إن الفثالات (في الأجسام البلاستيكية)

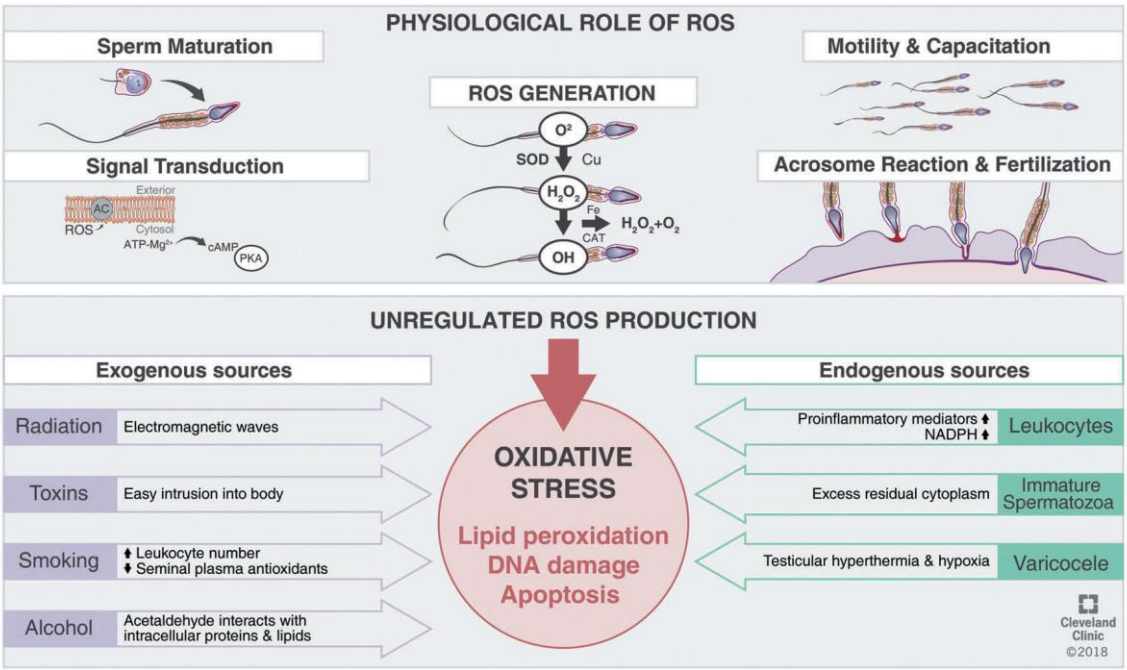
والمعادن (كالكادميوم والكروم والرصاص والمنغنيز والزئبق) تكون موجودة مما يضعف عملية تكوين النطف ويقلل أعدادها ويختزل نوعيتها (Sengupta *et al.*, 2017) .

يتسبب التدخين في اختلال التوازن بين أنواع الأكسجين التفاعلية ومضادات الأكسدة في السائل المنوي لدى المدخنين وقد يؤدي إلى زيادة تركيز كريات الدم البيضاء في المني بنسبة 48٪ ومستويات ROS بنسبة 107٪ ويقلل من مضادات الأكسدة في البلازما المنوي ويزيد من تركيزات (8-OHdG-8) hydroxy-2 '-deoxyguanosine (علامة حيوية للضرر التأكسدي) كما يؤدي التدخين إلى زيادة تركيز الكادميوم والرصاص في الدم والسائل المنوي مما يؤدي إلى زيادة إنتاج ROS وإضعاف حركة النطف (Agarwal *et al.*, 2014). عادة ما يتم التعرف على زيادة تلف الحامض النووي للحيوانات المنوية والموت المبرمج عند المدخنين وما لها من آثار ضارة على خصوبة الذكور (Saleh *et al.*, 2002). يعد الكحول محفزاً لتوليد أنواع الأكسجين التفاعلية ويؤثر على آلية الدفاع المضادة للأكسدة إذ يمكن أن ينتج الأسيتالدهايد ، وهو منتج ثانوي لعملية التمثيل الغذائي للإيثانول ، أنواع الأكسجين التفاعلية عن طريق التفاعل مع البروتينات والدهون وبالتالي إتلاف المكونات الخلوية وتقليل نسبة النطف الطبيعية (Agarwal and Prabakaran, 2005).

2-3-3. التأثيرات الفسلجية والامراضية لـ ROS على الوظائف المختلفة للنطفة.

التأثيرات الفسلجية : يتم إنتاج ROS داخل الجسم بكميات محدودة وهي ضرورية للحفاظ على التوازن الخلوي ، نقل الإشارات ، التعبير الجيني ، تنشيط المستقبلات ، التعرف على العوامل الممرضة ، ضمان بقاء الخلية ، الانتشار ، الهجرة والتمايز (Kumar and Pandey, 2015 ; Hussain *et al.*, 2016) وقد بين Sies (2018) أن تعرض اللخلايا والكائنات الحية للتراكيز المنخفضة ضروري لإشارات الأكسدة والاختزال ، الموجهة نحو أهداف محددة ، في حين يؤدي التعرض المرتفع إلى تعطيل إشارات الأكسدة والاختزال وتدهورها وبالتالي معالجة اهداف غير محددة.

تؤدي التراكيز المنخفضة والمنتظمة لـ ROS أدواراً فسلجية حيوية في تكاثر الذكور كنضج النطف , اكتسابها القدرة ، فرط النشاط ، تفاعل الجسيم الطرفي والاندماج بالبويضات (Thompson *et al.*, 2013 ; Du Plessis *et al.*, 2015; Dutta *et al.*, 2019) كما موضح في الشكل (2-5).



شكل (2-5) تأثير الاجهاد التاكسدي في التكاثر الذكري (Dutta *et al.*, 2019)

التأثيرات الامراضية : للإجهاد التأكسدي آثار سلبية كبيرة على المكونات الخلوية المختلفة مثل: الكربوهيدرات والأحماض النووية والبروتينات والدهون (Agarwal *et al.*, 2003) إذ يؤدي الهجوم المستمر لـ ROS إلى تدمير النفاذية الانتقائية لغشاء الخلية مما يقود إلى أكسدة الدهون , في حين يؤدي الهجوم التأكسدي على البروتينات إلى تغيير البنية التركيبية لها مما يتسبب في فقدان الوظيفة الكيميائية الحيوية ، بينما تؤدي التغييرات التأكسدية في الحامض النووي إلى حدوث طفرات وأخطاء في التكرار وتغييرات في الاستقرار الجيني وموت الخلايا (Klaunig *et al.*, 2010 ; Molayi-Jabdaragi *et al.*, 2020) .

تتأثر النطف بشكل خاص بالإجهاد التأكسدي نتيجة لعدم كفاية أنظمة إصلاح الخلايا فضلاً عن عدم كفاية الدفاعات المضادة للأكسدة فيها لقلة محتواها السايتوبلازمي لذا تكون عرضة لأكسدة الدهون بسبب المحتوى العالي من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة polyunsaturated fatty acids (PUFAs) في الغشاء البلازمي مما يؤدي إلى تعطيل النفاذية الاختيارية له وبالتالي تدفق ATP مما يضعف حركة السوط (Agarwal *et al.*, 2017) ، وبشكل عام تؤدي أكسدة الدهون الغشائية إلى خلل في وظيفة وشكل الغشاء (Anghel *et al.*, 2009) إذ تُعَد الدهون مسؤولة عن السيولة في طبقات الغشاء البلازمي وعن التغيرات التي تحدث أثناء عملية التكيف في القنوات التناسلية للأنثى (Sanocka and Kurpisz, 2004) وإن استمرار عملية أكسدة الدهون في النطفة يؤدي إلى فقدان 60% من الأحماض الدهنية من الغشاء البلازمي مما يؤدي إلى خفض سيولة الغشاء

وزيادة النفاذية غير النوعية للأيونات وقلة فعالية المستقبلات المرتبطة بالغشاء (Tremellen, 2008).

ذكر Agarwal وجماعته (2014) إن التراكيز العالية من ROS تقوم بمهاجمة الحامض النووي منقوص الأوكسجين ومهاجمة الدهون والبروتينات وتغيّر النظام الأنزيمي وتؤدي إلى تغيرات غير عكسية تسبب موت النطفة وتقود إلى هبوط معايير السائل المنوي التي تترافق مع عدم الخصوبة فيما بين de Lamirande و O,Flaherty (2008) أنها تسبب إمراضية النطفة عن طريق نضوب الادينوسين ثلاثي الفوسفات Adenosine triphosphate (ATP) نتيجة الخلل في عملية الفسفرة داخل المايتوكوندريا مما يؤدي إلى فقدان النطفة للحيوية والحركة.

يعد MDA ناتج نهائي لأكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة المتعددة PUFA والأسترات المتعلقة بها (Chauhan and Chauhan, 2006) إذ تؤدي مهاجمة الجذور الحرة للأحماض الدهنية غير المشبعة إلى إنتاج هذا المركب في سياق التفاعل لذا يستعمل بشكل واسع كمؤشر لتحديد مستوى مهاجمة الأحماض الدهنية بوساطة الجذور الحرة (Najeeb *et al.*, 2012) أو كمؤشر بايلوجي لأكسدة الدهون بسبب الإجهاد التأكسدي (Liu *et al.*, 2008). يتفاعل هذا المركب مع مجموعة الأمين في الأحماض الامينية كاللايسين والارجنين (Farmer and Davoine, 2007) ويوجد في الأنسجة والدم أما بصورة حرة أو مرتبط بمجاميع الـ -(SH) أو -(NH2) في البروتينات والأحماض النووية والبروتينات الدهنية (Esterbauer *et al.*,1991) ويكون الشكل الحر هو الفعال كيميائيا لذا يخّدِم كمؤشر للضرر الجديد (Cavalca *et al.*, 2001). فضلاً عما تقدم, يُعَد مركب hyd-roxynonenal-4 ناتجاً عرضياً آخر لأكسدة الدهون وهو مركب محب للماء يمكن أن يسبب خللاً وظيفياً شديداً في الخلية على مستوى التركيب الجيني ومستوى بناء البروتينات (Hample *et al.*, 2012).

يعمل بيروكسيد الهيدروجين على إتلاف غشاء الخلية وخفض حيويتها ويسبب ضرراً تأكسدياً للـ DNA في النواة والمايتوكوندريا (Guha *et al.*, 2011) وقد بيّن Sikka (2001) ان تعرض النطف إلى بيروكسيد الهيدروجين يُظهر إنخفاضاً واضحاً في مستوى الانزيمات المضـادة للأكسدة (SOD, CAT والكلوتاثيون بيروكسيديز(Glutathione peroxidase (GPX) .

أشارت دراسة سابقة إلى التأثير الضار للإجهاد التأكسدي على معايير السائل المنوي وإمكانية الخصوبة إذ يتسبب في تعطيل حيوية النطف وحركتها وإمكانية التخصيب في الأنسجة التناسلية ويتضح ذلك عن طريق وجود مستويات عالية جداً من أنواع الأكسجين التفاعلية في السائل المنوي

للرجال المصابين بالعقم عند مقارنتها بالمستويات الطبيعية (Agarwal *et al.*, 2006). يتزايد إنتاج أنواع الأوكسجين الفعّالة تحت الظروف المرضية حتى تتجاوز قدرة النظام المضاد للأكسدة في البلازما المنوي على تحقيق التوازن مما يؤدي إلى حالة الإجهاد التأكسدي التي تؤثر بشكل كبير على الخصوبة (Henkel, 2011; Trussel, 2013).

2-3-4. مضادات الاكسدة.

مضادات الأكسدة هي الجزيئات التي تمنع أو تقلل أو تؤخر أو تقضي تماماً على عمل الجذور الحرة والمؤكسدات وتحمي الجسم من الضرر التأكسدي (Lobo *et al.*, 2010) وقد بين Ali وجماعته (2020) إن مضادات الأكسدة الأنزيمية (SOD، GPX، CAT) وغير الأنزيمية (الكلوتاثيون والثيوردوكسين وحامض الأسكوربيك) تقاوم الإجهاد الناجم عن الجذور التفاعلية وتحمي الجزيئات الحيوية الخلوية كما أوضح إن التوكوفيرول، حامض الأسكوربيك، الأحماض الأمينية، الفلافونيدات، الكاروتينات، الفوسفوليبيدات والستيرولات مضادات أكسدة طبيعية تثبط أكسدة الأغذية عن طريق كسح الجذور الحرة، خلب الأيونات المعدنية المستعدة للأكسدة وإبطال نشاط المحتوى غير الحديدي لأنزيم lipoxygenase لمنع أكسدة الدهون.

تمتلك مضادات الأكسدة الفعالة القدرة على تأخير تفاعل الأكسدة أو إعاقة تطور الجذور الحرة أو ايقاف تفاعل سلسلة الأكسدة الذاتية الذي يولد المؤكسدات ذات الجذور الحرة كما إنها تعمل كعوامل اختزال ومخلبات معدنية تحول الهيدروبيروكسيدات إلى مركبات مستقرة وبعضها تعمل كمخلب معدني يحول المواد المعدنية المستعدة للأكسدة إلى شكل مستقر (Kurutas, 2015).

تم تحديد أربعة خطوط دفاعية لمضادات الاكسدة بناءً على تفاعلاتها :

مضادات الأكسدة الوقائية : تعمل هذه المجموعة على منع عمليات الأكسدة عن طريق قمع تكوين الأنواع الجذرية إذ تعمل بسرعة كبيرة وتقيد أي جذور حرة تحفز لإنتاج جذور أخرى أو أي أنواع كيميائية لديها القدرة على التحول إلى جذور حرة. تقوم تلك المضادات بتفكيك جذر الأوكسيد الفائق وتحليل بيروكسيد الهيدروجين مؤدية إلى ظهور أنواع غير ضارة كالأوكسجين الجزيئي. تشمل هذه المجموعة أيضاً بروتينات ربط الأيون المعدني كاللاكتوفيرين والفيريتين والسيرولوبلازمين التي تعزل الحديد والنحاس على التوالي مما يؤدي إلى تثبيط قدرتها على تكوين الجذور الحرة . (Noguchi *et al.*, 2000)

كاسحات الجذور الحرة : تقوم مضادات الأكسدة هذه بكبت مرحلة البدء أو أيقاف مرحلة الانتشار في تفاعلات السلسلة الجذرية عن طريق هبة الإلكترونات كما بإمكانها تحييد الجذور الناتجة حديثاً

بسهولة لتصبح أنواعا غير ضارة. تشمل هذه الفئة مضادات الأكسدة المحبة للماء (حامض الأسكوربيك ، الجلوتاثيون ، حامض البوليك) والمحبة للدهون (ألفا توكوفيرول ويوبيكوينول) (Ighodaro and Akinloye, 2018).

مضادات الأكسدة الإصلاحية : تعمل هذه المجموعة بعد حدوث ضرر الجذور الحرة وتتضمن الإنزيمات التي تعمل على إصلاح تلف الحامض النووي والدهون والبروتينات إذ تمتلك قابلية كبيرة على تشخيص وتحليل البروتينات والدهون والاحماض النووية المتضررة من الاكسدة مبطلة تراكمها الخلوي. تعد إنزيمات إصلاح الحامض النووي (بوليمريز ، كليكوسيليز ونيوكليز) والإنزيمات المحللة للبروتين (الببتيديز ، البروتيز والبروتينيز) الموجودة في كل من المايتوكوندريا والعصارة الخلوية لخلايا الثدييات أمثلة شائعة لهذا النوع من مضادات الاكسدة ; Noguchi *et al.*, 2000) . Ighodaro and Akinloye, 2018)

مضادات الأكسدة التي تعتمد على آليات التكيف : تشمل هذه الفئة المضادات التي تعمل عن طريق استغلال آليات التكيف إذ تتعامل مع الإشارات المطلوبة لإنتاج الجذور الحرة أو الاشارات اللازمة للتفاعلات المشتملة عليها مما يؤدي إلى منع توليد الجذور الحرة أو منع التفاعلات التي تنطوي عليها (Niki, 1993 ; Ighodaro and Akinloye, 2018).

يمكن لمضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية مواجهة التأثير الضار لـ ROS وهي موزعة في السايتوبلازم والعضيات كالمايتوكوندريا من أجل تحقيق أقصى قدر من الحماية (Powers and Jackson, 2008)

4-2. نبات الخولنجان الأصغر *Alpinia officinarum* (Lesser Galangal)

ينتمي *Alpinia officinarum* إلى مملكة النبات ، رتبة الزنجبيليات zingiberales ، العائلة الزنجبيلية zingiberaceae (Gupta and Tandon, 2004) التي تتوزع أنواعها على نطاق واسع عبر المناطق الاستوائية في آسيا وإفريقيا والأمريكيتين وتضم حوالي 50 جنساً و 1600 نوعاً منها 22 جنساً و 170 نوعًا في الهند (Tushar *et al.*, 2010) و 23 جنساً و 150 نوعاً في شبه جزيرة ماليزيا (Habsah *et al.*, 2000) . يعد الجنس Alpinia من اكبر اجناس العائلة إذ يضم 250 نوعاً منها 50 نوع منتشرة في شرق وجنوب غرب الصين (Liu *et al.*, 2008) . للخولنجان الأصغر اسماء شائعة كثيرة منها, جذر الصين ، الزنجبيل الصيني ، جذر المغص وجذر الهند لكنه يُعرف عمومًا باسم الخولنجان الأصغر (Lim, 2016).

2-4-1. تصنيف النبات

يُصنَّف نبات اللهانة كما يلي: (Ouattrocchi, 2000)

Kingdum : Planate

Division : Magnoliophyta

Phylum : Tracheophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Zingiberales

Family : Zingiberaceae

Genus : *Alpinia*

Species : *officinarum*

2-4-2. وصف النبات

الخولنجان الأصغر نبات عشبي معمر يشبه الزنجبيل موطنه جنوب الصين وشمال فيتنام لكنه ينمو أيضًا في تايلند واليابان ويزرع في الهند (Akbar, 2020). الرايزومات أسطوانية الشكل غالبًا ما تكون منحنيَّة ومتفرّعَة قطرها من 1 إلى 1.5 سم، سطحها الخارجي بني أحمر إلى بني غامق مع تجاعيد طولية دقيقة وعقد متعرجة حلقيّة رمادية اللون. يصل ساق النبات إلى ارتفاع 40-110 سم، والأوراق جالسة أو ذات عنق قصير والنصل سناني الشكل، الثمرة كروية وتتحول إلى اللون الأحمر عند النضج والبذور بنية اللون (صورة 2-1) (Liu *et al.*, 2015c). ينمو النبات جيداً في المناطق المدارية التي تتميز برطوبة عالية ودرجة حرارة 15 مئوية أو أعلى (Tian *et al.*, 2009).

(صورة 2-1) نبات الخولنجان الأصغر : a. النبات المزهر b. الرايزومات (Liu *et al.*, 2015c)

2-4-3. المركبات الكيميائية في الخولنجان *Alpinia officinarum*

يحتوي نبات الخولنجان الأصغر على العديد من المكونات النشطة بيولوجيًا بما في ذلك الزيوت الأساسية, الفلافونويدات , الكلايكوسيدات, الستيرولات, التربينات , التانينات, diarylheptanoids و phenylpropanoids وغيرها (Alasmary *et al.*, 2019 ; Ding *et al.*, 2019) كما يحتوي على العناصر الغذائية بنسب متفاوتة كالبروتينات (5.25٪)، الكربوهيدرات (76.9%)، الدهون (2.26%), الألياف الخام والعناصر النزرة (15%) (Indrayan *et al.*, 2009).

أظهرت دراسة الباحث Ning (2006) وجود مركبات sesquiterpenes, monoterpenes , الأحماض العضوية واللاكتونات في رايزومات الخولنجان الأصغر فيما أشارت دراسة الباحث Chen وجماعته (2012) إلى وجود وفرة من عناصر الزنك ، المنغنيز , الحديد , المغنيسيوم , الكالسيوم والعناصر النزرة الاساسية الأخرى في تلك الرايزومات .

تساهم **الزيوت الطيارة** في رائحة الخولنجان كأحد المكونات الرئيسة في جذوره إذ تشكل ما نسبته 1.5٪ من العشب الكامل وقد تم تحديد 75 نوعاً من تلك المركبات (Rana *et al.*, 2010) التي تمتلك القابلية على تحسين مستوى أوكسيد النيتروجين NO في مصل الدم والأوعية الدقيقة في الغشاء المخاطي المعدي وقد أظهرت نشاطًا مضادًا لقرحة المعدة عن طريق إزالة الجذور الحرة للأوكسجين وتقوية الحاجز المخاطي (Gao *et al.*, 2016).

تعد الفلافونويدات من المكونات الكيميائية الرئيسة للخولنجان إذ تم عزل 13 مركباً من رايزومات النبات (Li *et al.*, 2014) وقد أظهرت المركبات الفلافونويدية نشاطًا قوياً مضاداً للأكسدة يمنع الضرر التأكسدي عن طريق كسح الجذور الحرة أوتقليل إنتاجها (Köse *et al.*, 2015).في حين أظهر الكالانجين بشكل خاص تأثيرات مضادة للسرطان تمثلت بمنع تكون الأورام السرطانية ومنع انتشارها (Tolomeo *et al.*, 2008).

تقوم الـ Diarylheptanoids وهي من المكونات الرئيسة المميزة في الخولنجان بالعديد من الأنشطة الحيوية كتثبط تكوين الميلانين الذي تسببه خلايا الورم الميلانيني B16 (Matsuda *et al.*, 2009) , تحفيز الموت المبرمج, ايقاف المرحلة S , التمايز في خلايا العرف الأرومي العصبي البشري human neuroblastoma (Tabata *et al.*, 2009) ، تثبيط التخليق الحيوي للبروستاكلاندين والليوكوترين (Kiuchi *et al.*, 1992) وتثبيط الوسائط المؤيدة للالتهاب (Yadav *et al.*, 2003) كما تتميز الـ Diarylheptanoids أيضاً بأنشطة حيوية مضادة للفيروسات بما في ذلك فيروس الأنفلونزا (Sawamura *et al.*, 2010a ; 2010b)، فيروس شلل الأطفال، فيروس الحصبة،

فيروس القوباء المنطقية البسيط وفيروس شلل الأطفال من النوع 1 ; Konno *et al.*, 2011) (Konno *et al.*, 2013 وقد تم حتى الآن عزل 48 نوعاً من هذه المركبات من رايزومات الخولنجان منها 43 مركباً خطياً ومجموعة مركبات ثلاثية الحلقات واخرى تحمل الفلافونول (Li *et al.*, 2014) .

2-4-4. استعمالات نبات الخولنجان الأصغر

يعد الخولنجان الأصغر من الأعشاب الصينية المعروفة جيداً وهو نبات غير سام، صالح للأكل، طعمه لاذع ذات طابع دافئ، يستعمل منذ آلاف السنين في مناطق شرق آسيا في نظام الرعاية الصحية إذ تستعمل رايزوماته في مجال تخفيف آلام المعدة، علاج نزلات البرد، تنشيط الدورة الدموية وتقليل التورم (Pharmacoppoeia, 2010) تعزيز الشهية ، إزالة الانتفاخ، تعزيز الهضم، منع القيئ وتقليل التبول لدى مرضى السكري وقد ذكر العالم ابن سينا أنه يخفف المغص ويعزز الهضم بحرارته والإفرازات التي يسببها في المعدة كما يفيد للبلغم، يعطي عطراً للنفس، يضع السائل المنوي في حالة هيجان ويساعد على الانتصاب (Akbar, 2020)، وقد ذكر Chouni و Paul (2018) إن رايزومات النبات تستعمل أيضاً في علاج أمراض المعدة والكبد والكلى كما إنها مفيدة لتعزيزالنشاط الجنسي وتخفيف الصداع وآلام الروماتيزم والحماية من السرطان والسكري.

تمزج رايزومات الخولنجان في المغرب العربي مع مجموعة أخرى من النباتات لتكوين خليط يدعى msahan يستعمل في الطب التقليدي للعديد من الحالات المرضية إذ يتم تجفيف المواد النباتية وطحنها وخلطها مع الطعام لعلاج أمراض الصحة العامة وأمراض النساء والعضلات الهيكلية (Teixidor-Toneu *et al.*, 2016) وفي مقاطعة سيتشوان في الصين تستعمل الرايزومات لعلاج نزلات البرد والسعال ((Shang *et al.*, 2012) وفي ميزورام (في الهند) تستعمل مستحضرات رايزومات الخولنجان بشكل شائع لمساعدة الأطفال على التحدث (غسول للفم) وضد سلس البول الليلي (نقيع) وفي علاج التشنج العضلي (خليط من النقيع وزيت نباتي) (Sharma *et al.*, 2001) كما يستعمل النبات لعلاج العجز الجنسي في الطب الفارسي التقليدي (Kolangi *et al.*, 2019).

لا يقتصر استعمال الخولنجان على الجانب الصحي فقط بل يعد ذا قيمة غذائية إذ يحضر في المنزل بسهولة على شكل شاي , أما بمفرده أو ممزوجاً مع غيرة من الأعشاب , أو على شكل حساء بعد خلطه مع الرز أو على شكل نبيذ أو غير ذلك من المستحضرات (An *et al.*, 2010). يعد النبات بشكل عام من التوابل الآمنة لذا يستخدم في إعداد الطعام كتوابل أومطيبات (Dong *et al.*, 2015 ; Huang *et al.*, 2016) .

2-4-5. الفعالية الدوائية للخولنجان الأصغر

أشار Ding وجماعته (2019) في دراسته عن الفعالية الدوائية لرايزومات الخولنجان الأصغر أنها تمتلك أنشطة حيوية متعددة إذ تفيد كمضادات للجراثيم، مضادات للفيروسات، مضادات للسرطان، مضادات للأكسدة، مضادات للالتهابات، مضادات للسمنة كما تفيد لمعالجة النزيف المعدي المعوي.

تحتوي رايزومات الخولنجان على تراكيز عالية من فلافونول الكالانجين (Ma *et al.*, 2019) وتمتلك فعالية مضادة للقرحة والاسهال والسرطان (Reid *et al.*, 2016) والطفيليات والتهاب المفاصل والتدرن (Honmore *et al.*, 2016)، فضلاً عن دورها في تقليل شحميات الدم وفعاليتها المضادة للتخثر وداء السكري والاضطراب النفسي (Abubakar *et al.*, 2018).

أشار Kosar وجماعته (2009) إلى فعالية الخولنجان في علاج اضطرابات الجهاز الهضمي إذ يعمل كمضاد لنزيف القناة المعدية المعوية كما يعمل على مقاومة قرحة المعدة وحماية الغشاء المخاطي فيها وأنه عادة ما يتم دمجه مع Cyper Rhizoma، أو مع Cinnamomum cassia Presl و Feniculi Fructus و Corydalis Rhizoma لتعزيز التأثير المسكن لوجع المعدة الناجم عن البرد إذ لا ينبغي استخدامه بمفرده لما يسببه من تهيج.

بين Tian وجماعته (2009) إن مركبات diarylheptanoids المستخلصة من الخولنجان أظهرت نشاطاً مثبطاً لتقيؤ الدجاج الناجم عن تناول كبريتات النحاس عن طريق الفم وكان معدل تثبيط القيء بنسبة 71٪ عند التركيز 20 ملغم/ كغم من وزن الجسم كما بين Huang وجماعته (2016) إن المستخلص الكحولي (80٪) للخولنجان الأصغر خفف بشكل كبير من عسر الطمث الأولي, في حين أشار Huo وجماعته (2014) إلى قدرة الكالانجين على تحسين البهاق الناجم عن الهيدروكينون في الفئران.

- **الفعالية المضادة للبكتريا والفايروسات :**

تعد المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية مشكلة عالمية مهمة وإن إيجاد الحلول لهذه المشكلة يمثل مصدر قلق للعديد من العلماء (Ding *et al.*, 2019). تم اختبار نشاط مركب الكالانجين galangin بمفرده أو بالاقتران مع المضاد الحيوي β-lactam ضد السلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* المقاومة لل β-lactam في المختبر وقد أظهرت النتائج إن لهذا المزيج تأثيراً تآزرياً نتج عنه اختزال كبير لهذه السلالة خلال 6 ساعات، كما تبين أيضاً إن الجمع بين ceftazidime والكالانجين تسبب في تلف البنية الهيكلية لخلايا هذه السلالة وقد يتم ذلك عن طريق ثلاث آليات

رئيسة تتضمن تأثير الكالانجين على سلامة جدار الخلية ، تثبيط نشاط إنزيم penicillinase عن طريق التفاعل معه والتسبب في تلف الغشاء الخلوي (Eumkeb *et al.*, 2010).

بين الباحث Srividya وجماعته (2010) إن للخولنجان تأثير مثبط لسلالات *Helicobacter pylori, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa* *Escherichia coli* فيما أشار الباحث Konno وجماعته (2011) إلى أن مركبات diarylheptanoids المعزولة من الخولنجان الأصغر تمتلك فعالية حيوية ضد الفيروس المخلوي التنفسي respiratory syncytial virus (RSV) وفيروس شلل الأطفال وفيروس الحصبة وفيروس الهربس البسيط من النوع 1 Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) .

- **الفعاليات المضادة للالتهابات .**

أشارت دراسات سابقة إلى فعالية الكالانجين المضادة للالتهابات كالتهاب المفاصل الروماتويدي (Liu *et al.*, 2015a) وقدرته على تخفيف موت الخلايا المبرمج وتحسين الخلل الوظيفي في المايتوكوندريا (Li *et al.*, 2012) فضلاً عن دوره في تثبيط إنتاج β-amyloid ونشاط انزيم الأستيل كولين أستريز وإمكاناته العلاجية للزهايمر ونقص التروية الدماغية (Guo *et al.*, 2010 ; Zeng *et al.*, 2015) .

- **الفعاليات المضادة للسرطان .**

يمتلك الكالانجين أنشطة حيوية مضادة للسرطانات كسرطان الكبد، سرطان الرئة، سرطان المريء، سرطان المعدة، خلايا سرطان الرأس والعنق(Xu, 2013 ; Wang *et al.*, 2017a) وقد بيَّنت دراسات متعلقة بهذا المركب فعاليته المضادة للأورام كسرطان القولون (Ha *et al.*, 2013)، سرطان الثدي (Murray *et al.*, 2006)، وسرطان الجلد (Huo, 2013)، ابيضاض الدم النخاعي (Bestwick and Milne, 2006) وسرطان البروستات(Szliszka *et al.*, 2011) ، وقد بين Cao وجماعته (2016) إن تأثيرات الكالانجين المضادة للسرطان تكون عن طريق منع نمو الخلايا السرطانية، تثبيط غزو تلك الخلايا وتحفيز الموت المبرمج.

تعد مركبات Diarylheptanoids عناصر مهمة اخرى في الخولنجان الأصغر ذات تأثيرات واسعة النطاق ضد السرطان إذ أشار Tabata وجماعته (2009) إلى أن اثنين من هذه المركبات هما (5R)-5- و 7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-1-phenyl-4E-hepten-3-one) methoxy-7-(4''-hydroxy-3''-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone) أظهرا سمية خلوية كبيرة ضد خلايا الورم الأرومي العصبي عن طريق إحداث الانكماش النووي والتفتت.

وجد Wei وجماعته (2016) إن مركب Alpinisin A المعزول من رايزومات الخولنجان يمتلك تأثيرات مثبطة كبيرة ضد خلايا سرطان المعدة.

2-4-6. تقييم السمّية والسلامة لنبات الخولنجان

أظهر اختبار تهيج الجلد أن زيت الخولنجان يسبب تهيجاً طفيفًا فقط على جلد الأرانب لمدة 24 ساعة في حين لم تلاحظ أي آثار سلبية على الجلد السليم والجلد المخدوش بعد أسبوع واحد من المعاملة كما لم تظهر آثاراً جانبية واضحة على الأرانب في وزنها وشعرها وجلدها وجهازها التنفسي ونشاط أطرافها (Liu *et al.*, 2015b).

أظهرت دراسة سريرية مضبوطة بدواء placebo (الدواء الوهمي) على متطوعين أصحاء إن تطبيق Ankaferd blood stopper (ABS) الموضعي لمدة 120 دقيقة لم يظهر اختلافاً عن الدواء الوهمي من حيث نتائج الجلد الموضعية والاختبارات الجهازية (Balcik *et al.*, 2012) لذا يعد كل من تناول الخولنجان عن طريق الفم والاستخدام الخارجي آمناً .

تم تقييم السمية والسلامة للمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان حتى 4000 مغم/كغم، ولم يُظهر إعطاء المستخلص للجرذان عن طريق الفم بتركيز 400 مغم/كغم أي علامة من علامات السمية أو الوفاة خلال فترة 24 ساعة كما أوضح اختبار السمية شبه المزمن الطبيعة غير السامة للمستخلص إذ لم تُظهر الجرعة العلاجية اليومية (400 مغم/كغم) فموياً لمدة 35 يوماً أي تغيير في وظائف الكبد والكلى (Alasmary *et al.*, 2019) مما يعني أن المستخلص النباتي غير سام للكبد والكلية (Rysz *et al.*, 2017) ويعد آمناً للاستخدام البشري (Ooi *et al.*, 2016).

3. المواد وطرائق العمل Materials and methods

3-1. المواد Materials

3-1-1. المواد الكيميائية Chemical Materials

جدول (3-1) المواد الكيميائية المستعملة والشركات المجهزة لها :

المنشأ Origin	Company الشركة	Materials المواد	ت
France	Biolabo	Potassium acetate أسيتات البوتاسيوم	.1
Switzerland	Fluka AG, Buchs	Red Mercuric Oxide أوكسيد الزئبق الاحمر	.2
Spain	Scharlau	Absolute Ethanol ايثانول مطلق	.3
USA	Santa Cruse Biotechnologies	Bisphenol A بيسفينول أ	.4
England	Hopkins and Williams	Picric acid حامض البكريك	.5
England	Hopkins and Williams	Gletial acetic acid حامض الخليك الثلجي	.6
England	Hopkins and Williams	H2SO4 حامض الكبريتيك المركز	.7
England	Hopkins and Williams	HCL حامض الهيدروكلوريك	.8
England	Hopkins and Williams	Anhydride acetic acid حامض خليك اللامائي	.9
England	BDH Chem. Ltd Pool	Lead acetate خلات الرصاص	.10
Spain	Scharlau	Xylene زايلين	.11
Turkey	Paradise Extra	Olive oil زيت الزيتون النقي	.12
England	BDH Chem. Ltd Pool	Sodium citrate سترات الصوديوم	.13
France	Biolabo	$K_4(Fe(CN)_6)$ سيانيد الحديد البوتاسيومي	.14
England	BDH Chem. Ltd Pool	Potassium alum شب البوتاسيوم	.15
England	BDH Chem. Ltd Pool	Paraffin Wax شمع البارافين	.16

U.S.A	Biocompare	Comet assay Kit عدة اختبار المذنب	.17
France	Biomerieux	GSH Kit عدة فحص الجلوتاثيون	.18
Germany	Spectrum	MDA Kit عدة فحص المالون ثنائي ألدهايد	.19
France	Biomerieux	SOD Kit عدة فحص نشاط أنزيم الـ SOD	.20
France	Biomerieux	CAT Kit عدة فحص نشاط أنزيم الكاتليز	.21
U.S.A	Monobind inc.	FSH ELIZA Kit عدة فحص هرمون FSH	.22
U.S.A	Monobind inc.	ICSH ELIZA Kit عدة فحص هرمون ICSH	.23
U.S.A	Monobind inc.	Testosterone ELIZA Kit عدة فحص هرمون T	.24
Iraq	Iraqi co.	Formalin فورمالين	.25
France	Biolabo	$NaCO_3$ كاربونات الصوديوم	.26
England	BDH Chem. Ltd Pool	$CuSO_4$ كبريتات النحاس	.27
India	SDFCL	Chloroform كلوروفورم	.28
France	Biolabo	Aluminium chloride كلوريد الالمنيوم	.29
England	BDH Chem. Ltd Pool	$FeCl_2$ كلوريد الحديديك	.30
England	BDH Chem. Ltd Pool	Hg_2Cl_2 كلوريد الزئبقيك	.31
England	BDH Chem. Ltd Pool	Glycerol كليسرول	.32
Germany	Schuchardt Manchen	Canada Balsam كندا بلسم	.33
France	Biolabo	Quercetin كيرستين	.34
Iraq	Pioneer	Normal saline محلول الملح الفسيولوجي 0.9%	.35
England	BDH Chem. Ltd Pool	Eosin stain ملون الأيوسين	.36
Switzerland	Fluka , AG , Buchs	Negrosin stain ملون النجروسين	.37
England	BDH Chem. Ltd Pool	Hemotoxyline ملون الهيماتوكسلين	.38

England	BDH Chem. Ltd Pool	Y eosin stain ملون أيوسين Y	.39
England	BDH Chem. Ltd Pool	NaOH هيدروكسيد الصوديوم	.40
England	BDH Chem. Ltd Pool	Potassium Iodide يوديد البوتاسيوم	.41
France	Biolabo	Folin-Ciocalteu	.42

2-1-3. الأجهزة والأدوات المختبرية Laboratory Tools and apparatus

جدول (2-3) الأجهزة والأدوات المستعملة والشركات المجهزة لها :

المنشأ Origin	Company الشركة	الأجهزة والأدوات المختبرية Laboratory Tools and apparatus	ت
Germany	Esplf	Test tubes أنابيب اختبار	.1
China	Changzhou company	Feeding tubes انابيب تغذية	.2
France	Concord	Refrigerator ثلاجه	.3
Germany	Agilent Tecchnologies	جهاز GC-Mass	.4
USA	Bio Rad	Electrophoresis جهاز الترحيل الكهربائي	.5
Belgium	CYAN	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	.6
Germany	Letiz	Rotary microtome جهاز المشراح الدوار	.7
U.S.A	Milton Roy Company	Spectrophotometer جهاز المطياف الضوئي	.8
U.S.A.	Bio-tech instruments	ELIZA system جهاز إليزا	.9
Turkey	Niive	Incubator حاضنه	.10
Germany	Julabo	water bath حمام مائي	.11
Germany	----------	زجاجيات مختلفة الاحجام والاشكال	.12
Pakistan	S.I.E	Dissecting Set سيت تشريح	.13
China	MHECO	Slides and Covers شرائح زجاجية واغطيتها	.14

Germany	Hermile	Hemocytometer شريحة عد كريات الدم	.15
Germany	Memmert	Hot Plate صفيحة ساخنة	.16
Egypt	AL-Araby	Grinder طاحونة كهربائية	.17
Germany	Memmert	Oven فرن كهربائي	.18
Japan	Sonyo	Digital Camera كاميرا رقمية	.19
U.S.A	BUCHI	Rotary Evaporator مبخر دوار	.20
Germany	Zeiss	Fluorescent Microscope مجهر متألق	.21
Japan	Olympus	Compound Microscope مجهر مركب	.22
China	Changzhou company	Disposable syringes محاقن طبية نبيذة	.23
England	Leitz Wetzlar	Rotary Microtome مشراح يدوي	.24
Germany	GmbH	Ocular micrometer مقياس عيني دقيق	.25
Germany	Sartorius	Electronic Balance ميزان الكتروني	.26
Germany	Denver Instrument	Sensitive balance ميزان حساس	.27
China	Citotest Labware	Filter paper ورق ترشيح	.28

3-1-3. حيوانات التجربة Experimental animals

إستُعمل في الدراسة 54 حيوان من الجرذان البيض الذكور البالغة نوع *Rattus rattus* بعمر 14 اسبوعاً ووزن 200-220 غرام. جُلبت الحيوانات من البيت الحيواني في كلية العلوم/ جامعة الكوفة ونُقلت إلى مكان الدراسة في البيت الحيواني التابع إلى كلية الصيدلة/ جامعة كربلاء ووضعت في أقفاص من الألمنيوم فرشت أرضيتها بنشارة الخشب وتم الاعتناء بتنظيفها بصورة مستمرة وتعقيمها بمطهر كحول الايثانول بواقع مرة اسبوعياً. عُرِّضَت الحيوانات إلى ظروف مختبريه مناسبة من حيث التهوية والإضاءة (12 ساعة ضوء: 12ساعة ظلام) ودرجة الحرارة (22-28 درجة مئوية) وأعطيت الماء والعليقة بشكل حر *ad libitum* خلال مدة التجربة. تُركت الجرذان للتأقلم لمدة اسبوعين قبل بدء التجربة.

3-1-4. جمع النبات وتشخيصه Collection and Classification of plant

جمعت رايزومات نبات الخولنجان من الاسواق المحلية العراقية وشخصت في قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء . تم تنظيفها ثم تجفيفها في الظل بدرجة حرارة الغرفة وحفظت بعد ذلك في حاوية معتمة لحين الاستعمال.

3-2. طرائق العمل Methods

3-2-1. تحضير المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان

طحنت رايزومات النبات المجففة باستعمال طاحونة الكهربائية ثم جرت عملية الاستخلاص وفقاً لطريقة الباحث Kolangi وجماعته (2019) وذلك بوضع 100غم من المسحوق الناعم لرايزومات النبات في قنينة زجاجية معتمة و أضيف له 500 مل من الكحول الأثيلي (تركيز70%) وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 72 ساعة مع الرج بين فترة وأخرى . رُشح المخلوط بوساطة شاش معقم وأوراق ترشيح ووضع الراشح في أوعية زجاجية نظيفة وتم تركيزه في مبخر دوار بدرجة حرارة 45 درجة مئوية . جُمع المستخلص وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال . كررت العملية عدة مرات للحصول على الكمية الكافية لإتمام التجربة.

3-2-2. الكشوفات النوعية والكمية عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر A.officinarum

3-2-2-1. الكشوفات التمهيدية الإستدلالية عن المركبات الفعّالة.

1- الكشف عن القلويدات Detection of Alkaloids

كاشف ماير Mayer's reagent: يفيد في الكشف عن عموم القلويدات ويحضر بإذابة 13.5غم من كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ و 5 غم من يوديد البوتاسيوم KI في لتر من الماء مقطر. يتم الاختبار بإضافة 1-2 مل من الكاشف إلى 5 مل من المستخلص المائي أو الكحولي فيظهر راسب أبيض إلى أسمر يدل على وجود القلويدات (Harborne, 1984).

2- الكشف عن الستيرويدات Detection of steroids

اختبار ليبرمان Liebermans test : يتم بإذابة 0.5 غم من المستخلص في 2 مل من الخليك اللامائي acetic anhydride ثم يبرد المحلول جيدا في حمام ثلجي ويضاف له بهدوء حامض الكبريتيك المركز. يدل ظهور لون يتغير من الارجواني إلى الأزرق ثم الاخضر على وجود الستيرويدات (Harborne, 1989).

3- الكشف عن التربينويدات Detection of terpenoids

اختبار سالكوسكي Salkowski test: يذاب 0.5 غم من المستخلص في 2 مل من الكلوروفورم في انبوب اختبار ثم يضاف حامض الكبريتيك المركز بهدوء على جدران الانبوب ليكون طبقة سفلية وعند ظهور لون بني محمر بين الطبقتين يكون دلالة على وجود التربينات (Harborne ,1989).

4- الكشف عن الفينولات Detection of phenoles

كاشف الفينولات العام: يحضر هذا الكاشف من خلط حجمين متساويتين من محلول كلوريد الحديديك المائي1% وسيانيد الحديد البوتاسيومي المائي1%. يتم الكشف باذابة 0.5 غم من المستخلص الكحولي في 10مل من الماء المقطر في انبوبة اختبار بعدها يرشح المحلول ثم تضاف إليه ثلاث قطرات من الكاشف المحضر حديثاً وعند ظهور لون أخضر مزرق يكون دلالة على وجود المركبات الفينولية (Harborne, 1989).

5- الكشف عن الفلافونويدات Detection of flavonoids

كاشف خلات الرصاص10% Lead acetate reagent: يُذاب 0.5غم من المستخلص في الماء المقطر ثم يضاف له 1مل من الكاشف وعند ظهور راسب اصفر فأنه يدل على وجود الفلافونيدات (Harborne, 1989).

6- الكشف عن الصابونينات Detection of saponins

اختبار الرغوة Foam test: يُمزج 0.5غم من المستخلص مع 10مل ماء مقطر في انبوب اختبار, يغلق الانبوب ثم يُرج بقوة لمدة 30 ثانية وعند تكون رغوة كثيفة على السطح تستمر لفترة طويلة فأنه يدل على وجود الصابونينات (Harborne, 1989).

7- الكشف عن التانينات Detection of tannins

كاشف1% كلوريد الحديديك FeCl: تضاف كمية من الكاشف إلى كمية مناسبة لها من المستخلص المائي أو الكحولي فيظهر راسب أخضر مزرق في حال وجود التانينات (المختار, 1994).

8- الكشف عن الكلايكوسيدات Detection of glycosides

كاشف فهلنك Fehling's reagent : يستخدم للكشف عن السكريات المختزلة ويتكون من محلولين: فهلنك A (يحضر باذابة 34.66غم من كبريتات النحاس في الماء المقطر ويكمل الحجم إلى 500مل) وفهلنك B (يحضر باذابة 173غم طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم, و50غم هيدروكسيد الصوديوم في الماء المقطر ويكمل الحجم إلى 500مل), يمزج المحلولان بالتساوي قبل الاستعمال وحسب الكمية المطلوبة. يتم الكشف بإذابة جزء صغير من المستخلص في 5مل من الماء المقطر ثم يرشح المحلول وبعد ذلك يضاف له 5مل من الكاشف ويغلى في حمام مائي لمدة 10 دقائق وعند ظهور راسب أحمر فأنه يدل على وجود السكريات المختزلة (Harborne, 1984).

3-2-2-2. التقدير الكمي للمحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر A.officinarum

1- تقدير المحتوى الكلي للفينولات Estimation of Total phenol content (TPC)

تم تقدير المحتويات الفينولية في المستخلص الكحولي بطريقة Folin-Ciocalteu الموصوفة من قبل الباحث Devi وجماعته (2018), إذ تمت إضافة 2.5 مل من (10%) Folin-Ciocalteu و2 مل من كاربونات الصوديوم (2%W/V) NaCo3 إلى 0.5 مل من محلول المستخلص النباتي (1 ملغم/مل). تم حضن المخلوط عند 20 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة بعدها حددت الامتصاصية باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند 760 نانوميتر. تم تكرار نفس الإجراء مع المحلول القياسي حامض الكاليك Gallic (1ملغم/مل) عن طريق عدة تراكيز لإنشاء منحنى المعايرة الخطي (الامتصاصية مقابل التركيز) وقد انجزت جميع الاختبارات السابقة بثلاث مكررات. بالاعتماد على منحنى المعايرة تم التعبير عن المحتوى الفينولي الكلي في المستخلص النباتي كمكافئ لحامض الكاليك بوحدات ملغم/غم من الوزن الجاف.

2- تقدير المحتوى الكلي للفلافونويدات Estimation of Total flavonoid (TPC)

تم اعتماد طريقة القياس الطيفي لكلوريد الألومنيوم الموصوفة من فبل الباحث Devi وجماعته (2018) لتقدير المحتوى الكلي للفلافونويدات إذ أخذ 0.5 مل من المحلول الكحولي للمستخلص النباتي (1 ملغم/مل) بثلاثة مكررات وأضيف له 0.1 مل من كلوريد الألمنيوم (10٪) , 0.1 مل من أسيتات البوتاسيوم (1مول) و 2.8 مل من الماء المقطر ليكون الحجم الكلي 3.5 مل. حفظ خليط التفاعل في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة ، تم قياس الامتصاص عند 415 نانومتر باستخدام مقياس الطيف الضوئي. تم تكرار نفس الإجراء مع الكيرسيتين Quercetin (0.1 ملغم/مل) كمحلول قياسي عن طريق عدة تراكيز لإنشاء منحنى المعايرة الخطي (الامتصاصية مقابل التركيز) وقد انجزت جميع الاختبارات السابقة بثلاث مكررات. بالاعتماد على منحنى المعايرة تم التعبير عن المحتوى الكلي للفلافونويدات كمكافئ للكيرسيتين بوحدات ملغم/غم من الوزن الجاف.

3-2-2-3. تشخيص وفصل المركبات الفعالة في مستخلص الخولنجان بواسطة جهاز GC-MS.

تم تحليل المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر وفصل مركباته الفعالة باستعمال جهاز (GC-MS) وقد أجري الاختبار في كلية العلوم/جامعة القادسية باعتماد ظروف الفصل المبينة في الجدول (3-3).

جدول (3-3) ظروف الفصل في جهاز كروماتوكرافيا الغاز المدمج بمطياف الكتلة (GC-MS) للمستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر *A. Officinarum*

No	Vacabulary adverbs of class	Separation conditions spescifications
1.	Column Oven Temp	70.0 °C
2.	Injection Temp.	220.00 °C
3.	Injection Mode	Split
4.	Flow Control Mode	Pressure
5.	Pressure	31.5 kPa
6.	Total Flow	10.3 mL/min
7.	Column Flow	0.67 mL/min
8.	Linear Velocity	29.9 cm/sec
9.	Injection Volume	1µl

تم تشخيص المركبات المفصولة عن طريق مقارنتها بالمركبات القياسية الموجودة في برنامج مكتبة المركبات NIST mass spectral program NIST/EPA/NH mass spectral library of the NIST08.LIB and 2008/2 of version المدمج مع الجهاز وتم حساب النسبة المئوية من تطبيق القانون التالي :

النسبة المئوية للمركب = 100×T/S

إذ أن: T: تمثل مساحة المنحني للمركب المعزول من العينة, S: تمثل المساحة الكلية

3-2-3. تصميم تجارب الدراسة :

اشتملت الدراسة على تجربتين تضمنت **الأولى** تحديد تركيز المستخلص الكحولي الأكثر فعالية من بين ثلاث تراكيز تصاعدية (100, 200, 400 ملغم/كغم) آمنة للاستخدام (Alasmary *et al.,* 2019) إذ تم اختبار دورها الوقائي ضد التأثير التأكسدي الناجم عن المعاملة بمركب البيسفينول أ (50 ملغم/كغم) لمدة 30 يوماً , فيما تضمنت **التجربة الثانية** تقييم دور المستخلص الكحولي بالتركيز الذي تم اختياره وفقاً لنتائج التجربة الأولى (400 ملغم/كغم) ضد السمية التكاثرية الناجمة عن المعاملة بالبيسفينول أ (50 ملغم/كغم) لمدة 60 يوماً عن طريق مجموعة معايير تضمنت وزن الجسم وأوزان الخصى والبرابخ, معايير النطف, هرمونات التكاثر, عوامل الأكسدة, مضادات الأكسدة, التغيرات النسجية في الخصى والبرابخ وتقدير درجة تلف الحامض النووي DNA عن طريق اختبار المذنب comet assay , وكما موضح في الشكل 3-1.

شكل 3-1 مخطط تصميم التجربة

3-2-4. مجاميع حيوانات التجربة Groups of experimental animals

التجربة 1:

استعمل في التجربة الأولى 24 جرذاً ذكراً بالغاً (200-250 غرام) قسمت إلى أربع مجاميع متساوية وعوملت بمعاملات مختلفة لمدة 30 يوماً وكما يلي :

1- **مجموعة السيطرة:** تركت بدون معاملة خلال مدة التجربة.

2- **مجموعة الوقاية الأولى :** جرعت فموياً بمستخلص الخولنجان الأصغر (100 ملغم/كغم) بعد إذابته في 0.2 مل ماء مقطر, ثم أعطيت جرعة بيسفينول أ (50 ملغم/كغم) بعد ساعة من المعاملة الأولى (Alboghhobeish *et al.*, 2019).

3- **مجموعة الوقاية الثانية :** جرعت فموياً بمستخلص الخولنجان الأصغر (200 ملغم/كغم) ثم أعطيت جرعة بيسفينول أ (50 ملغم/كغم) بعد ساعة من المعاملة الأولى.

4- **مجموعة الوقاية الثالثة :** جرعت فموياً بمستخلص الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) ثم أعطيت جرعة بيسفينول أ (50 ملغم/كغم) بعد ساعة من المعاملة الأولى.

بعد 24 ساعة من أخر جرعة, سحبت عينات الدم عن طريق طعنة القلب وتركت لمدة 30 دقيقة لحين تخثرها ثم نقلت إلى جهاز الطرد المركزي (3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة) لفصل المصل الذي استعمل لتقدير نشاط أنزيم السوبرأوكسيد ديسميوتيز SOD activity (ملحق 1) والذي تم اعتماده كمؤشر لتحديد كفاءة المستخلص ضد التأثير التأكسدي الذي ينتج عن التعرض لمركب البيسفينول أ.

التجربة الثانية :

بناءً على نتائج التجربة الأولى تم اعتماد التركيز 400 ملغم/كغم من المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان لتقييم فعاليته ضد السمية التكاثرية الناجمة عن التعرض لمركب البيسفينول أ (50 ملغم/كغم) لمدة 60 يوماً , إذ وزعت حيوانات التجربة البالغ عددها 30 جرذاً بالغاً (200-220 غرام) بصورة عشوائية إلى خمس مجاميع وبواقع ستة حيوانات لكل مجموعة وعوملت كما يلي:

1- مجموعة السيطرة (C) : تركت بدون معاملة وعُدّت مجموعة سيطرة سالبة.

2- مجموعة المعاملة 1 (T1) : جرعت الحيوانات (جرعة مفردة / يوم) 0.2 مل من زيت الزيتون النقي وعدت مجموعة سيطرة لمادة زيت الزيتون.

3- مجموعة المعاملة 2 (T2) : جرعت الحيوانات (جرعة مفردة / يوم) بمستخلص رايزومات الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) بعد إذابته في 0.2 مل ماء مقطر.

4- مجموعة المعاملة 3 (T3) : جرعت الحيوانات (جرعة مفردة / يوم) بالبيسفينول أ (50ملغم/كغم) بعد إذابته في 0.2 مل زيت الزيتون (Alboghhobeish *et al.*, 2019) .

5- مجموعة المعاملة 4 (T4) : تمثل مجموعة الوقاية وقد جرعت حيواناتها (جرعة مفردة / يوم) بمستخلص رايزومات الخولنجان الأصغر (400 ملغم/كغم) بعد إذابته في 0.2 مل ماء مقطر أعقبتها بعد ساعة واحدة جرعة من البيسفينول أ (50ملغم/كغم) بعد إذابته في 0.2 مل زيت الزيتون.

3-2-5. التضحية بالحيوانات وجمع عينات الدم:

وُزِّنَت الحيوانات عند بداية التجربة كما وُزِّنَت بعد 24 ساعة من اعطاء آخر جرعة, بعدها مُنع عنها الغذاء طوال الليل ثم خدرت بالكلوروفورم وتم سحب الدم من القلب عن طريق ما يسمى بطعنة القلب Heart puncture للحصول على الكمية الكافية منه ووضع في أنابيب اختبار ثم ترك لمدة 30 دقيقة لحين تخثره ونقل بعد ذلك إلى جهاز الطرد المركزي لفصل المصل وبسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة. وُزِّع المصل على عدة أنابيب أبندروف حفظت في الثلاجة عند 20- درجة مئوية لحين إجراء الاختبارات الخاصة بهرمونات التكاثر وعوامل ومضادات الاكسدة.

بعد سحب الدم فُتِح التجويف البطني للجرذان باستخدام مشرط ومقص حاد وتم استئصال الخصى البرابخ وضعها في طبق بتري حاوي على محلول الملح الفسيولوجي لمنع جفافها ثم أزيلت منها المواد الدهنية الملتصقة بها وأُخذت أوزانها بوساطة ميزان الكتروني حساس. تم تثبيت الخصية اليمنى والبربخ الأيمن لكل حيوان في مثبت بوين Bouin's solution (ملحق2-1) لمدة 24 ساعة ثم نُقِلت إلى كحول أثيلي 70% لغرض تحضير المقاطع النسجية لتلك العينات في حين استعملت الخصية اليسرى والبربخ الأيسر لدراسة معايير النطف واختبار المذنب comet assay.

3-2-6. دراسة معايير النطف Study of Sperms Parameters

3-2-6-1. أعداد النطف في الخصية Sperm count of testis

هُرِسَت الخصية اليسرى باستخدام إبره دقيقة بعد أن وضعت في طبق بتري وأضيف إليها 9.8 مل من محلول الفورمالين الملحي Formal saline المحضر مسبقاً (ملحق2-2), تم المزج جيدا ثم أضيف (0.2 مل) من ملوّن الأيوسين (ملحق 3-1) بعدها أخذت قطرة من المحلول المتجانس ووضعت على شريحة عد الخلايا الدموية Haemocytometer chamber وتركت لمدة 5 دقائق لكي تستقر النطف على مربعات الشريحة ثم فحصت بمجهر مركب نوع Olympus تحت القوة 40X. حُسِبت النطف في 80 مربعاً صغيراً موزعة على خمسة مربعات متوسطة (الأربعة الركنية والمربع والوسط) وتم تطبيق المعادلة الآتية لاستخراج أعداد النطف في الخصية (الإنتاج الكلي للخصية من النطف): (Sakamoto and Hashimoto, 1986).

العدد الكلي للنطف = $N/80 \times 400 \times 1000 \times 10 \times 10$

إذ أن :

N : مجموع النطف في خمس مربعات متوسطة (الأربعة الركنية والوسط).

80 : عدد المربعات الصغيرة في خمسة مربعات متوسطة.

400 : العدد الكلي للمربعات الصغيرة في الشريحة.

1000 : لمعرفة عدد النطف في 1 مل.

10 : مقدار التخفيف.

10 : ارتفاع الشريحة.

3-2-6-2. أعداد النطف في ذيل البربخ Sperm count of epididymis cauda

تم فصل ذيل البربخ الأيسر بالمقص ووضع في 3 مل من محلول الملح الطبيعي ثم قُطّع بمشرط حاد لتحرير النطف وبعد الخلط وضعت قطرة من المحلول على شريحة العد وفحصت تحت القوة 40 X بعدها تم حساب تركيز النطف/مل بذات الطريقة المتبعة لتقدير الانتاج الكلي للنطف في الخصية.

3-2-6-3.النسبة المئوية للنطف المتحركة The percentage of motile sperms

وضعت قطرة من محلول البربخ على شريحة زجاجية وتم عد النطف المتحركة من بين العدد الكلي للنطف في عشرة حقول عشوائية وحسبت النسبة المئوية للنطف المتحركة وفقاً للمعادلة الاتية:- (Hinting,1989).

النسبة المئوية للنطف المتحركة = (معدل عدد النطف المتحركة / معدل العدد الكلي للنطف) × 100

3-2-6-4. النسبة المئوية للنطف الحية The percentage of live sperms

أخذت قطرة من محلول البربخ أعلاه ووضعت على شريحة زجاجية وأضيف لها قطرة من ملون الأيوسين-النجروسين المُحضر مسبقاً (ملحق3-2), خلطت القطرتان برفق وتركت الشريحة حتى تجف ثم فحصت بالمجهر تحت قوة X40 وتم حساب 200 نطفة لاستخراج النسبة المئوية للنطف الحية بالاعتماد على أصطباغ النطف الميتة بالأيوسين وعدم اصطباغ النطف الحية, وفقاً للمعادلة الآتية: (Zeneveld and Polakaki ,1977)

النسبة المئوية للنطف الحية = (عدد النطف غير المصطبغة / العدد الكلي للنطف) × 100

3-2-6-5. النسبة المئوية للنطف اللاسويَّة The percentage of abnormal sperms

استعملت شريحة حساب النسبة المئوية للنطف الحية نفسها لتقدير نسبة النطف السوية عن طريق دراسة التشوهات في الرأس، الذيل، موقع القطرة الهيولية وتشوهات القطعة الوسطية للنطف المفحوصة. فحصت الشريحة على قوة تكبير 40X وتم عد النطف المشوهة ضمن 200 نطفة ثم طبقت المعادلة الاتية لحساب نسبة النطف السوية :- (Hinting, 1989)

النسبة المئوية للنطف السوية = (عدد النطف اللاسوية / العدد الكلي للنطف) × 100.

3-2-7. تقدير مستويات الهرمونات Estimation of hormones levels

اعتمدت طريقة المقايسة الامتصاصية المناعية للأنزيم المرتبط Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) والتي وضعت من قبل الباحث Wisdom (1976) لتقدير مستويات الهرمونات في مصل الدم وقد قُرِئت الامتصاصية على الطول الموجي 450 نانوميتر , إذ تم قياس مستوى هرمون الشحمون الخصوي والهرمونين المحفز للخلايا البينية والمحفز للجريبات باستخدام عدة التحليل Kit الخاصة بكل واحد من تلك الهرمونات.

3-2-7-1. تقدير مستوى هرمون الشحمون الخصوي: Estimation of T hormone levels

أ- المبدأ Principle

يقوم مبدأ الاختبار على الارتباط بين المستضدات والاجسام المضادة فعند إضافة كاشف الأنزيم Enzyme Reagent وكاشف البيوتين Biotin Reagent (الجسم المضاد) إلى الحفر الحاوية على المحاليل القياسية أو عينات المصل فان الأخير يتفاعل مع هرمون الشحمون الخصوي ومع كاشف الأنزيم كل على حدة كما إنه يتفاعل بعد ارتباطه بهذه المستضدات مع مركب الـ Streptavidin المرتبط بالحفر لتكوين معقد سندويج مرتبطاً بالطور الصلب, واخيراً تضاف المادة الاساس وتقرأ الامتصاصية عند طول موجي 450 نانوميتر.

ب- طريقة العمل Procedure

1- يثبت العدد المناسب من الحفر على المسند الخاص بها, والمجهز مع طقم الهرمون .
2- يؤخذ 20 مايكرولتر من المحلول القياسي أو عينات المصل وتوضع في الحفر المخصصة لها.
3- يضاف 50 مايكرولتر من الكاشف الأنزيمي للهرمون إلى كل حفرة.
4- ترج الحفر بلطف لمدة 20-30 ثانية لغرض المزج.
5- يضاف 50 مايكرولتر من كاشف البيوتين إلى كل حفرة.
6- ترج الحفر بلطف لمدة 20-30 ثانية لغرض المزج.
7- تغطى الصفيحة وتحضن لمدة 60 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
8- تزال محتويات الحفر بالنقر أو باستخدام ورق ماص.
9- تغسل الصفيحة بوساطة محلول الغسيل المنظم خمس مرات.
10- يضاف 100 مايكرولتر من محلول المادة الاساس إلى كل حفرة.
11- تحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة.
12- يضاف 50 مايكرولتر من محلول الايقاف إلى كل حفرة ويمزج بلطف لمدة 15-20 ثانية.

13- تقرأ الامتصاصية في كل حفرة عند طول موجي 450 نانومتر خلال 30 دقيقة من إضافة محلول الايقاف.

ج- الحسابات calculation

يتم رسم منحنى المعايرة بين قيم التراكيز للمحاليل القياسية (على المحور السيني) وما يقابلها من قيم الكثافة الضوئية Optical Density (OD) (على المحور الصادي) ثم يرسم افضل خط مستقيم يمر على اغلب النقاط لكي يستخدم في تحديد تركيز الهرمون في عينات المصل بالاعتماد على قيم امتصاصيتها, أو تستخرج معادلة المستقيم باستخدام الكمبيوتر ثم تعتمد تلك المعادلة في استخراج تركيز الهرمون بعد ادخال قيمة الكثافة الضوئية للعينة, كما في الشكل (3-2).

شكل(3-2) المنحنى القياسي لتقدير تركيز هرمون الشحمون الخصوي T

3-2-7-2. تقدير مستوى الهرمون المحفز للخلايا البينية: Estimation of ICSH levels

أ- المبدأ Principle

يقوم مبدأ الاختبار على اساس التفاعل بين المستضد Antigen (الهرمون في المحلول القياسي أو المصل) وبين الأنزيم والجسم المضاد (Biotinylated Monoclonal antibody) الموجودان ضمن الكاشف الأنزيمي للهرمون المحفز للخلايا البينية ICSH-Enzyme Reagent (مجهز ضمن عدة القياس) لتكوين معقد يشبه السندويج, وفي نفس الوقت يتفاعل الجسم المضاد مع مركب Streptavidin المرتبط بالحفر فيصبح المعقد مرتبطاً بالطور الصلب (الحفر), واخيرا تضاف المادة الاساس للأنزيم الكاشف وتقرأ الامتصاصية عند طول 450 نانومتر.

ب- طريقة العمل Procedure

1- يثبت العدد المناسب من الحفر على المسند الخاص بها والمجهز مع طقم الهرمون .

2- تؤخذ 50 مايكرولتر المحاليل القياسية أو عينات المصل وتوضع في الحفر المهيأة لها.

3- تضاف 100 مايكرولتر من محلول الكاشف الأنزيمي للهرمون المحفز للخلايا البينية لكل حفرة .

4- يتم الخلط بدقة لمدة 20-30 ثانية .

5- تحضن الحفر لمدة 60 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.

6- يُزال الخليط المحضون من الحفر بوساطة النقر بالأصبع أو بجهاز خاص لسحب الخليط .

7- تغسل الصفيحة بوساطة محلول الغسيل المنظم خمس مرات .

8- تضرب الصفيحة ذات المعايير الدقيقة بشدة على ورق مجفف لإزالة قطرات الماء المتبقية.

9- تضاف 100 مايكرولتر من محلول المادة الاساس لكل حفرة ثم ترج برفق لمدة 10 ثوانٍ.

10- تحضن الصفيحة بمحتوياتها عند درجة حرارة الغرفة لمدة 15 ثانية.

11- يضاف 50 مايكرولتر من المحلول الموقف للحفر وتمزج المحتويات بدقة لمدة 15-20 ثانية.

12- تقرأ الامتصاصية لكل حفرة عند طول موجي 450 نانومتر بواسطة جهاز ELISA Reader.

ج- الحسابات calculation

يتم رسم منحنى المعايرة بين قيم التراكيز للمحاليل القياسية وما يقابلها من قيم الكثافة الضوئية ثم يرسم أفضل خط مستقيم يمر على أغلب النقاط لكي يستخدم في تحديد تركيز الهرمون المحفز للخلايا البينية في عينات المصل بعد تحديد قيم امتصاصيتها أو تستخرج معادلة المستقيم باستخدام الكمبيوتر وتعتمد في استخراج تركيز الهرمون بعد ادخال قيمة الكثافة الضوئية للعينة كما في الشكل (3-3).

شكل (3-3) المنحنى القياسي لتحديد تركيز الهرمون المحفز للخلايا البينية ICSH

3-2-7-3. قياس مستوى الهرمون المحفز للجريبات: Estimation of FSH level

أ- المبدأ Principle

يقوم مبدأ الاختبار على اساس التفاعل بين المستضد Antigen (الهرمون في المحلول القياسي أو المصل) وبين الأنزيم والجسم المضاد (Biotinylated monoclonal antibody) الموجودان ضمن محلول الكاشف الأنزيمي للهرمون المحفز للجريبات FSH-Enzyme Reagent (مجهز ضمن عدة القياس) لتكوين معقد يشبه السندويج, وفي ذات الوقت يتفاعل الجسم المضاد أيضاً مع مركب Streptavidin المرتبط بالحفر فيصبح المعقد مرتبط بالطور الصلب (الحفر), واخيراً يضاف محلول المادة الاساس وتقرأ الامتصاصية عند طول موجي 450 نانوميتر.

ب- طريقة العمل Procedure

1- يثبت العدد المناسب من الحفر على الحامل الخاص بها والمجهز مع طقم الهرمون .

2- يؤخذ 50 مايكرولتر من المحاليل القياسية أو عينات المصل وتوضع في الحفر المهيأة لها .

3- تضاف 100 مايكرولتر من محلول الكاشف الأنزيمي للهرمون المحفز للجريبات FSH-Enzyme Reagent لكل حفرة.

4- تخلط المحتويات بدقة لمدة 20-30 ثانية .

5- تحضن لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة.

6- يزال الخليط المحضون من الحفر بوساطة النقر بالأصبع أو بجهاز خاص لسحب الخليط .

7- تغسل الصفيحة بالماء المقطر خمس مرات .

8- تضاف 100 مايكرولتر من محلول المادة الاساس للأنزيم الكاشف إلى كل حفرة .

9- تحضن عند درجة حرارة الغرفة لمدة 15 ثانية .

10- تضاف 50 مايكرولتر من المحلول الموقّف لكل حفرة, ثم تمزج المحتويات لمدة 15-20 ثانية.

11- تقرأ الامتصاصية لكل حفرة عند طول موجي 450 نانومتر بواسطة جهاز ELISA Reader.

ج- الحسابات calculation

يتم رسم منحنى المعايرة بين قيم التراكيز للمحاليل القياسية على المحور السيني وما يقابلها من قيم الكثافة الضوئية OD على المحور الصادي ثم يرسم افضل خط مستقيم يمر على اغلب النقاط لكي يستعمل في تحديد تركيز الهرمون المحفز للجريبات في عينات المصل بالاعتماد على قيم امتصاصيتها, أو تستخرج معادلة المستقيم باستخدام الكمبيوتر ثم تعتمد تلك المعادلة في استخراج تركيز الهرمون بعد ادخال قيمة الكثافة الضوئية للعينة, كما موضّح في الشكل (3-4).

شكل (3-4) المنحنى القياسي لتحديد تركيز الهرمون المحفز للجريبات FSH

3-2-8. تقدير مستويات عوامل الأكسدة ومضادات الأكسدة في المصل

3-2-8-1. تقدير مستوى المالون ثنائي ألدهايد Estimation of MDA level

- **المبدأ الأساسي Basic Principle**

تقدير مستوى بيروكسيد الدهون في المصل بشكل غير مباشر عن طريق قياس كمية المالون ثنائي الالديهايد MDA الذي يمثل الناتج النهائي لأكسدة الدهون باستعمال الطريقة المحورة المتبعة من قبل Jo و Ahn (1998) والتي تعتمد على التفاعل بين بيروكسيدات الدهون وبشكل رئيس MDA وبين حامض ثايوباربيوتريك Thiobarbituric acid (TBA) والذي يتم في وسط حامضي -PH=3.5 (4) ويكوّن ناتجاً ملوناً تقاس شدة الامتصاصية له بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي 532 نانومتر. كما في التفاعل التالي:

$$TBA + MDA \xrightarrow[\Delta]{H^+} Chromogen + H_2O$$

- **الكواشف Reagents**

  - Sodium dodecyl sulfate (SDS)
  - 1,1,3,3-tetramethoxy-Propane
  - حامض الهيدروكلوريك HCL
  - حامض ثلاثي كلورو أسيتيك Trichloroacetic acid (TCA)
  - حامض ثايوباربيوتريك Thiobarbituric acid (TBA)

- محلول الكاشف العملي : يحضر بمزج 0.514 غرام من TBA و25 غرام من TCA و 0.5 مل من 1 مولاري حامض الهيدروكلوريك ممزوج بـ 190 مل من الماء المقطر, ثم يضاف للمزيج 1 غرام من SDS ويكمل الحجم إلى 200 مل.

- **طريقة العمل Procedures**

1- تم مزج 100 ميكرولتر من المصل و 2 مل من محلول الكاشف العملي في أنبوب الاختبار.

2- سخنت العينة في حمام مائي هزاز عند 90 مْ لمدة 15 دقيقة، ثم تركت لتبرد لمدة 10 دقائق.

3- أجريت عملية الطرد المركزي للعينة (2000 دورة /15دقيقة) وتم قياس الامتصاص الطيفي الضوئي للمادة الطافية بطول موجة 532 نانومتر مقابل كاشف فارغ. تم تحضير كاشف الكفئ (بلانك) بذات الإجراء أعلاه باستثناء تغيير العينة بالماء المقطر.

- **الحسابات Calculation**

لحساب تركيز ناتج أكسدة الدهون (المالون ثنائي الالديهايد) استعمل القانون التالي:

$$\text{Serum MDA } (\mu mol/l) = \frac{A \text{ test} - A \text{ blank}}{\varepsilon \times L} \times D.F$$

ε : Molar absorptivity coefficient =1.56 x 10^5 M^{-1} cm^{-1} معامل الامتصاص المولاري

L : Light path = 1cm مسار الضوء

D.F : Dilution factor معامل التخفيف

2-8-2-3. تقدير مستوى الكلوتاثيون في المصل Estimation GSH Level of serum

- **المبدأ الأساس Basic Principle**

يقوم مبدأ هذا الاختبار على اختزال مولد اللون 5,5 Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), بفعل مجموعة السلفهيدريل Sulfhydry في الكلوتاثيون إلى مركب أصفر كثيف (TNB) 5-(Thio-2-nitrobenzoic acid) تتناسب كثافته الامتصاصية مع تركيز الكلوتاثيون. تقاس الامتصاصية عند 412 نانومتر. (Burtis and Ashood, 1999) .

- **تحضير الكواشف Preparation of Reagents**

1- محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور Trichloroacetic acid (TCA) 50% : يحضر بإذابة 50 غم من حامض الخليك ثلاثي الكلور في الماء المقطر ويكمل الحجم إلى 100 مل.

2- محلول (0.4 M) Ethylenediaminetetracetic acid-disodium (EDTA Na_2) : يحضر بإذابة 148.9 غم من مركب EDTANa_2 في كمية من الماء المقطر ويكمل الحجم إلى لتر.

3- محلول Tris-EDTA buffer pH 8.9 (0.4 M) : يحضر بإذابة 48.458 غم مركب Tris في 800 مل ماء مقطر ثم يضاف له 100 مل محلول $(EDTANa_2)$(0.4M) ويكمل الحجم بالماء المقطر إلى لتر. ينظم الـ pH عند 8.9 بإضافة 1 مولاري حامض الهيدروكلوريك (1N HCL) ويبقى هذا المحلول ثابتاً لمدة 10 أيام.

4- كاشف إلمان DTNB Reagent (0.01M) : يحضر باذابة 0.099 غم من مركب -5,5′ Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) في 25 مل ميثانول مطلق كحجم نهائي, يبقى هذا الكاشف ثابتا لمدة 13 أسبوع على الاقل عند درجة حرارة 4 مئوية.

5- محلول الكلوتاثيون القياسي المركز GSH standard stock : يحضر محلول الكلوتاثيون القياسي GSH (0.001 M) بإذابة 0.0307 غم كلوتاثيون في 100 مل محلول Tris-EDTA buffer pH 8.9 (0.4 M) كحجم نهائي, ومن هذا المحلول تُحضر التخفيفات القياسية الأخرى (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 مايكرومول) بإضافة كمية المحلول المنظم إلى كمية من المحلول القياسي المركز وفقا للمعادلة الاتية :

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

إذ أن :

N= تركيز المحلول

V= حجم المحلول

يجب تحويل وحدات المحلول القياسي المركز إلى مايكرومول بضربها في (10^6) كما يجب أن تحضر تلك المحاليل القياسية في نفس اليوم.

- **طريقة العمل Procedure**

1- توضع العينات والمحاليل القياسية في انابيب كما موضح أدناه :

الكواشف Reagents	**انبوب النموذج Sample**	**انبوب الكفء Blank**	**المحلول القياسي Standard**
Serum المصل	100 مايكرولتر	-----	-----
المحلول القياسي Standard	-----	-----	100 مايكرولتر
DW ماء مقطر	800 مايكرولتر	900 مايكرولتر	800 مايكرولتر
TCA	100 مايكرولتر	100 مايكرولتر	100 مايكرولتر

تمزج الانابيب لمدة 15 دقيقة وبشكل متقطع ثم توضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة بسرعة 3000 دورة.			
400	400	400	**الجزء الطافي Supernatant**
800	800	800	**Tris-EDTA buffer**
20	20	20	**DTNB Reagent**

2- تمزج محتويات الانابيب ثم يُصَفَّر جهاز المطياف بوساطة محلول انبوب الكفء عند طول موجي 412 نانوميتر، بعدها تُقرأ امتصاصية عينات المحلول القياسي وعينات المصل خلال 5 دقائق من إضافة كاشف الـ DTNB .

- **الحسابات Calculation**

يتم رسم منحنى المعايرة الخطي بين قيم تركيز الكلوتاثيون في المحاليل القياسية (على المحور السيني) وما يقابلها من قيم الكثافة الضوئية OD (على المحور الصادي) لتحديد تركيز الكلوتاثيون المختزل في عينات المصل بالاعتماد على قيم امتصاصيتها كما في الشكل (3-5).

شكل (3-5) المنحنى القياسي لتقدير تركيز الجلوتاثيون المختزل GSH

3-2-8-3. تقدير فعالية أنزيم الكاتليز Estimation of CAT Activity

تم اعتماد طريقة القياس اللوني للباحثين Hadwan و Kadhum (2018) لتقييم نشاط الكاتليز.

- **المبدأ الأساس Basic Principle**

يقوم مبدأ الطريقة على تفاعل ميتافناديت الأمونيوم ammonium metavanadate مع بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 تحت الظروف الحمضية ، ويعتمد على اختزال Vanadium (V) إلى Vanadium III بواسطة H_2O_2. على الرغم من اعتبار H_2O_2 مؤكسداً قوياً إلا أنه يمكن أن يكون بمثابة عامل اختزال في ظل ظروف معينة من الأكسدة والاختزال. وفقًا لذلك ، يؤدي اختزال Vanadium إلى تشكيل مركب أحمر برتقالي (peroxovanadium) تكون أقصى شدة امتصاص له عند 452 نانومتر. يظهر التفاعل بين Vanadium و H_2O_2 في المعادلة التالية :

$$H_2O_2 + NH_4VO_3 + H_2SO_4 \rightarrow NH_4[VO(O_2)SO_4] + {}_2H_2O$$

تم تحديد نشاط إنزيم الكاتليز عن طريق تحديد امتصاصية معقد peroxovanadium الأحمر البرتقالي عند 452 نانومتر.

- **تحضير الكواشف Preparation of Reagents**

1- تم تحضير محلول حامض الكبريتيك (0.5 M) بالتخفيف المناسب لحامض الكبريتيك المركز في 200 مل من الماء المقطر.

2- تم تحضير محلول الأمونيوم ميتافناديت (0.01 M) بإذابة 0.2925 غرام من الأمونيوم ميتافناديت في 200 مل من محلول حامض الكبريتيك المحضر في الخطوة 1.

3- تم تحضير محلول الفوسفيت المنظم Phosphate buffer بتركيز (50 Mm; pH 7.0) عن طريق مزج المحلول التاليين A و B بنسبة 1-1.5

أ- محلول (A) يحضر بإذابة (6.81 غرام) من KH_2PO_4 في لتر ماء مقطر.

ب- محلول (B) يحضر بإذابة (8.90 غرام) من $Na_2HPO_4.2H_2O$ في لتر ماء مقطر.

4- تم تحضير محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (10 mM) آنياً بمزج 0.1134 مل من 30% H_2O_2 مع 100 مل من الفوسفيت المنظم وتمت معايرة المحلول إلى 10 mM باستعمال معامل الامتصاصية المولية لبيروكسيد الهيدروجين عند 240 نانومتر.

5- تم تحضير محلول الكاتليز القياسي بإذابة 20 ملغم من مسحوق انزيم الكاتليز في 100 مل من محلول الفوسفيت المنظم (50 mM; pH 7.0).

- **طريقة العمل Procedure**

خفف المصل بنسبة 1-10بمحلول الفوسفيت المنظم وتمت طريقة العمل وفقاً للخطوات الآتية :

الكواشف	العينة	الانبوب القياسي	بلانك
مخفف المصل	1 مل	-------	------
محلول الفوسفيت المنظم		1 مل	3 مل
بيروكسيد الهيدروجين	2 مل	2 مل	------
بعد الخلط ، تحضن أنابيب الاختبار لمدة دقيقتين عند 37 مْ ثم يضاف الكاشف التالي :			
كاشف الامونيوم ميتافناديت	2 مل	2 مل	2 مل
بعد الخلط، تحضن الانابيب لمدة عشر دقائق عند 25 مْ ، ثم تقرأ الامتصاصية عند طول موجي 452 نانومتر مقابل الكاشف الكفئ.			

- **الحسابات Calculation**

تم حساب نشاط إنزيم الكاتليز من المعادلة التالية:

$$Catalase\ Activity\ of\ test\ kU = \frac{2.303}{t} * \log \frac{S^{o}}{S}$$

إذ أن:

K : معدل سرعة التفاعل

S^{o} : امتصاصية الانبوب القياسي

S : امتصاصية أنبوب العينة :

T : الوقت

3-2-9. الجانب النسجي

3-2-9-1. تحضير المقاطع النسجية: Preparation of histological section

تم تحضير المقاطع النسجية للخصى والبرابخ لمعرفة التغيرات التركيبية والوظيفية التي طرأت عليها خلال مدة التجربة طبقاً للطريقة الموصوفة من قبل Presnell و Schreibman (1997).

غمرت الاعضاء بمثبت بوين لمدة 24 ساعة نقلت بعدها إلى الكحول الاثيلي (70%) إذ تم غسلها عدة مرات للتخلص من لون المثبت ثم أُجريت عليها سلسلة من العمليات وكما يلي:

1- **الإنكاز Dehydration**

تم سحب الماء من النسيج وذلك بتمرير النماذج في سلسلة تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (70%، 80%، 90%، 95%، 100%) ولمدة ساعتين في كل تركيز. وبعد ذلك روقت النماذج بوضعها في الزايلين Xylene لمدة ساعتين.

2- الترويق Cleaning

رُوقت العينات بمحلول الزايلين Xylene مرتين ولمدة 30 دقيقة لإزالة محلول الإنكاز وجعل العينات اكثر شفافية.

3- **التشريب Infiltration**

بعد عملية الترويق نقلت النماذج إلى قناني حاوية على خليط من شمع البرافين Paraffin wax المنصهر(57-60 درجة مئوية) والزايلين بنسبة 1-1 لمدة نصف ساعة داخل فرن كهربائي درجة حرارته 60 درجة مئوية وذلك لإبقاء الشمع منصهراً وضمان تحقق التشريب الكامل للنماذج بالشمع ثم نقلت بعد ذلك إلى قناني اخرى حاوية على شمع البرافين داخل الفرن أيضاً لمدة ساعة واحدة نقلت بعدها مرة اخرى إلى قناني جديدة حاوية على شمع البرافين لمدة ساعة واحدة أيضاً.

3- الطمر Embedding

تم عمل قوالب من الشمع حاوية على العينات وذلك بصب الشمع في قوالب بلاستيكية خاصة طمرت فيها النماذج وتركت في درجة حرارة المختبر لتتصلب ثم فصلت عن القالب وحفظت حتى وقت تقطيعها.

4- التقطيع Sectioning

باستخدام جهاز المشراح اليدوي Rotary microtome قطعت النماذج بسمك 5 مايكرومتر ثم ثبتت اشرطة المقاطع على شرائح زجاجية Slides نظيفة باستعمال لاصق آح ماير Mayers albumin adhesive (ملحق3-5) بعد أن وضعت تلك الاشرطة في حمام مائي حرارته 45-50 درجة مئوية لمدة 1-2 دقيقة لضمان فرشها, بعدها تركت الشرائح على صفيحة ساخنة Hot Plate بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لكي تجف.

5- **التلوين والتحميل Staining and mounting**

لوّنت جميع المقاطع النسجية باستخدام ملوّني الهيماتوكسلين-هارس (ملحق 3-3) والأيوسين الكحولي Harris's haematoxylin and alcoholic eosin (ملحق 3-4) إذ وضعت الشرائح في الزايلين لمدة 5 دقائق للتخلص من الشمع ثم مررت بسلسلة تراكيز تنازلية من الكحول الاثيلي (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%) لمدة دقيقتين في كل تركيز بعدها لوّنت بملوّن الهيماتوكسلين لمدة دقيقة واحدة ثم غسلت بالماء المقطر لمدة دقيقتين, بعد ذلك غطست بالكحول الحامضي مرتين لإزالة الملون الزائد ثم لوّنت بملوّن الايوسين لمدة 15 ثانية, نقلت بعدها إلى سلسلة تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%، 100%) لمدة دقيقتين في كل تركيز عدا التركيز الأخير فقد وضعت فيه مدة خمس دقائق ثم روقت بالزايلين بمرحلتين (10 دقائق لكل مرحلة) بعدها أجريت عملية التحميل باستخدام بلسم كندا

Canada Balsam لتثبيت غطاء الشريحة ثم تركت على صفيحة ساخنة لمدة 8 ساعات لكي تجف وتكون جاهزة للفحص.

3-2-9-2. الفحص والتصوير المجهري

تم فحص جميع الشرائح المحضّرة للأعضاء المدروسة (الخصى والبرابخ) تحت المجهر لتحديد التغيرات المرضية - النسجية فيها باستخدام مجهر مركب نوع Olympus مزود بكاميرا عالية الدقة من نوع Sonyo وبعد الفحص تم التقاط عدد من الصور الفوتوغرافية لبعض المقاطع النسجية وعلى قوى تكبير مختلفة (10x و 40x) .

3-2-9-3. حساب معدل أعداد الخلايا المولدة للنطف (سليفات النطف, الخلايا النطفية, أرومات النطف) وخلايا سرتولي في النبيبات الناقلة للمني.

تم حساب أعداد الخلايا المكونة للنطف (الخلايا الأمية للنطف ,الخلايا النطفية وأرومات النطف) وخلايا سرتولي الموجودة داخل النبيب المنوي وبواقع عشرة نبيبات منوية لكل حيوان بوساطة العدسة الشيئية بقوة x 40 وتم استخراج المعدل العام لها. المعدل لها (Alwachi *et al.*,1986) .

3-2-9-4. القياسات النسجية Histological Measurements

3-2-9-4-1. قياس أقطار النبيبات الناقلة للمني وسمك الطبقة الجرثومية

تم قياس أقطار النبيبات الناقلة للمني باستعمال المقياس الدقيق العيني Ocular micrometer بعد معايرته بالمقياس الدقيق المنضدي Stage micrometer وبقوة x 40 إذ تم حساب معدل أقطار عشرة نبيبات منوية في كل مقطع (أختيرت النبيبات دائرية الشكل) ومنها حُسب المعدل العام لقراءات جميع المقاطع الخاصة بكل مجموعة. أيضاً, تم قياس سمك الطبقة الجرثومية للنبيبات المنوية عن طريق قياس السمك من الغشاء القاعدي إلى التجويف الأنبوبي وبواقع خمس قراءات لكل حيوان ثم استخرج المعدل العام لها (Ross *et al.*, 2003).

3-2-9-4-2. قياس أقطار نبيبات ذيل البربخ وسمك الطبقة الظهارية

تم قياس أقطار نبيبات ذيل البربخ للحيوانات باستعمال المقياس العيني الدقيق وبقوة x 40 إذ قيست أقطار النبيبات الدائرية أو القريبة من الدائرية وبمعدل عشرة قراءات لكل حيوان ثم استخرج المعدل العام لها كما تم قياس سمك الطبقة الظهارية المبطنة لتلك النبيبات من الغشاء القاعدي إلى التجويف وبمعدل عشر قراءات أيضاً ثم استخرج المعدل العام لها. (Ross *et al.*, 2003).

10-2-3. تقدير ضرر الحامض النووي للنطف Estimation of DNA damage

تم تقدير ضرر الحامض النووي DNA للنطف عن طريق اختبار المذنب Comet assay (الترحيل الكهربائي الهلامي لخلية واحدة) باستعمال العدة oxiselect comet assay kit الخاصة بهذا الاختبار كما استعمل برنامج Softwear لإجراء قياسات مختلفة لكل عينة وكما مبين في الخطوات التالية. (Olive & Banáth, 2006 ; Martínez-Luna *et al.*, 2015)

1- تم تحضير عدة شرائح زجاجية مطلية بالأكاروز الطبيعي عن طريق غمسها في 1% أكاروز منصهر وبعد اخراجها تم مسح احد الجوانب ثم تركت لكي تتصلب عند درجة حرارة 4 مئوية لمدة خمس دقائق.

2- مزجت كمية حاوية على 5000-10000 نطفة من المحلول المستعمل مسبقاً لعد النطف في ذيل البربخ مع 1.2 مل من 1% أكاروز واطئ الانصهار (درجة الانصهار 40 درجة مئوية) لتكوين معلق من النطف والأكاروز دون ان تتسبب درجة الحرارة بإتلاف النطف.

3- تم نشر معلق النطف على الشرائح المطلية بالأكاروز الطبيعي (المحضرة مسبقاً) لتشكيل الطبقة الثانية ثم وضع غطاء الشريحة ووضعت الشرائح على صفيحة معدنية داخل الثلاجة لمدة 5 دقائق من أجل تصلب ألاكاروز .

4- بعد ذلك, رفعت الأغطية ووضعت الشرائح في مرطبانات حاوية على محلول التحلل lysis buffer, (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na2.EDTA, 10 % DMSO, 1 % N-lauroyl sarcosine, 1% Triton X-100, pH 10.0) , لمدة ساعة واحدة لغرض تحلل الغشاء البلازمي وغلاف النواة .

5- استخرجت الشرائح من المحلول السابق ووضعت في محلول مكون من نفس مكونات المحلول السابق مضافاً له 60 مايكرولتر من محلول آخر (proteinase K (1 mg/mL) and 2-Mercaptoethanol (5 mM) ثم حفظت في الحاضنة لمدة (18-20 ساعة) عند درجة 37 درجة مئوية لغرض تحلل بروتين البروتامين في الحامض النووي للنطف.

6- رفعت الشرائح بهدوء وتم غمرها بمحلول A2 solution المكون من 0.03 M NaOH (0.6 gram): 2 mM Na2EDTA (pH ~12.3) (0.336 gram) , لمدة 20 دقيقة وكررت العملية ثلاث مرات لضمان إزالة الاملاح وبقية المنظفات من المواد الهلامية .

7- علمت الشرائح ووضعت بهدوء في خزان جهاز الترحيل الكهربائي الحاوي على 500 مل محلول الترحيل A2 solution بحيث يعلو المحلول سطح الأكاروز بمقدار 1-2 ملم, ثم تركت لمدة 20 دقيقة للسماح للحامض النووي بالاسترخاء وفك الالتفاف.

8- تم إجراء عملية الترحيل في درجة حرارة الغرفة لمدة 25 دقيقة عند voltage 0.6 V/cm.

9- استخرجت الشرائح من جهاز الترحيل وتم غسلها ومعادلتها عن طريق غمرها بـ 400 مل من الماء المقطر .

10- وضعت الشرائح في محلول التصبيغ (2.5 مايكروغرام من الصبغة الحمراء SAF RED في الماء المقطر) لمدة 20 دقيقة ثم غمرت بالماء المقطر لازالة الصبغة الزائدة .

11- فحصت الشرائح بواسطة مجهر دقيق مجهز بكاميرا رقمية (BX 61 Imager fluorescenc microscope e من شركة Olympus Co., Tokyo, Japan وتم اختيار 100 صورة لكل عينة ليتم تحليلها وتدوين نتائجها المتعلقة بنسبة الحامض النووي في الذنب (tail DNA %) باستخدام برنامج comet score 2.0 software (Rex Hoover, USA)

3-2-11. التحليل الاحصائي The statistical analysis

تم تحليل جميع نتائج الدراسة إحصائيا لمعرفة الاختلافات المعنوية بين المعدلات وقد استعمل لهذا الغرض برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية Statistical pakage for the Social Sciences (SPSS) الإصدار 26 , وطبقاً لبيانات الدراسة تم حساب المتوسط الحسابي والخطأ القياسي لكل مؤشر واستعمل اختبار تحليل التباين الأحادي One way analysis of variance (ANOVA) مع حساب قيمة أقل فرق معنوي Least Significant difference (LSD) لمعرفة الاختلافات المعنوية بين المتوسطات والتي تم تحديدها عند مستوى احتمالية ($p<0.05$) .

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4. الكشوفات النوعية والكمية والتشخيصية عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر A.officinarum

1-1-4. الكشوفات التمهيدية الإستدلالية عن المركبات الفعّالة.

أظهرت نتائج التحليل النوعي للمستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر عن طريق الكشوفات الاستدلالية (جدول 4-1) احتواءه على القلويدات, الستيرويدات, التربينات, الفينولات, الفلافونويدات, الصابونينات والتانينات في حين جاءت النتيجة سالبة عند الكشف عن الكلايكوسيدات.

جدول(4-1) الكشوفات التمهيدية الإستدلالية عن المركبات الفعّالة في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر : *A. officinarum*

Tests الاختبارات	reagents الكواشف	Result النتيجة
الكشف عن القلويدات	Mayer's reagent كاشف ماير	+
الكشف عن الستيرويدات	Liebermans test اختبار ليبرمان	+
الكشف عن التربينويدات	Salkowski test اختبار سالكوسكي	+
الكشف عن الفينولات	كاشف الفينولات العام	+
الكشف عن الفلافونويدات	Lead acetate %10 كاشف خلات الرصاص	+
الكشف عن الصابونينات	Foam test اختبار الرغوة	+
الكشف عن التانينات	FeCl3 كاشف1% كلوريد الحديديك	+
الكشف عن الكلايكوسيدات	Fehling's reagent كاشف فهلنك	–

العلامة + تعني وجود المادة الفعالة في المستخلص.

لوحظ من الجدول أعلاه احتواء المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأضغر على مجموعة متنوعة من المركبات الفعالة وقد اتفقت تلك النتائج مع ما تم التوصل إليه في دراسات سابقة . (Srividya *et al.*, 2010 ; Rajesh *et al.*, 2013)

2-1-4. التقدير الكمي للمحتوى الكلي من الفينولات والفلافونويدات.

بين الجدول 4-2 مقدار المحتوى الكلي للمستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر من المركبات الفينولية والفلافونويدية, إذ كانت القيم 46.7 ملغم/غم و 38.6 ملغم/غم على التوالي.

جدول(4-2) المحتوى الكلي للفينولات والفلافونويدات في المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر *A. officinarum*

المادة	المحتوى الكلي للفينولات (ملغم / غم)	المحتوى الكلي للفلافونويدات (ملغم / غم)
المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر	46.7	38.6

لوحظ في النتائج المبينة أعلاه احتواء المستخلص الكحولي لنبات الخولنجان الأصغر على كمية جيدة من المركبات الفينولية (46.7 ملغم/غم) والفلافونويدية (38.6 ملغم/غم) وقد اقتربت تلك النتائج نسبياً مع نتائج الباحث Devi وجماعته (2018) والذي وجد أن المحتوى الكلي لهذه المركبات يساوي 43.6 ملغم/غم و 33.66 ملغم/غم.

4-1-3. تشخيص وفصل المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لنبات الخولنجان الأصغر *A. Officinarum* بواسطة جهاز GC-MS.

أظهرت نتائج تحليل عينة المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر باستخدام جهاز (GC-MS) احتواءه على عدد كبير من المركبات التي تباينت في مساحتها وأوزانها الجزيئية والجدول (4-3) يتضمن المركبات الأكثر شيوعاً والتي تم ترتيبها اعتماداً على زمن احتجازها.

جدول(4-3) المركبات التي تم فصلها من المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر بتقنية GC-MS.

No	Name of compound	Area %	Ret. Time min.
1.	kaempferol-4-methylether	3186084	2.222
2.	Rhamnocitrin	11274397	15.979
3.	1,7-diphenylhept-4-en-3-one	32157939	17.902
4.	(E)-p-coumaryl alcohol Y-o-metheyl ether	65362089	18.14
5.	Promethazine	38761520	30.064
6.	Limonene	82761608	32.347
7.	7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-phenylhept-4-en-3-one	5.44E+08	33.197

لوحظ في الجدول أعلاه احتواء المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان على سبعة من المركبات الفعالة التي تباينت في نسبها وزمن احتجازها. تنتمي المركبات المفصولة إلى مجاميع مختلفة أذ ينتمي الـ kaempferol-4-methylether و Rhamnocitrin إلى مجموعة الفلافونولات التي تمثل صنفاً مهماً من اصناف المركبات الفلافونويدية, في حين ينتمي المركبان

7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1- و 1,7-diphenylhept-4-en-3-one phenylhept-4-en-3-one إلى مجموعة مركبات الـ Diarylheptanoid , وينتمي مركب-(E) p-coumaryl alcohol Y-o-metheyl ether إلى مركبات الفنيل بروبانويد وهي فصيلة واسعة من المركبات العضوية التي تصنع في النبات من الحامض الاميني فينيل ألانين في حين يصنف الـ Limonene ضمن التربينات الأحادية الحلقية وهو سائل هايدروكاربوني سائل وشفاف, أما الـ Promethazine فيعد مسكناً قوياً للآلام وذات خصائص مضادة للهستامين والتقيؤ .

2-4. (التجربة الأولى) :تحديد التركيز الأكثر فعالية لمستخلص رايزومات نبات الخولنجان الأصغر.

أظهرت نتائج التجربة الأولى التي صممت لتحديد التركيز الأكثر فعالية من بين ثلاث تراكيز آمنة (100، 200، 400 ملغم/كغم) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى نشاط أنزيم الـ SOD في مجموعتي الوقاية الأولى والثانية مقارنة بمجموعة السيطرة في حين لم تظهر النتائج اختلافاً معنوياً ($p>0.05$) في مستوى نشاط الانزيم بين مجموعة الوقاية الثالثة ومجموعة السيطرة. تشير النتائج أيضاً إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مستوى نشاط الانزيم بين مجموعة الوقاية الثالثة ومجموعتي الوقاية الأولى والثانية. (جدول 4-4).

جدول 4-4 : تأثير ثلاثة تراكيز من المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر على مستوى نشاط أنزيم SOD في مصل الدم لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بالبيسفينول أ (50 ملغم / كغم) لمدة 30 يوماً.

مجاميع التجربة	مستوى نشاط أنزيم SOD U/ml
مجموعة السيطرة : (بدون معاملة)	89.33±2.30 **a**
مجموعة الوقاية الأولى : 100 ملغم/كغم مستخلص	54.33±2.55 **c**
مجموعة الوقاية الثانية : 200 ملغم/كغم مستخلص	75.67±2.11 **b**
مجموعة الوقاية الثالثة : 400 ملغم/كغم مستخلص	84.16±1.92 **a**

- **القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.**
- **الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية ($p<0.05$).**

يمثل أنزيم الـ SOD خط الدفاع الأول ضد الأكاسيد الفوقية ($O_2^{\cdot}$) عن طريق تحفيز تحويلها إلى بيروكسيد الهيدروجين والأوكسجين (Powers and Jakson, 2008) وإن اختزال نشاط هذا الانزيم يؤدي إلى تراكم تلك الأكاسيد ويقود إلى تثبيط نشاط أنزيم الكاتليز وبالتالي إضعاف قابلية الخلايا لإزالة بيروكسيد الهيدروجين (Amjad *et al.*, 2020) الذي يسبب ضرر تأكسدي شديد للدهون والبروتينات والحامض النووي DNA (Simiona *et al.*, 2018) .

أوضحت النتائج المبينة في الجدول أعلاه فعالية المستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر بالتركيز 400 ملغم/كغم ضد تأثير البسفينول أ في استنزاف أو تثبيط نشاط انزيم الـ SOD في مصل الدم مقارنة بالتركيزين 100,200 ملغم/كغم الذين أظهرا انخفاضاً معنوياً ($p<0.05$) في مستوى نشاط الانزيم. كانت تلك النتائج متوافقة مع نتائج الباحث Ashtari وجماعته (2022) في دراستة حول كفاءة المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر في مقاومة الأكسدة المستحثة بالـ Cisplatin والذي توصل الى أن المستخلص الكحولي بالتركيز 400 ملغم/كغم يمتلك خصائص مضادة للأكسدة أكثر فعالية من التركيز 200 ملغم/كغم.

4-3. التجربة الثانية : تقييم الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان (400 ملغم/كغم) ضد السمية التكاثرية المستحثة بالبيسفينول أ لدى ذكور الجرذان البيض.

ملاحظة : لم تظهر النتائج لجميع المعايير المدروسة وجود اختلافات معنوية ($p>0.05$) بين مجموعة السيطرة ومجموعة المعاملة بزيت الزيتون (T1) والتي اعتمدت كمجموعة سيطرة لمادة زيت الزيتون المستعملة لإذابة البيسفينول أ قبل تجريعه فموياً لحيوانات التجربة ... لذا وبناءً على ما تقدم سيكون التعامل مع كلتا المجموعتين كمجموعة سيطرة واحدة عند مناقشة النتائج.

4-3-1. التغيرات الوزنية Weight changes

4-3-1-1. التغيّر في وزن الجسم Change of body weight

أظهرت النتائج الموضّحة في الجدول (4-5) عدم وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في المتوسطات الحسابية لمقدار الكسب الوزني (الفرق بين وزن الجسم عند نهاية وبداية التجربة) بين مجموعة السيطرة (C) والمجموعتين T3, T4 , في حين أظهرت تلك النتائج وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مقدار الكسب الوزني لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) مقارنة مع مجاميع التجربة الأخرى (C, T3, T4).

4-3-1-2. التغيّر في وزن الخصية والبربخ Change of testis and epididymis weight

أشارت النتائج الموضّحة في الجدول (4-5) إلى وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في المتوسطات الحسابية لأوزان الخصى والبرابخ في حيوانات المجموعة (T3) مقارنة بمجموعة السيطرة ووجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في متوسطات أوزان تلك الأعضاء في مجموعة الوقاية (T4) مقارنة بالمجموعة (T3) كما أشارت النتائج إلى وجود ارتفاع معنوي في معدلات الأوزان ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) مقارنة مع حيوانات المجاميع الأخرى (C, T3, T4).

جدول(5-4) تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر *A. officinarum* (400 ملغم/كغم) في وزن الجسم وأوزان الخصى والبرابخ لدى ذكور الجرذان المعاملة بالبيسفينول أ لمدة 60 يوماً.

المجموعات	الكسب الوزني للجسم (غم)	معدل وزن الخصية (ملغم)	معدل وزن البربخ (ملغم)
C: سيطرة سالبة	74.83±2.04 b	1462.17±4.98 b	470.66±3.05 b
T1 : سيطرة (زيت الزيتون)	75.66±1.76 b	1469.33±2.16 b	471.83±2.90 b
T2 : مستخلص (400 ملغم/كغم)	82.17±1.40 a	1519.67±7.90 a	486.17±4.28 a
T3 : BPA (50 ملغم/كغم)	72.33±1.54 b	1191.83±23.70 c	372.33±8.87 c
T4 : مستخلص ثم BPA	76.17±1.92 b	1440.67±6.63 b	468.33±3.09 b
L.S.D (p<0.05)	4.77	34.40	14.53

- القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.
- الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية (p<0.05).

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (5-4) عدم وجود فروقات معنوية (p>0.05) في معدل الكسب الوزني للجسم عند نهاية التجربة بين مجموعة السيطرة والمجموعتين (T3, T4) وقد جاءت تلك النتائج متفقة مع دراسة Alboghhobeish وجماعته (2019) الذي أوضح ان معاملة الجرذان البالغة بالتركيز 50 ملغم/كغم من البيسفينول أ لم تحدث تأثيراً على وزن الجسم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة, كما جاءت متفقة مع عدد من الدراسات التي أكدت ان وزن الجسم في ذكور الجرذان لم يظهر تغيرات واضحة عند التعرض للبيسفينول أ بجرعات واطئة (Korkmaz *et al.*, 2010; Nanjappa *et al.*, 2012) .

ذكر Wu وجماعته (2013) إن البيسفينول أ يسبب اضطرابات في جهاز الغدد الصماء دون أن يؤثر على وزن الجسم فيما أشار Gurmeet وجماعته (2014) إلى أن تعرض الجرذان للبيسفينول أ ربما يسبب اختزالاً طفيفاً في وزن الجسم بسبب الاجهاد. من جهة أخرى, لوحظ من البيانات إن معدل

الكسب الوزني لدى حيوانات المجموعة T2 كان مرتفع معنوياً ($p<0.05$) مقارنة بمجموعة السيطرة والمجاميع الأخرى (T3, T4) وهذه النتائج توافقت مع ما توصل إليه الباحث Pirzadeh وجماعته (2021) في دراسته حول التأثير المحسن للخولنجان الأصغر على السمية التكاثرية المستحثة بالـ Nonylphenol.

لوحظ في النتائج المبينة في الجدول (4-5) إن التعرض للبيسفينول أ تسبب في انخفاض الأوزان المطلقة للخصى والبرابخ في المجموعة T3 مقارنة بمجموعة السيطرة وقد توافقت تلك النتائج مع ما توصلت إليه دراسات سابقة تعرضت الحيوانات فيها إلى جرعات مختلفة من البيسفينول أ (Alboghhobeish *et al.*, 2019; Munir *et al.*, 2017).

يعد نقص الأوزان في الاعضاء التكاثرية مؤشراً هاماً على السمية التكاثرية في ذكور الحيوانات وربما ينجم عن تثبيط عملية تكوين الحيوانات المنوية وتناقص أعداد أرومات النطف (Takahashi and Oishi 2003) وقد ذكر Alboghhobeish وجماعته (2019) إن سبب نقص الأوزان هو الاضطراب الغدي الذي يؤدي إلى نقص الهرمونات الجنسية أو تحطم بعض الجزيئات المهمة في النسيج الخصوي كالبروتينات, فيما ذكر Selmi وجماعته (2018) إن أوزان الخصى ترتبط بشكل كبير بكتلة الخلايا المولدة للنطف وإن الانخفاض في أوزانها ربما ينجم عن اختزال عدد الخلايا الجرثومية واختزال عمليتي تكوين النطف وبناء الستيرويدات كما إن انخفاض الوزن ربما يكون بسبب تناقص الفعالية البايلوجية لهرمون التستوستيرون والهرمونين المحفز للخلايا البينية والمحفز للجريب.

أشارت النتائج إلى أن أوزان الخصى والبرابخ لدى حيوانات مجموعة الوقاية T4 كانت مرتفعة معنوياً ($p<0.05$) مقارنة مع حيوانات المجموعة T3 وجاءت تلك النتائج متوافقة مع نتائج الباحث Heidari وجماعته (2021) وربما يعود السبب في ذلك إلى محتوى المستخلص من الفلافونويدات ذات القابلية الكاسحة للجذور الحرة (Kaushic *et al.*, 2011) وما ينتج عنها من اختزال لحالة الإجهاد التأكسدي وتحسين في معايير النطف (Öztaş *et al.*, 2019) وقد بيَّنت دراسات عديدة فاعلية الخولنجان الكبير في تحفيز عملية تكوين النطف (Qureshi *et al.*, 1992 ; Mazaheri *et al.*, 2014).

من جهة أخرى, أظهرت النتائج المتعلقة بالتغيرات الوزنية زيادةً في الأوزان المطلقة للخصى والبرابخ لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة مع مجموعات التجربة الأخرى (C, T3, T4) وربما يرجع ذلك إلى سببين يتعلق الأول بالزيادة في وزن الجسم وما يرتبط بها من زيادة في أوزان

الاعضاء التكاثرية في حين يتعلق الثاني بدور المستخلص في تحسين معايير النطف وزيادة مستوى هرمون التيستوستيرون عن طريق تأثيره المباشر على نسيج الخصية. (Negm and Rapheb, 2019)

4-3-2. التغيرات في معالم النطف Changes of sperm parameters

4-3-2-1. أعداد النطف في الخصية Sperms count of testis

لوحظ في النتائج المبينة في الجدول (4-6) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في معدلات أعداد النطف في الخصية لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (C) ووجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في معدلات الأعداد بين مجموعة الوقاية (T4) والمجموعة T3, كما يلاحظ أيضاً وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في الأعداد لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) مقارنة بمجموعات التجربة الأخرى (C, T3, T4).

4-3-2-2. أعداد النطف في ذيل البربخ Sperms count of epididymis cauda

أشارت البيانات في الجدول (4-6) إلى وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في أعداد النطف في ذيل البربخ لدى حيوات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة T3 . لم تشير البيانات إلى وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في الأعداد بين مجموعة السيطرة (C) ومجموعة الوقاية (T4) في حين أشارت إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) مقارنة مع المجموعات الأخرى (C, T3, T4) .

4-3-2-3. النسبة المئوية للنطف المتحركة Percentage of motile sperms

بيَّنت نتائج الدراسة في الجدول (4-6) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) بالمقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) بالمقارنة مع المجموعة T3. لم يلاحظ اختلاف معنوي ($p>0.05$) بين مجموعة السيطرة والمجموعتين T2, T4 في حين لوحظ ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في نسبة النطف المتحركة لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة بالمجموعة T4.

4-3-2-4. النسبة المئوية للنطف الحية Percentage of live sperms

أشارت النتائج الموضحة في الجدول (4-6) إلى وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف الحية في ذيل البربخ لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) عند مقارنتها

مع مجموعة السيطرة (C) ووجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T4 مقارنة مع حيوانات المجموعة T3. لم يظهر اختلاف معنوي ($p>0.05$) في نسبة النطف الحية بين مجموعة السيطرة ومجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) والتي أظهرت زيادة معنوية ($p<0.05$) بالمقارنة مع حيوانات المجموعة T4.

4-3-2-5. النسبة المئوية للنطف اللاسوية Percentage of abnormal sperms

بيَّنت البيانات في الجدول (4-6) وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف اللاسوية لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة بها في حيوانات مجموعة السيطرة ووجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة (T4) مقارنة بالمجموعة T3. لم تشير البيانات إلى وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في نسبة النطف اللاسوية بين مجموعة السيطرة والمجموعة T2 في حين أشارت إلى ارتفاعاً معنوياً ($p<0.05$) بين كلتا المجموعتين والمجموعة T4.

جدول(4-6) تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر *A. officinarum* (400 ملغم/كغم) في معايير النطف لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بالبيسفينول أ لمدة 60 يوماً.

المجموعات	أعداد النطف في الخصية ($10^6\times$)	أعداد النطف في البربخ ($10^6\times$)	نسبة النطف المتحركة %	نسبة النطف الحية %	نسبة النطف اللاسوية %
C: سيطرة سالبة	23.93±0.71 **b**	88.61±3.05 **b**	83.10±2.42 **ab**	87.13±1.82 **a**	9.85±0.73 **c**
T1 : سيطرة (زيت الزيتون)	24.53±0.58 **b**	87.60±4.25 **b**	81.36±1.87 **ab**	85.20±1.78 **a**	10.33±0.93 **c**
T2 : مستخلص (400 ملغم/كغم)	25.82±0.54 **a**	99.26±3.11 **a**	85.90±1.47 **a**	86.58±1.71 **a**	9.25±0.73 **c**
BPA : **T3** (50 ملغم/كغم)	15.98±0.44 **d**	62.05±2.51 **c**	68.23 ±2.03 **c**	53.71±1.81 **c**	24.61±1.54 **a**
T4 : مستخلص ثم BPA	21.12±0.54 **c**	84.65±2.24 **b**	78.40±1.53 **b**	74.52±1.48 **b**	13.17±1.37 **b**
L.S.D ($p<0.05$)	1.66	9.05	5.75	5.03	3.25

- **القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.**
- **الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية ($p<0.05$).**

تشير النتائج في الجدول أعلاه إلى وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في أعداد النطف في الخصية والبربخ وفي النسبة المئوية للنطف المتحركة والنطف الحية ووجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف اللاسوية لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وهذه النتائج كانت متفقة مع الكثير من الدراسات التي أظهرت اقتران الضعف في معالم النطف مع التعرض للبيسفينول أ إذ بيَّنت التجارب على القوارض ان تعريض اجسام تلك الحيوانات إلى البيسفينول أ بجرعات مختلفة (تتراوح بين 2 مايكروغرام/كغم/يوم إلى 960 ملغم/كغم/يوم) وفترات مختلفة (5 – 84 يوم) أدى إلى انخفاض كبير في أعداد النطف وحركتها وأعداد النطف السوية (Tainaka *et al.*, 2012 ; Tiwari and Vanaga, 2013) وضعف كبير في عملية تكوين النطف (Kazemi *et al.*, 2016 ; Grami *et al.*, 2020).

يرجع السبب وراء إضعاف عملية تكوين النطف إلى وجود مستقبلات الاستروجين والاندروجين في نسيج الخصية , والتي تؤدي دورا حاسماً في تلك العملية, ووجود مستقبلات موجهات المناسل , الاساسية في تصنيع الاندروجينات وتكوين النطف , (Pelletire *et al.*, 2000) والتي يعمل البيسفينول أ كخصمٍ تنافسيٍ (Sun *et al.*, 2006) أو غير تنافسياً لها (Lee *et al.*, 2003) كما يعمل على تقليل تعبيرها في نسيج الخصية (Qiu *et al.*, 2013).

ذكر Zhang وجماعته (2016) إن التعرض للبيسفينول يؤدي إلى تدهور تركيب انزيم الكاتليز في الخلايا الأمية للنطف ويستحث السمية فيها فيما ذكر Chen وجماعته (2016) إن البيسفينول يغير المورفولوجية النووية لأمهات النطف ويؤثر على دورة الخلية مما ينعكس على عملية تكوين النطف. أيضاً, بين Ullah وجماعته (2017) إن التعرض للبيسفينول مختبرياً أدى إلى زيادة نشاط الانزيمات المضادة للأكسدة في النطف وارتفاع مستوى أنواع الأوكسجين التفاعلية بعد ساعتين من التعرض مسبباً اختزالاً كبيرا في انتاج الخصية للنطف.

يمكن للبيسفينول أ أن يتداخل مع عملية تكوين النطف عن طريق اليات أخرى بشكل مستقل عن تأثيره على النظام الهرموني إذ أدى تعريض الجرذان إلى إضعاف استتباب الكلوكوز وزيادة الاجهاد التأكسدي في انسجة الخصية (D'Cruz *et al.*, 2012) فيما أدى تعريض الفئران المزمن إلى اختزال عملية انقسام الخلايا المولدة للنطف والخلايا النطفية مما قاد إلى اضعاف معايير النطف وخاصة انخفاض أعدادها وحركتها (Schneider *et al.*, 1979).

بيَّنت الدراسات المختبرية إن البيسفينول يستحث الموت المبرمج في خلايا سرتولي لدى القوارض (Qian *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015) عن طريق اضعاف وظائف المايتوكوندريا وتوليد

أنواع الأوكسجين الفعالة (Wang *et al.*, 2017b) كما لوحظ ضعف في تعبير بروتينات التمفصل الأساسية في خلايا سرتولي لدى الجرذان المعرضة للبيسفينول قرب فترة الولادة (Salian *et al.*, 2009) فيما لوحظ تعبير أقل انتظاماً في الجينات المسيطرة على وظائف خلايا سرتولي لدى الفئران المعرضة للبيسفينول أ قبل الولادة (Tainaka *et al.*, 2012).

أظهرت النتائج في الجدول أعلاه ارتفاعاً معنوياً ($p<0.05$) في أعداد النطف في الخصية والبربخ وفي النسبة المئوية لحركة وحيوية النطف كما أظهرت انخفاضاً معنوياً ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف اللاسوية لدى حيوانات المجموعة T4 بالمقارنة معها لدى حيوانات المجموعة T3 وقد اتفقت تلك النتائج مع ما توصل إليه الباحث Reid وجماعته (2016) والذي أشار إلى أن المركبات الفلافونيدية المعزولة من رايزومات الخولنجان الأصغر تؤدي دوراً كبيراً في الوقاية من الاجهاد التأكسدي بوساطة تحفيزها لعملية التعبير للبروتينات المضادة للأكسدة, كما أشار الباحث Kolangi وجماعته (2019) إلى أن الخولنجان الأصغر يمكن أن يكون فعالاً في تحسين معالم النطف دون أن يسبب اضراراً جانبية.

لوحظ في البيانات أيضاً إن أعداد النطف في الخصية والبربخ وكذلك النسبة المئوية للنطف المتحركة كانت مرتفعة معنوياً ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالمستخلص T2 بالمقارنة مع مجموعات التجربة الأخرى (C, T3, T4) وربما يعزى ذلك إلى الفعالية المضادة للأكسدة والكاسحة للجذور الحرة التي يتميز بها نبات الخولنجان الأصغر بسبب محتواه من المركبات الفغالة وبشكل رئيس مركب الكالانجين كما قد يعزى إلى دور المستخلص في تعزيز انتاج هرمون التيستوستيرون في خلايا لايدك(Li *et al.*, 2012) .

4-3-3. التغيرات في مستويات هرمونات التكاثر Changes of reproductive hormones

4-3-3-1. مستوى هرمون التستوستيرون Level of testosterhormones

أظهرت نتائج الدراسة الفسلجية المبينة في الجدول (4-7) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوي هرمون التستوستيرون في مصل الدم لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة بمستواه لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في مستواه لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة (T3) في حين لم تظهر النتائج اختلافاً معنوياً ($p>0.05$) في مستوى الهرمون بين مجموعتي السيطرة (C) والمجموعة (T4). أظهرت النتائج أيضاً وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مستوى الهرمون هذا لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) مقارنة مع مجاميع التجربة الأخرى (C, T1, T3, T4).

4-3-3-2. مستوى الهرمون المحفز للخلايا البينية Level of ICSH hormone

أظهرت نتائج الدراسة الفسلجية المبينة في الجدول (4-7) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى الهرمون المحفز للخلايا البينية لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة بمستواه لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في المستوى لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة (T3). لم تظهر النتائج وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في مستوى الهرمون لدى حيوانات المجموعة (T2) بالمقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة .

4-3-3-3. مستوى الهرمون المحفز للجريب Level of FSH hormone

أظهرت نتائج الدراسة الفسلجية المبينة في الجدول (4-7) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوي الهرمون المحفز للجريب في مصل الدم لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) مقارنة بمستواه لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في المستوى لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة (T3) فيما لم يلاحظ وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في مستوى الهرمون بين مجموعة السيطرة (C) ومجموعة الوقاية (T4). أظهرت النتائج أيضاً وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مستوى الهرمون لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) مقارنة مع مجاميع التجربة الأخرى (C, T1, T3, T4).

جدول(4-7) تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر *A. officinarum* (400 ملغم/كغم) في مستوى هرمون التستوستيرون, الهرمون المحفز للخلايا البينية والهرمون المحفز للجريب في مصل الدم لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بالبيسفينول أ لمدة 60 يوماً.

المجموعات	التستوستيرون T (ng/mL)	الهرمون المحفز للخلايا البينية ICSH (mIU/ml)	الهرمون المحفز للجريب FSH (mIU/ml)
C : سيطرة سالبة	4.61±0.15 **b**	2.52± 0.11 **a**	3.46±0.12 **b**
T1 : سيطرة (زيت الزيتون)	4.62±0.19 **b**	2.54± 0.08 **a**	3.51±0.09 **b**
T2 : مستخلص (400 ملغم/كغم)	5.19±0.15 **a**	2.52±0.05 **a**	3.91±0.10 **a**
T3 : BPA (50 ملغم/كغم)	2.30±0.21 **c**	1.56±0.08 **c**	2.32±0.08 **c**
T4 : مستخلص ثم BPA	4.23±0.10 **b**	2.26±0.09 **b**	3.28±0.11 **b**
L.S.D ($p<0.05$)	0.47	0.25	0.29

- **القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.**
- **الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية ($p<0.05$).**

يلاحظ من البيانات في الجدول أعلاه وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى هرمون التستوستيرون والهرمونين المحفز للخلايا البينية والمحفز للجريب في مصل الدم لدى حيوانات المجموعة T3 بالمقارنة مع مجموعات التجربة الأخرى وتأتي هذه النتائج متفقة مع العديد من الدراسات في هذا المجال (Ullah *et al.*, 2019 b ; Ullah *et al.*, 2021) .

أشارت الدراسات السابقة الى أن مادة BPA لها تأثيرات عند مستوى الغدد الصماء على الوظائف التناسلية للذكور مما يوضح المسارات المحتملة التي يمكن عن طريقها للبيسفينول أ أن يعيق التحكم في تكوين الحيوانات المنوية بشكل أساسي عبر محور تحت المهاد - الغدة النخامية - المناسل وقد تم توضيح التداخل على مستوى هذا المحور بشكل واضح في الجرذان ، إذ أدى إعطاء البيسفينول أ إلى انخفاض كبير في كل من التعبير الجيني للهرمون المحرر لموجهات المناسل الذي يفرز من خلايا تحت المهاد, ومستويات الهرمونين المحفز للخلايا البينية والمحفز للجريبات وهرمون التستوستيرون في الدم (Jin *et al.*, 2013 ; Wisniewski *et al.*, 2015)

نظراً للتركيب الكيميائي الفينولي متعدد الحلقات المميز للبيسفينول والذي يشبه الإستراديول فإنه مؤهل باعتباره استروجين ذات مصدر خارجي xenoestrogen لأنه يشابه تأثيرات الإستروجين (Akingbemi *et al.*, 2004) وقد بين Matthews وجماعته (2001) إن البيسفينول أ قادر على إزاحة 17-β estradiol الثلاثي من مستقبلات الإستروجين α و β على التوالي ومن المتوقع أن يتداخل مع آليات التغذية الراجعة لمحور تحت المهاد - النخامية – المناسل في الذكور مما يؤدي إلى انخفاض إفراز الغدد النخامية لموجهات المناسل (LH, FSH) وبالتالي انخفاض تحفيز عملية تكوين النطف في النبيبات المنوية وعملية بناء الستيرويدات في خلايا لايدك. وفي الواقع، قد يكون الانخفاض في مستويات هرمون التستوستيرون الذي لوحظ في الحيوانات المعرضة لـ BPA ناتج عن تأثيرات مركزية (تحت المهاد - النخامية) وتأثيرات محيطية (النسيج الخصوي) وقد نتج عن تعريض خلايا لايدك مختبريا للبيسفينول أ إلى اختزال التعبير للانزيمات اللازمة لبناء الستيرويدات (Akingbemi *et al.*, 2004 ; Nanjappa *et al.*, 2012)

توجد آليات محتملة أخرى تؤدي إلى نقص الأندروجين بسبب اضطراب الغدد الصماء الناجم عن تأثير BPA على تمايز ووظيفة النسيج الدهني إذ يحفز BPA كلاً من بناء الشحوم (Ohistein *et al.*, 2014) وتخزينها في الخلايا الشحمية (Masuno *et al.*, 2002) ومن المعلوم بشكل واضح أن الخلايا الشحمية تعبر عن نشاط الأروماتيز المسؤول عن تحويل التستوستيرون إلى الأستراديول (Schneider *et al.*, 1979) الذي يؤدي تأثير مثبط على إفراز الغدة النخامية للهرمون المحفز

للخلايا البينية (Giagulli *et al.*, 1994)،فضلاً عن ارتباط الكتلة الدهنية الزائدة بمستويات أعلى من هرمون اللبتين الذي قد يثبط بشكل مباشر تكوين الستيرويدات في خلايا لايدك (Caprio *et al.*, 1999) , ومن الجدير بالذكر أن BPA له بنية كيميائية محبة للدهون لذا فأن تأثيراته على الخلايا الدهنية تكون مضاعفة ومدامة عن طريق تواجده في كتلة الدهون (Darbre, 2017) .

أظهرت نتائج الدراسة المبينة في الجدول أعلاه وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مستوى الهرمونات الثلاثة في مصل الدم لدى حيوانات مجموعة الوقاية T4 مقارنة بحيوانات المجموعة T3 وقد اتفقت هذه النتائج مع دراسة الباحثان Negm و Ragheb (2019) التي كشفت عن دور مستخلص الخولنجان الأصغر في تعديل الانحدار الحاصل في مستويات هرمونات التكاثر في دم الجرذان المعاملة بخلات الرصاص كما اتفقت مع دراسة الباحث Heidari وجماعته (2021) عن فعالية المستخلص في الحد بشكل كبير من التغيرات التي طرأت على مستويات تلك الهرمونات تحت تاثير المعاملة بالستربتوزوتوسين وربما تعزى فعالية المستخلص في تحسين مستويات الهرمونات إلى دوره المحفز لخلايا لايدك لانتاج هرمون التيستوستيرون عن طريق فعله المباشر على نسيج الخصية فضلاً عن دوره في الحد من تأثير البيسفينول أ المسبب لاضطراب الهرمونات على مستوى محور تحت المهاد- النخامية- المناسل (Negm and Rapheb, 2019) .

4-3-4. تقدير مستويات المؤكسدات ومضادات الاكسدة

4-3-4-1. مستوى المالون ثنائي الالديهايد Level of (MDA)

أوضحت نتائج الدراسة الفسلجية المبينة في الجدول (4-8) وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مستوى MDA في مصل الدم لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة بمستواه لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى المركب لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة (T3). لم تظهر النتائج وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في مستوى MDA بين مجموعتي السيطرة (C) والمستخلص (T2) في حين أظهرت انخفاضاً معنوياً ($p<0.05$) لدى حيوانات كلتا المجموعتين مقارنة بالمجموعة T4.

4-3-4-2. مستوى الكلوتاثيون Level of glutathione

بيَّنت نتائج الدراسة الفسلجية المبينة في الجدول (4-8) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى الكلوتاثيون في مصل الدم لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) مقارنة بمستواه لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) وارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة الوقاية

(T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة T3. لم يلاحظ اختلاف معنوي ($p>0.05$) في مستوى المركب بين مجموعة السيطرة والمجموعتين T2, T4 في حين لوحظ ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة مع المجموعة T4.

2-4-3-4. مستوى نشاط الكاتليز Level of CAT activity

أظهرت نتائج الدراسة الفسلجية المبينة في الجدول (4-8) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى نشاط أنزيم الكاتليز في مصل الدم لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول ا (T3) بالنسبة إلى مستوى نشاطه لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) وارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) بالمقارنة مع حيوانات المجموعة T3, ولم تشير النتائج عن وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في مستوى نشاط الانزيم بين مجموعتي السيطرة (C) والمستخلص (T2) في حين كشفت عن ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T2 بالنسبة إلى المجموعة T4.

جدول(4-8) تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر *A. officinarum* (400 ملغم/كغم) في مستوى المالون ثنائي ألدهايد, مستوى الكلوتاثيون ومستوى نشاط أنزيم الكاتليز في مصل الدم لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بالبيسفينول أ لمدة 60 يوماً.

المجموعات	المالون ثنائي الالديهايد MDA (µmol/L)	الكلوتاثيون GSH (µmol/L)	الكاتليز CAT (kU/L)
C : سيطرة سالبة	2.41±0.05 **c**	72.66±2.20 **ab**	104.16±3.31 **a**
T1 : سيطرة (زيت الزيتون)	2.44±0.03 **c**	70.83±3.16 **ab**	102.33±3.45 **a**
T2 : مستخلص (400 ملغم/كغم)	2.31±0.03 **c**	75.66±1.91 **a**	110.50±2.68 **a**
T3 : BPA (50 ملغم/كغم)	5.13±0.09 **a**	39.16±1.90 **c**	64.66±3.27 **c**
T4 : مستخلص ثم BPA	3.01±0.08 **b**	65.50±2.65 **b**	91.83±3.24 **b**
L.S.D ($p<0.05$)	0.18	7.34	9.32

- **القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.**
- **الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية ($p<0.05$).**

تُنتج أنواع الأوكسجين التفاعلية تحت تأثير مجموعة متنوعة من الأحداث الداخلية والخارجية ومع ذلك تتم معادلتها بوساطة مضادات الاكسدة الانزيمية وغير الانزيمية وأن عدم التوازن بين إنتاج

ومعادلة تلك الأنواع يؤدي إلى تطور حالة الاجهاد التأكسدي الذي يؤدي بدوره إلى فقدان أو اختزال وظائف الانسجة والاعضاء. (Hajam *et al.*, 2022). إن وجود الاحماض الدهنية غير المشبعة في أغشية النطف يجعلها اكثر عرضة لأكسدة الدهون (Merker *et al.*, 1996) التي تؤدي إلى إنتاج مركب المالون ثنائي ألدهايد (Chauhan and Chauhan, 2006) إذ أن مهاجمة الجذور الحرة للأحماض الدهنية غير المشبعة تؤدي إلى إنتاج هذا المركب في سياق التفاعل (Najeeb *et al.*, 2012) لذا فأنه كثيرًا ما يستخدم كمؤشر حيوي لأكسدة الدهون الناتجة عن الإجهاد التأكسدي (Liu *et al.* 2008) .

أشارت النتائج المبينة في الجدول (4-8) إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في محتوى مصل الدم من مركب المالون ثنائي ألدهايد لدى حيوانات المجموعة T3 مقارنة بمجموعة السيطرة وجاءت تلك النتائج متوافقة مع عدد من الدراسات (Kamel *et al.*, 2018; Alboghhobeish *et al.*, 2019) التي كشفت عن تأثير التعرض البيسفينول أ بتراكيز مختلفة في اكسدة الدهون وزيادة مستوى هذا المركب في مصل الدم.

أظهرت النتائج أيضاً انخفاض محتوى المصل من مركب MDA لدى حيوانات مجموعة الوقاية T4 مقارنة بالمجموعة T3 وهذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه الباحثان Negm و Ragheb (2019) من أن الخولنجان الأصغر يحسن حالة الاجهاد التأكسدي عن طريق رفع مستوى ال SOD وخفض مستوى ال MDA في المصل مما يوفر الحماية ضد اكسدة الدهون وهذه الفعالية تعزى إلى وجود مركبات كاسحة لأنواع الأوكسجين التفاعلية كالفلافونويدات والفينولات المتعددة ومركبات الـ diarylheptanoids. يتضح من النتائج أيضاً إن مستوى ال MDA في المصل حقق ادنى مستوياته لدى حيوانات المجموعة T2 المعاملة بالمستخلص الكحولي فقط مقارنة بمجموعات التجربة الأخرى وهذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه الباحث Bebars وجماعته (2021).

يؤدي الكلوتاثيون دوراً مهماً في العديد من الوظائف الخلوية بضمنها تحطيم بيروكسيد الهيدروجين ومنع أكسدة الدهون والاحماض الامينية في الغشاء البلازمي (Kaneko *et al.*, 2002) فيما يعد الكاتليز من مضادات الاكسدة الانزيمية الواقية للنظام الحيوي من أضرار الجذور الحرة (Qu *et al.*, 2008) وإن اختزال فعالية هذا الانزيم تؤدي إلى ارتفاع مستويات بيروكسيد الهيدروجين التي تسبب أضرار للدهون والبروتينات والحامض النووي DNA (Kono and Fridovich, 1982).

يظهر من النتائج أيضاً وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى الكلوتاثيون ونشاط الكاتليز في المصل لدى حيوانات المجموعة T3 مقارنة بهما لدى حيوانات مجموعة السيطرة C وهذا يتوافق

مع ما توصل إليه الباحث Kamel وجماعته (2018) من أن تجريع الجرذان فموياً بالبيسفينول أ بتراكيز واطئة وعالية تسبب في اختزال مستوى GSH, وما توصل إليه الباحث Alboghhobeish وجماعته (2019) من أن المعاملة البيسفينول أ (50 ملغم/كغم) تسببت في اختزال نشاط إنزيم الكاتليز ويعزى ذلك إلى استنزاف تلك المركبات خلال عملية اكتساح الجذور الحرة الناتجة عن التعرض للبيسفينول أ، ولوحظ من النتائج أيضاً ارتفاع مستوى الكلوتاثيون ونشاط الكاتليز لدى حيوانات المجموعة T4 مقارنة بالمجموعة T3 وكذلك لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة بالمجموعتين T3, T4. إن الارتفاع في مستويات مضادات الأكسدة لدى حيوانات المجموعات المعاملة بالمستخلص ربما يكون بسبب تأثيره ضد الزيادة في إنتاج ROS عن طريق تنشيط وحماية الإنزيمات المضادة للأكسدة في الخلايا (Oršolić *et al.*, 2011) أو عن طريق التفاعل بشكل مباشر أو غير مباشر مع ROS بوساطة نقل ذرات الهيدروجين فيكون له القدرة على منع توليد ROS في دورة الأكسدة والاختزال وبذلك يسهم بكسح الجذور الحرة وتجنب استنفاد مضادات الأكسدة (Leopoldini *et al.*, 2011).

4-3-5. الجانب النسجي

4-3-5-1. معدل أعداد الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي

4-3-5-1-1. معدل أعداد سليفات النطف Average numbers of spermatogonia

أظهرت نتائج الدراسة النسجية المبينة في الجدول (4-9) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في أعداد سليفات النطف لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) مقارنة بها لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) وارتفاع معنوي ($p<0.05$) في الأعداد لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة بها لدى حيوانات المجموعة T3. لم يلاحظ اختلاف معنوي ($p>0.0$) في الأعداد بين مجموعة السيطرة ومجموعة الوقاية (T4) في حين أشارت الدراسة الى وجود زيادة معنوية ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة مع مجموعات التجربة الأخرى (C, T3, T4).

4-3-5-1-2. معدل أعداد الخلايا النطفية Average numbers of spermatocytes

أظهرت نتائج الدراسة النسجية المبينة في الجدول (4-9) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في أعداد الخلايا النطفية لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة مع أعدادها لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في الأعداد لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة T3. لم تبين النتائج وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في الأعداد بين مجموعة السيطرة ومجموعة الوقاية (T4) في حين لوحظت زيادة معنوية ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة مع مجموعات التجربة الأخرى (C, T3, T4).

4-3-1-5-3-4. معدل أعداد أرومات النطف Average numbers of spermatides

أظهرت نتائج الدراسة النسجية المبينة في الجدول (4-9) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في أعداد أرومات النطف لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة مع أعدادها لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في الأعداد لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة T3, كما أظهرت النتائج أيضاً وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في الأعداد لدى حيوانات المجموعة T4 مقارنة بمجموعة السيطرة وزيادة معنوية ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة بمجموعات التجربة الأخرى (C, T3, T4).

4-3-1-5-3-4. معدل أعداد خلايا سرتولي Average numbers of sertoly cells

أظهرت نتائج الدراسة النسجية المبينة في الجدول (4-9) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في أعداد خلايا سرتولي لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) مقارنة مع أعداد تلك الخلايا لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في الأعداد لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة مع حيوانات المجموعة T3, كما أشارت النتائج إلى وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في الأعداد لدى حيوانات المجموعة T4 مقارنة بمجموعة السيطرة وزيادة معنوية ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T2 مقارنة بمجموعات التجربة الأخرى (C,T3, T4).

جدول(4-9) تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر *A. officinarum* (400 ملغم/كغم) في أعداد سليفات النطف, الخلايا النطفية, أرومات النطف وخلايا سرتولي لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بالبيسفينول أ لمدة 60 يوماً.

المجموعات	سليفات النطف	الخلايا النطفية	أرومات النطف	خلايا سرتولي
C : سيطرة سالبة	73.16±1.97 **b**	81.83±1.66 **b**	102.83±3.57 **b**	24.33±0.80 **b**
T1 : سيطرة (زيت الزيتون)	70.50±2.66 b	80.66±1.73 **b**	101.66±4.96 **b**	23.16±1.42 **b**
T2 : مستخلص (400 ملغم/كغم)	80.16±2.68 **a**	90.33±2.76 **a**	112.33±2.38 **a**	27.83±0.48 **a**
T3 : BPA (50 ملغم/كغم)	57.50±1.88 **c**	62.33±1.94 **c**	77.66±2.63 **d**	14.50±0.76 **d**
T4 : مستخلص ثم BPA	67.33±1.76 **b**	76.50±1.38 **b**	93.50±2.22 **c**	19.33±0.92 **c**
L.S.D ($p<0.05$)	6.48	5.69	9.65	2.71

- **القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.**
- **الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية ($p<0.05$).**

إن فهم ومعرفة النظام الفسلجي لنسيج الخصية وعملية انتاج النطف داخل النبيبات المنوية يعد أمراً ضرورياً للوقوف على اسباب حالات ضعف الخصوبة والعقم وفهم الآليات التي تحدد قدرة الإنتاج للحيوانات المنوية (Silva *et al*., 2020). أدت المعاملة بالبيسفينول أ في المجموعة T3 إلى اضطراب نسجي ووظيفي في النسيج الخصوي نتج عنه انخفاض كبير في أعداد الخلايا المولدة للنطف (سليفات النطف, الخلايا النطفية وأرومات النطف) وخلايا سرتولي قاد إلى انخفاض أعداد النطف المنتجة في الخصية وجاءت هذه النتائج متفقة مع دراسة الباحث Ullah وجماعته (2021).

يؤدي التعرض للبيسفينول إلى تحطم الخلايا الجرثومية (Olukole *et al*., 2021) وإلى اختزال وتنكس الخلايا المولدة للنطف (Kaur and Sadwal, 2020) كما إن زيادة انتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية في نسيج الخصية يؤدي إلى خلل وظيفي في مايتوكوندريا خلايا سرتولي مما يقود إلى موتها المبرمج واختزال أعدادها (Wang *et al*., 2016). أشار الباحث Jin وجماعته (2013) إلى أن المعاملة بالبيسفينول أ (2 µg/kg) أدت الى اختزال مستوى الهرمون المحفز للجريب وأضعفت وظيفة خلايا سرتولي وقد تسبب نقص الهرمون في اختزال الخلايا الجرثومية في دورة انتاج النطف.

إن التحسن الواضح في معدلات أعداد الخلايا المدروسة لدى حيوانات مجموعة الوقاية المعاملة بمستخلص رايزومات الخولنجان الأصغر والتي اقتربت أغلب قيمها من القيم الطبيعية في مجموعة السيطرة يعزى إلى الخصائص المضادة للأكسدة لرايزومات ذلك النبات إذ أشار الباحث Li وجماعته (2012) إلى أن الخولنجان الأصغر يمتلك قابلية عالية لاختزال إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية وتقليل الموت المبرمج.

لوحظ في نتائج الدراسة أيضاً، إن مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) أظهرت ارتفاعاً معنوياً ($p<0.05$) في أعداد الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي مقارنة مع مجموعة السيطرة والمجموعات الأخرى وربما يعود ذلك إلى ما أشار إليه الباحثان Negm و Ragheb (2019) من ان الخولنجان الأصغر يمتلك قابلية عالية لتحسين الوظائف التكاثرية في ذكور الجرذان عن طريق زيادة مستوى هرمون التيستوستيرون وأعداد النطف وتعزى تلك التأثيرات إلى الفعل المباشر للمستخلص على الخصية.

4-3-5-2. القياسات النسجية Histological measurment

4-3-5-2-1. معدل أقطار النبيبات الناقلة للمني .

أظهرت نتائج الدراسة النسجية للقياسات الشكلية المبينة في الجدول (4-10) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في معدل أقطار النبيبات المنوية لدى حيوانات المجموعة المعاملة بالبيسفينول

(T3) قياساً مع أقطار تلك النبيبات لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في معدل الأقطار لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) قياساً بها لدى حيوانات المجموعة T3. لم تشير نتائج الدراسة إلى وجود اختلاف معنوي ($P>0.0$) في معدلات أقطار النبيبات بين مجموعة السيطرة والمجموعتين T2, T4 في حين أظهرت ارتفاعاً معنوياً ($p<0.05$) لدى حيوانات مجموعة المستخلص (T2) قياساً إلى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) .

4-3-5-2-2. سمك الطبقة الجرثومية للنبيبات الناقلة للمني

أوضحت نتائج الدراسة النسجية للقياسات الشكلية المبينة في الجدول (4-10) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في سمك الطبقة الجرثومية المبطنة للنبيبات الناقلة للمني لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) قياساً مع سمكها لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C), ووجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في سمك الطبقة ذاتها لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) قياساً بها لدى حيوانات المجموعة T3. لم تشير نتائج الدراسة الى وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في القيم بين مجموعة السيطرة ومجموعة المستخلص (T2) في حين أشارت إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة T2 قياساً إلى حيوانات المجموعة T4.

4-3-5-2-3. معدل أقطار نبيبات ذيل البربخ

بيَّنت نتائج الدراسة النسجية للقياسات الشكلية المبينة في الجدول (4-10) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في معدل أقطار النبيبات البربخية لدى حيوانات المجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) قياساً مع معدل الأقطار لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C), ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في معدلات الأقطار لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) قياساً بها لدى حيوانات المجموعة T3. لم تظهر نتائج قياس معدل الأقطار وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في القيم بين مجموعة السيطرة ومجموعة المستخلص (T2) في حين أشارت إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات المجوعة T2 قياساً إلى حيوانات المجموعة T4.

4-3-5-2-4. سمك الظهارة المبطنة لنبيبات ذيل البربخ

أظهرت نتائج الدراسة النسجية للقياسات الشكلية المبينة في الجدول (4-10) وجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في سمك الظهارة المبطنة لنبيبات ذيل البربخ لدى حيوانات المجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) قياساً مع سمكها لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في السمك لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) قياساً بها لدى حيوانات المجموعة T3. لم تشير النتائج إلى وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في قيم القياس بين مجموعة السيطرة

ومجموعة المستخلص (T2) في حين أشارت إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) لدى حيوانات المجموعة (T2) قياساً إلى حيوانات المجموعة T4.

جدول(4-10) تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر *A. officinarum* (400 ملغم/كغم) في أقطار النبيبات الناقلة للمني, سمك الطبقة الجرثومية للنبيبات المنوية, أقطار نبيبات ذيل البربخ وسمك الطبقة الظهارية لنبيبات ذيل البربخ لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بالبيسفينول أ لمدة 60 يوماً.

المجموعات	قطر النبيبات المنوية (µm)	سمك الطبقة الجرثومية (µm)	قطر نبيبات ذيل البربخ (µm)	سمك الظهارة المبطنة لنبيبات البربخ (µm)
C : سيطرة سالبة	238.33±6.57 **ab**	83.83±3.13 **a**	296.33±5.90 **a**	25.83±1.35 **a**
T1 : سيطرة (زيت الزيتون)	232.66±9.17 **ab**	81.83±2.07 **a**	294.83±5.99 **a**	26.50±1.09 **a**
T2 : مستخلص (400 ملغم/كغم)	251.33±5.94 **a**	87.67±1.33 **a**	303.17±3.75 **a**	27.67±0.95 **a**
T3 : BPA (50 ملغم/كغم)	181.66±3.98 **c**	51.16±2.52 **c**	264.16±5.39 **c**	17.66±0.88 **c**
T4 : مستخلص ثم BPA	219.17±7.14 **b**	74.33±2.09 **b**	279.83±3.77 **b**	21.83±0.70 **b**
L.S.D ($p<0.05$)	19.72	6.72	14.74	2.97

- **القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.**
- **الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية ($p<0.05$).**

يرتبط انتاج النطف اليومي بقطر وطول النبيب المنوي فضلاً عن سمك الطبقة الجرثومية (Russell and França, 1995). أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى وجود انخفاض في معدل أقطار النبيبات المنوية , سمك الطبقة الجرثومية , معدل أقطار نبيبات ذيل البربخ وسمك الظهارة المبطنة لتلك النبيبات لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) وجاءت هذه النتائج متوافقة مع عدد من الدراسات السابقة (Jahan *et al.*, 2016 ; Ullah *et al.*, 2021) .

يؤدي التعرض للبيسفينول أ إلى اختزال معدل أقطار النبيبات المنوية وزيادة الضمور والضرر فيها (Akarca-Dizakar *et al.*, 2020) كما يضعف عملية انقسام سليفات النطف والخلايا النطفية مؤدياً إلى إضعاف نوعية النطف وخاصة أعداها وحركتها (Liu *et al.*, 2021) وقد أشار الباحث Sabeti وجماعته (2016) إلى أن الضرر في تركيب النسيج الخصوي والخلل في وظيفته غالباً ما يترافق مع تزايد حالة الإجهاد التأكسدي في حين بين الباحث Abdellatief وجماعته (2015) إن حدوث تقشر أو تساقط الخلايا الجرثومية قد يعزى إلى انخفاض إفراز السوائل من النبيبات المنوية

نتيجة لتأثر خلايا سرتولي بالاجهاد التأكسدي مما ينعكس على سمك الطبقة الجرثومية وموت خلاياها.

يؤدي الانخفاض غير الطبيعي في مستوى هرمون التستوستيرون إلى اختزال أقطار النبيبات المنوية وسمك الطبقة الجرثومية المبطنة لها (Sukhorum and Iamsaard, 2017) إذ ترتبط التغيرات التنكسية في الخصية وضمور خلايا لايدك وانخفاض أقطار النبيبات المنوية وصغر تجاويفها باضطراب إنتاج هرمون التستوستيرون (Nair *et al.*,1995) وقد ذكر Gomes وجماعته (2011) إن انخفاض أقطار النبيبات المنوية ينتج عن اضمحلال الخلايا النطفية وقلة أعدادها مما يؤدي إلى اختزال تجاويفها ومن ثم انكماشها.

بين Roy وجماعته (2013) إن هرمون التستوستيرون يؤدي دوراً رئيساً في إدامة أقطار النبيبات الناقلة للمني وازدياد معدلات أقطارها عن طريق زيادة نشاط انقسام الخلايا المولدة للنطف وإن الزيادة في انتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية تؤدي إلى انحطاط النبيبات المنوية المبطنة بالخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي.

بين Jahan وجماعته (2016) إن التعرض للبيسفينول أ سبب اختزالاً كبيراً في أقطار نبيبات ذيل البربخ وأقطار تجاويفها وسمك النسيج الظهاري المبطن لها وقد أعزى ذلك إلى انخفاض مستوى هرمون التستوستيرون, كما بين Nair وجماعته (2002) إن التغيرات في معدل أقطار النبيبات البربخية واختزال أعداد النطف في تجاويفها ترتبط بانخفاض مستوى هرمون التستوستيرون واضطراب مستوى الهرمونين المحفز للخلايا البينية والمحفز للجريبات في حين أوضح Shum وجماعته (2014) إن السلامة الهيكلية للظهارة المبطنة للنبيبات البربخية تعتمد على الارتباط المباشر للخلايا الظهارية على الغشاء القاعدي وإن الانخفاض الحاصل في سمك الظهارة ينتج عن تنكس الخلايا المبطنة لتلك النبيبات تحت تأثير الإجهاد ألتأكسدي الذي يعد الآلية الرئيسة لإحداث التحطم النسجي في الأعضاء.

أشار الباحثان Dahia و Roa (2006) إلى أن تنظيم هرمون LH ومستقبلاته يعد ضرورياً لتنظيم مورفولوجيا الخلايا الظهارية المبطنة للنبيبات البربخية كونه مهماً في تخصص تلك الخلايا وتمايزها فضلاً عن أن وجود مستقبلات هذا الهرمون لا يقتصر على الخصية بل توجد أيضاً في البربخ والأعضاء التناسلية الأخرى (Zhou *et al.*, 1996).

أظهر المستخلص الكحولي لنبات الخولنجان دوراً وقائياً ضد التغيرات في القياسات النسجية المدروسة في الخصى والبرابخ لدى حيوانات المجموعة (T4) ويعزى ذلك إلى تأثيره في تعزيز

نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة مما يوفر الحماية لأغشية الخلايا والمكونات الخلوية الأخرى والأحماض النووية والبروتينات (Tvrdá *et al.*, 2020) وتأثيره في زيادة مستوى التستوستيرون الذي يعمل على إدامة التركيب الوظيفي والهيكلي لهذه الأعضاء إذ يتسبب في زيادة زيادة أعداد خلايا سرتولي والخلايا المولدة للحيوانات المنوية والخلايا النطفية مما ينعكس على سمك النبيبات وزيادة أقطارها (Al-Gnami and Al-Mayali, 2018)

يمتلك الخولنجان الأصغر قابلية عالية لتحسين الوظائف التكاثرية عن طريق زيادة مستوى هرمون التيستوستيرون وأعداد النطف وتعزى تلك التأثيرات إلى الفعل المباشر لمستخلص النبات على نسيج الخصية (Negm and Rapheb, 2019) .

4-3-5-3. التغيرات النسجية - المرضية Histopathological changes

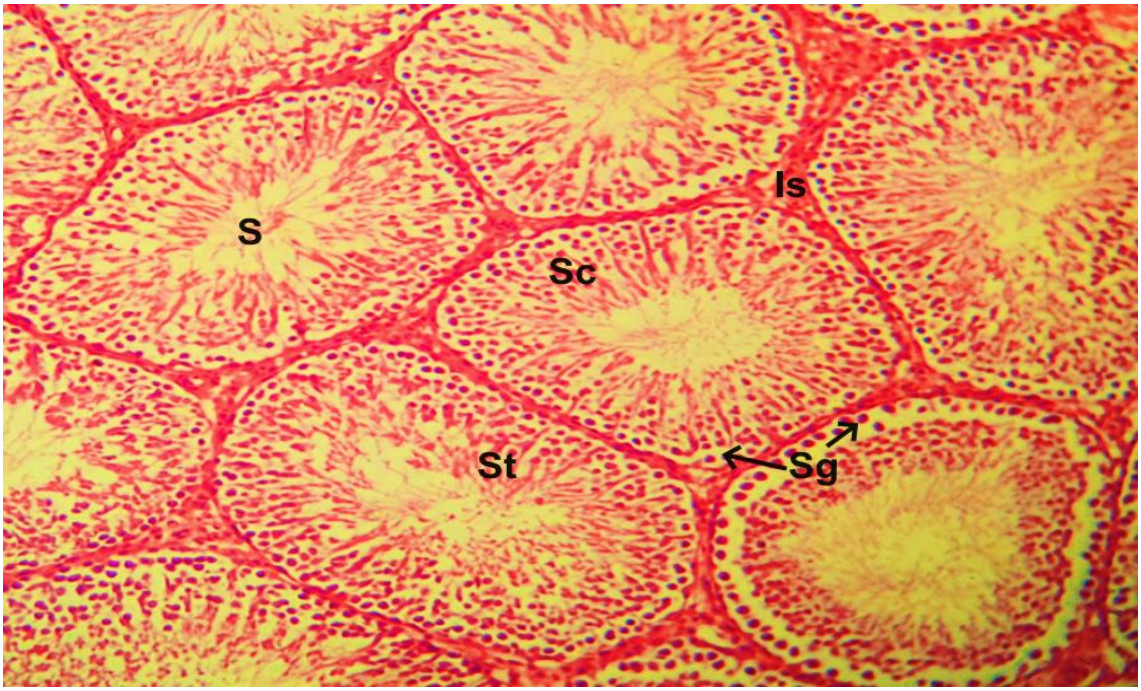
4-3-5-3-1. التغيرات النسجية – المرضية في الخصى:

أظهر الفحص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذة من خصى حيوانات مجموعة السيطرة (C) (صورة 4-1) ومجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) (صورة 4-3) البناء الطبيعي لتك النسج والذي يتكون من نبيبات منوية مدورة أو بيضوية الشكل مرتبة بشكل جيد ومنتظم ويحيط كل نبيب غشاء قاعدي مبطن بالخلايا المولدة للحيوانات المنوية تنتشر بينها مجموعة من خلايا سرتولي ذات الانوية مثلثة الشكل. تشمل الخلايا المولدة للحيوانات المنوية سليفات النطف التي ظهرت كخلايا مستديرة صغيرة تستند على الغشاء القاعدي ، الخلايا النطفية التي كانت اكبر حجماً ذات نوى داكنة مستديرة وأرومات النطف التي تظهر مستديرة أو مستطيلة بالقرب من التجويف. تظهر تجاويف النبيبات ممتلئة بالنطف كما يلاحظ النسيج الخلالي يملأ الفسح بين النبيبات ويحتوي على خلايا لايدك والأوعية الدموية.

بيَّنت مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) (صورة 4-4) بنية مشوهة لنسيج الخصية تميزت باتساع الفسح بين النبيبات الناقلة للمني , تفكك الطبقة الجرثومية وانعدام حالة الارتباط بين الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي, انفصال أو انسلاخ الطبقة الجرثومية عن الغشاء القاعدي في أغلب النبيبات, خلو تجاويف بعض النبيبات من النطف وانحسار كميتها في تجاويف البعض الآخر, تناقص أعداد الخلايا النطفية وخلايا سرتولي, ضمور بعض النبيبات بحيث تبدو صغيرة ومنفصلة نتيجة تفكك النسيج الرابط كما تظهر اتساعاً في التجويف كونها خالية أو شبه خالية من النطف.

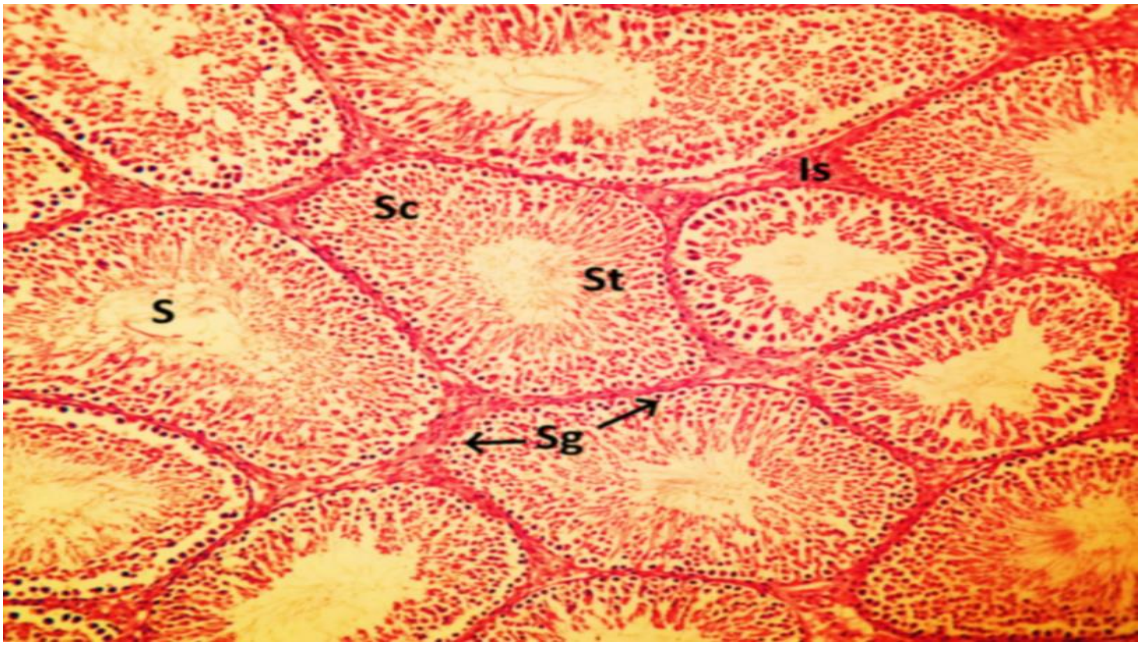
بيَّنت المقاطع النسجية لخصى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) اختزالاً كبيراً للأضرار التي لوحظت لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول إذ أظهرت البنية الطبيعية في معظم الأنابيب

المنوية والتي تميزت بالانتظام, سلامة الاغشية القاعدية وعدم انفصالها عن الطبقة الجرثومية, المحتوى الطبيعي من الخلايا المولدة للحيوانات المنوية , امتلاء تجاويف أغلب النبيبات بالنطف واحتواء النسيج الخلالي بين الأنابيب على أوعية دموية طبيعية وخلايا لايدك (صورة 4-5).



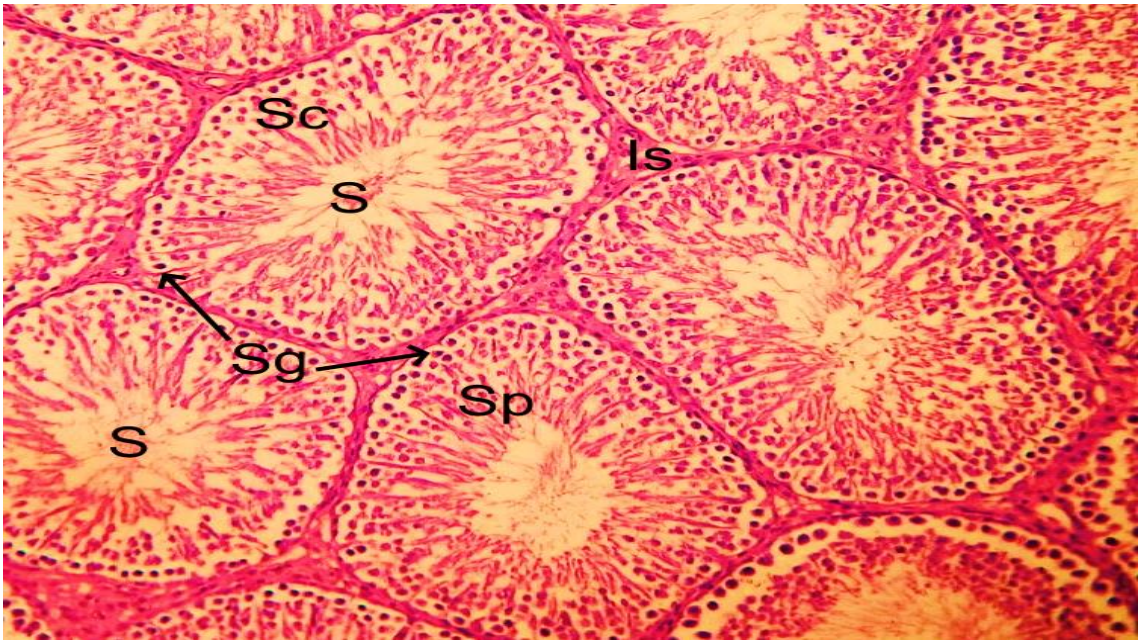
صورة (4-1) مقطع نسجي مستعرض في خصية جرذ من مجموعة السيطرة توضح البناء الطبيعي لنسيج الخصية (النبيبات الناقلة للمني موزعة بشكل منتظم, خلايا الطبقة الجرثومية كثيفة ومتماسكة, تجاويف النبيبات ممتلئة بالنطف, النسيج البيني متراص غير مفكك)

Is: النسيج البيني Interstitial tisue, Sg : سليفات النطف Spermatogonia , Sc: الخلايا النطفية Spermatocytes , St: أرومات النطف Spermatides, S: نطف sperms (ملون Harris H +E, 100X).



صورة (4-2) مقطع نسجي مستعرض في خصية جرذ من مجموعة المعاملة بزيت الزيتون توضح البناء الطبيعي لنسيج الخصية (النبيبات الناقلة للمني موزعة بشكل منتظم, خلايا الطبقة الجرثومية كثيفة ومتماسكة, تجاويف النبيبات ممتلئة بالنطف, النسيج البيني متراص غير مفكك).

Is: النسيج البيني Interstitial tisue, Sg : سليفات النطف Spermatogonia , Sc: الخلايا النطفية Spermatocytes , St: أرومات النطف Spermatides, S: نطف sperms (ملون Harris H +E, 100X).

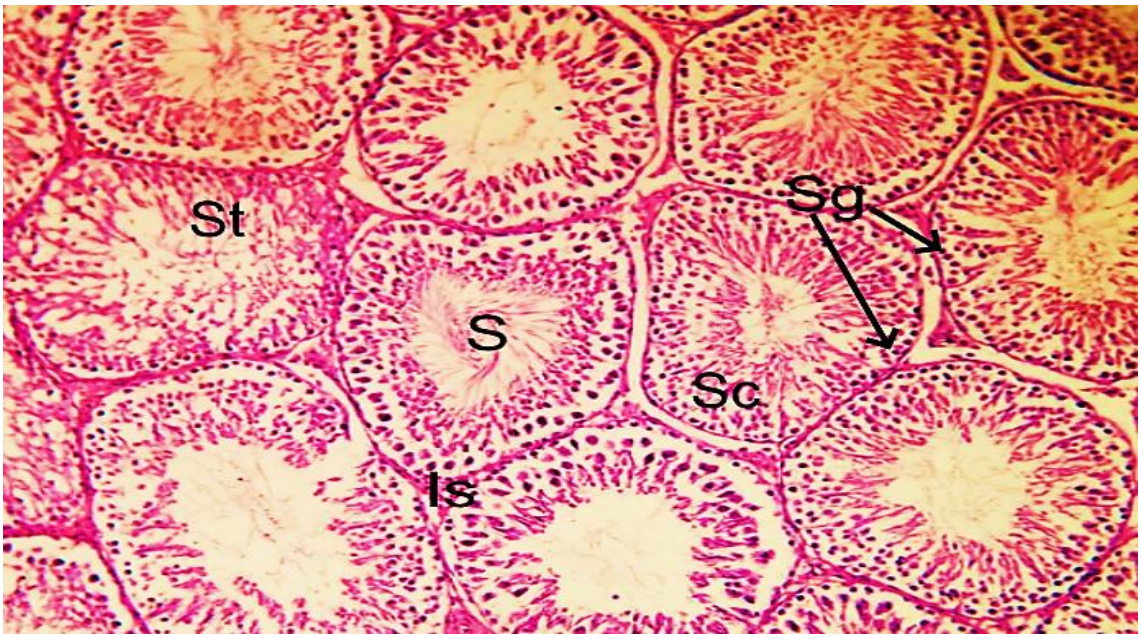


صورة (4-3) مقطع نسجي مستعرض في خصية جرذ من مجموعة المعاملة بمستخلص الخولنجان (400mg/kg) توضح البناء الطبيعي لنسيج الخصية (النبيبات الناقلة للمني موزعة بشكل منتظم, خلايا الطبقة الجرثومية أكثر كثافة وتمايزاً عن بعضها البعض, تجاويف النبيبات صغيرة وممتلئة بالنطف, النسيج البيني كثيف ومتكامل البناء

Is: النسيج البيني Interstitial tisue, Sg : سليفات النطف Spermatogonia , Sc: الخلايا النطفية Spermatocytes , St: أرومات النطف Spermatides, S: نطف sperms (ملون Harris H +E, 100X).

صورة (4-4) مقطع نسجي مستعرض في خصية جرذ من مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (50 mg/kg) تظهر مجموعة من التغيرات النسجية (تنكس الطبقة الجرثومية وتفكك خلاياها, انفصال الطبقة الجرثومية عن الغشاء القاعدي في أغلب النبيبات, النطف قلية او معدومة في تجاويف بعض النبيبات, اختزال النسيج البيني وتفككه).

Is: النسيج البيني Interstitial tisue, Sg : سليفات النطف Spermatogonia , Sc: الخلايا النطفية Spermatocytes , St: أرومات النطف Spermatides, S: نطف sperms (ملون Harris H +E, 100X).



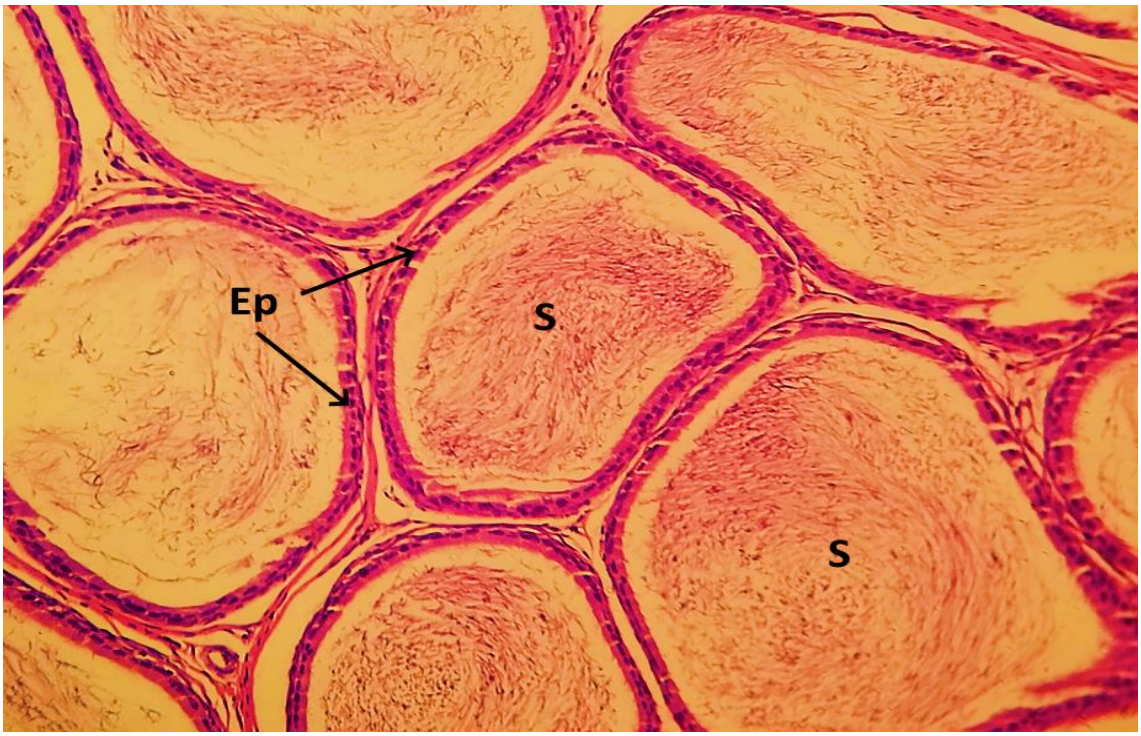
صورة (4-5) مقطع نسجي مستعرض في خصية جرذ من مجموعة الوقاية المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400mg/kg) ثم بيسفينول أ (50mg/kg) تظهر فيها النبيبات الناقلة للمني موزعة بشكل منتظم, خلايا الطبقة الجرثومية متماسكة نسبياً في اغلب النبيبات , التجاويف ممتلئة بالنطف , النسيج البيني غير مفكك) .

Is: النسيج البيني Interstitial tisue, Sg : سليفات النطف Spermatogonia , Sc: الخلايا النطفية Spermatocytes , St: أرومات النطف Spermatides, S: نطف sperms (ملون Harris H +E, 100X).

4-3-5-3-2. التغيرات النسجية في ذيل البربخ

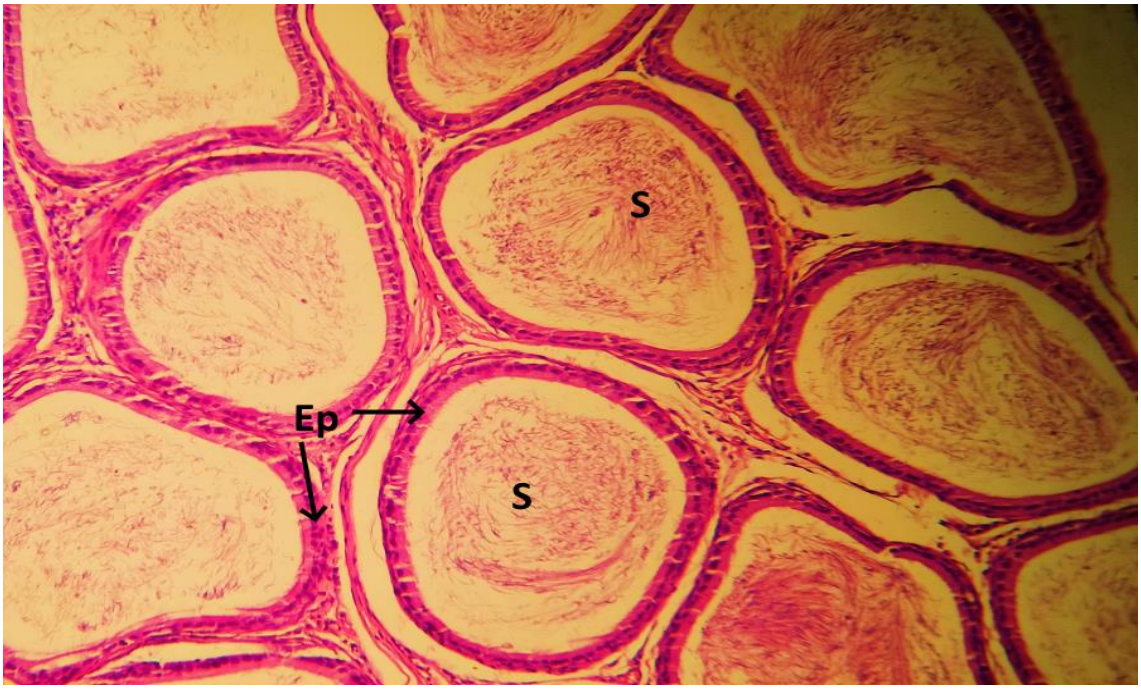
اظهرت المقاطع النسجية المأخوذة من ذيل البربخ لحيوانات مجموعة السيطرة C (صورة 4-6) ومجموعة المعاملة بالمستخلص T2 (صورة 4-7) البناء النسيجي الطبيعي للنبيبات البربخية إذ تبدو متسعة ومبطنة بنسيج طلائي طبيعي كما تملأ تجاويفها أعداد كبيرة من النطف, في حين أظهرت المقاطع النسجية لحيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول T3 (صورة 4-9) ضمور أغلب النبيبات البربخية , اختزال أعداد النطف أو انعدامها في تجاويف تلك النبيبات , اختزال كبير في سمك النسيج الظهاري المبطن, انسلاخ الخلايا الظهارية عن الغشاء القاعدي في بعض المناطق , عدم انتظام توزيع النبيبات البربخية مع اتساع وتفكك النسيج الرابط بينها.

من ناحية أخرى, بيَّنت المقاطع النسجية لبرابخ المجموعة T4 (مجموعة الوقاية) اختزالاً كبيراً في التغيرات المرضية التي ظهرت في المجموعة T3 إذ لوحظت النبيبات أكثر اتساعاً مع احتوائها على كميات كبيرة من النطف كما لوحظت الظهارة المبطنة لتلك النبيبات أكثر سمكاً (صورة 4-10).



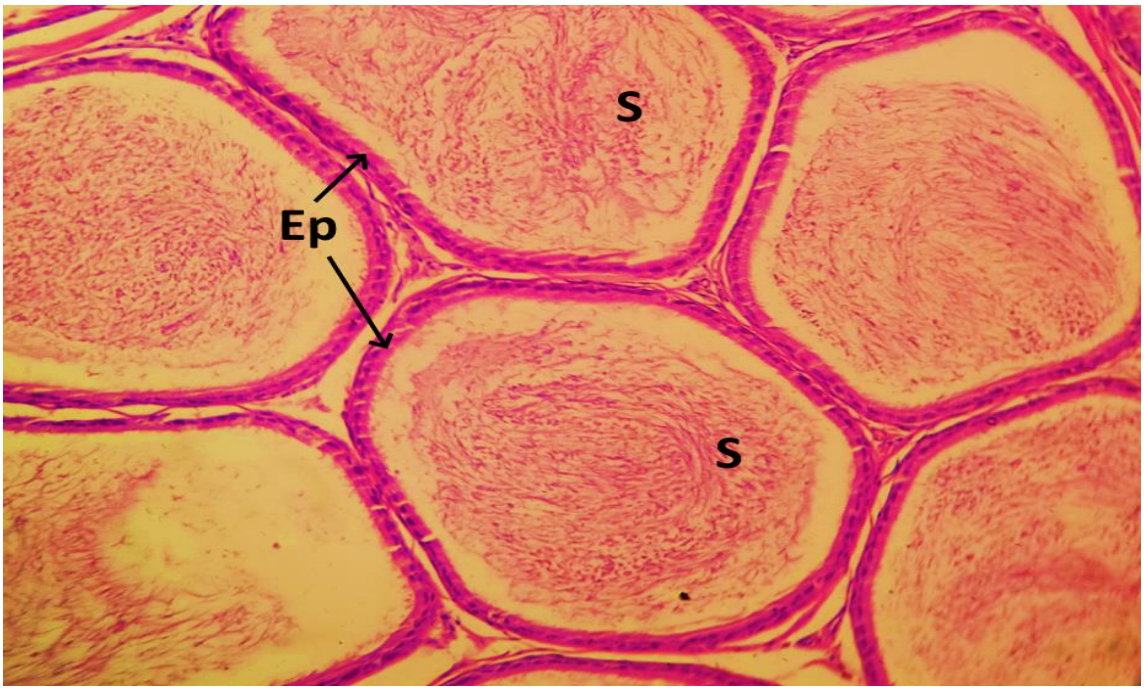
صورة (4-6) مقطع نسجي مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة السيطرة تظهر فيها النبيبات البربخية موزعة بشكل منتظم ومتماسكة مع بعظها , الظهارة المبطنة جيدة البناء ومستندة على الغشاء القاعدي, التجاويف ممتلئة بالنطف.

S (Sperm) : نطف , Ep (Epithilial): ظهارة , (ملون Harris H +E, 100X).



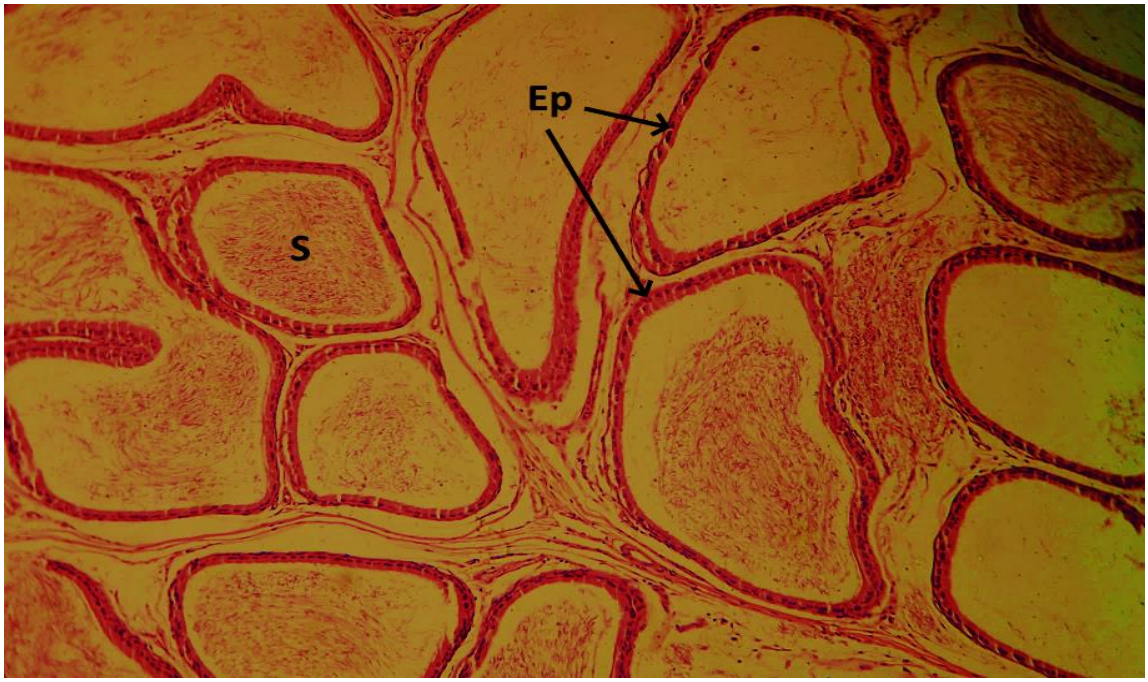
صورة (4-7) مقطع نسجي مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بزيت الزيتون تظهر فيها النبيبات البربخية موزعة بشكل منتظم ومتماسكة مع بعظها , الظهارة المبطنة جيدة البناء ومستندة على الغشاء القاعدي, التجاويف ممتلئة بالنطف.

S (Sperm) : نطف , Ep (Epithilial): ظهارة , (ملون Harris H +E, 100X).



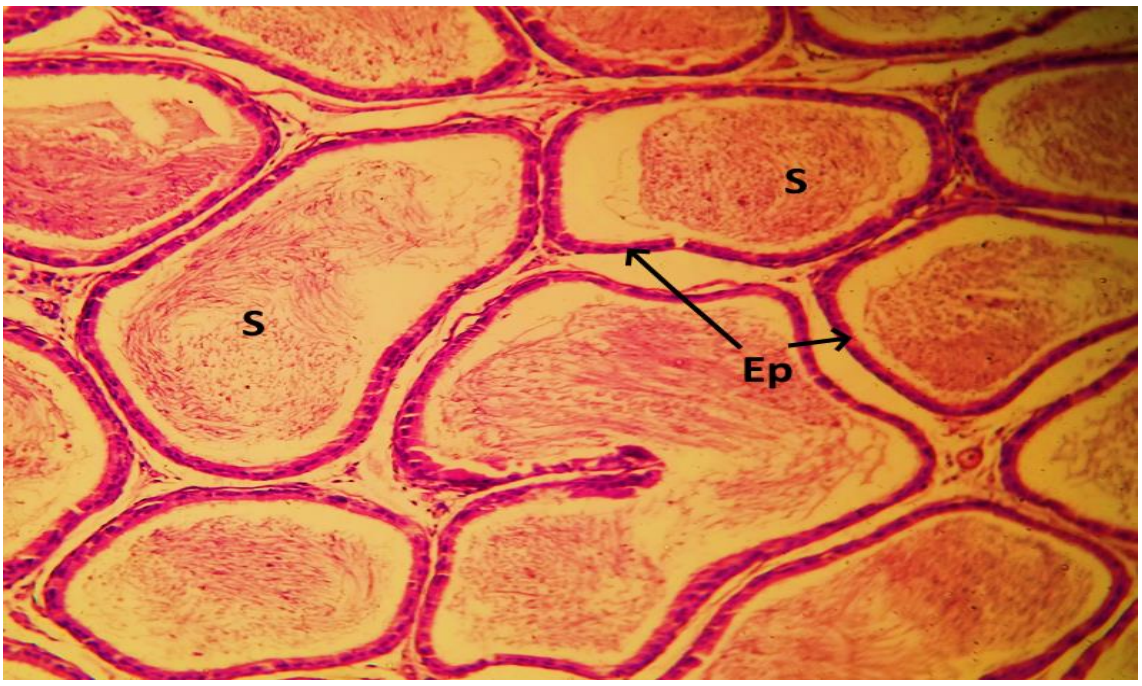
صورة (4-8) مقطع نسجي مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400mg/kg) تظهر فيها النبيبات البربخية موزعة بشكل منتظم ومتماسكة مع بعظها , الظهارة المبطنة جيدة البناء ومستندة على الغشاء القاعدي, التجاويف ممتلئة بالنطف.

S (Sperm) : نطف , Ep (Epithilial): ظهارة , (ملون Harris H +E, 100X).



صورة (4-9) مقطع نسجي مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بالبيسفينول (50mg/kg) تظهر فيها النبيبات البربخية ضامرة وغير منتظمة التوزيع، الظهارة المبطنة مختزلة ومنفصلة عن الغشاء القاعدي في بعض المناطق, النطف قليلة جدا او معدومة في تجاويف النبيبات، النسيج الرابط بين النبيبات مفكك وغير مترابط.

S (Sperm) : نطف، Ep (Epithilial): ظهارة، (ملون Harris H +E, 100X).



صورة (4-10) مقطع نسجي مستعرض في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة الوقاية المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400mg/kg) ثم بيسفينول A (50mg/kg), تظهر فيها النبيبات البربخية موزعة بشكل منتظم, الظهارة المبطنة للنبيبات مستندة على الغشاء القاعدي , التجاويف ممتلئة بالنطف.

S (Sperm) : نطف , Ep (Epithilial): ظهارة , (ملون Harris H +E, 100X).

أظهرت المقاطع النسجية لخصى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) تغيرات نسجية تمثلت باتساع الفسح بين النبيبات الناقلة للمني, تفكك الطبقة الجرثومية وانعدام حالة الارتباط والتماسك بين الخلايا المولدة للنطف وخلايا سرتولي, انفصال أو انسلاخ الطبقة الجرثومية عن الغشاء القاعدي في أغلب النبيبات، خلو تجاويف بعض النبيبات من النطف وانحسار كميتها في تجاويف البعض الآخر, تناقص أعداد الخلايا النطفية وخلايا سرتولي، ضمور بعض النبيبات واتساع تجاويفها إذ تبدو صغيرة ومنفصلة نتيجة تفكك النسيج الرابط وجاءت هذه النتائج متفقة مع دراسات سابقة .(Jahan *et al.*, 2016; Kamel *et al.*, 2018 ; Alboghobeish *et al.*, 2019) .

بين الباحث Vandenberg وجماعته (2009) في دراستة إن البيسفينول أ يسبب تغيرات على مستوى محور تحت المهاد – النخامية – المناسل ويختزل وظيفة البلعمة لخلايا سرتولي مما يقود إلى امراضية نسيج الخصية ويغير وظائف النطف فيما أكدت دراسات أخرى ان التعرض للبيسفينول أ يأثر على عملية تكوين الستيرويدات ويتسبب في حالة الاجهاد التأكسدي مما يؤدي إلى الأمراضية النسجية (Manfo *et al.*, 2014 ; Ullah *et al.*, 2018b). ذكر Alazouny وجماعته (2014) إن الإجهاد التأكسدي يؤدي إلى أضرار هيكلية ووظيفية في أنسجة الجسم فيما بين Chipuk وجماعته (2010) إن الإجهاد التأكسدي يسبب انتفاخ الغشاء الخارجي للمايتوكوندريا ويطلق بروتينات موت الخلايا المبرمج للانتشار في العصارة الخلوية.

يعد اختزال سمك الظهارة الجرثومية أحد أسباب انخفاض إنتاج النطف الذي يؤدي إلى حالة قلة النطاف Oligospermia أو فقد النطاف Azospermia في التجويف ويمكن أن يعزى تفسير موت الخلايا المبرمج وقلة النطف في النبيبات الناقلة للمني إلى خلال انخفاض مستويات التستوستيرون الضروري للحفاظ على انتاج الحيوانات المنوية بشكل طبيعي ومنع الموت المبرمج للخلايا الجرثومية.(Aitken and Roman, 2008).

ذكر Shum وجماعته (2014) إن الأعضاء التناسلية المرتبطة بالخصية كالبربخ لها نفس القدر من الأهمية للصحة الإنجابية للذكور إذ تخضع النطف بعد عبورها من الخصية إلى البربخ بمراحل من النضج إلى أن تصل منطقة الذنب إذ يتم تخزينها مؤقتاً لتصبح مؤهلة للتخصيب, فيما أوضح Sadeghzadeh وجماعته (2019) إن البيسفينول أ تسبب بمجموعة تغيرات في نسيج البربخ كضمور النبيبات البربخية وخلو أغلبها من النطف فضلاً عن تنكس الظهارة المبطنة لتلك النبيبات وانسلاخها عن الغشاء القاعدي في بعض المناطق وقد أعزى سبب تلك التغييرات إلى حالة الإجهاد التأكسدي في أنسجة البربخ.

من ناحية أخرى, بيَّنت صور المقاطع النسجية انحساراً ملحوظاً في التغيرات المرضية النسجية لخصى وبرابخ حيوانات مجموعة الوقاية (T4) بفعل التأثيرات الإيجابية للمستخلص الكحولي للخولنجان الأصغر وقابليته على حماية الأنسجة التناسلية الذكرية عن طريق تقليل أو منع أكسدة الدهون في هذه الأنسجة بفعل نشاطه المضاد للأكسدة وقدرته على حماية الحامض النووي من ضرر الجذور الحرة فضلاً عن دعمه لمضادات الأكسدة مما يؤدي إلى استقرار وسلامة الغشاء الخلوي وبالنتيجة حماية الأنسجة من التأكسد.

ربما يكون سبب التحسن في أنسجة الخصية والبربخ ناتجاً عن التأثير الايجابي للخولنجان على الهرمونات التناسلية التي تعد ضرورية للنمو الطبيعي للجهاز التناسلي الذكري إذ أن نمو وتطور أنسجة الخصية يعتمد على الأندروجينات وخاصة هرمون التستوستيرون الذي تكثر مستقبلاته في هذه الانسجة (Martin and Touaibia, 2020) كما إن البربخ يحتاج إلى هرمون التستوستيرون للحفاظ على أنسجته ووظائفه الطبيعية (Turner, 1991) لذا لوحظ أن المجموعات التي فيها مستوى أعلى من هرمون التستوستيرون أظهرت تحسناً على المستوى النسجي أفضل من المجموعات التي لديها مستوى منخفض من هذا الهرمون.

4-3-6. التغيرات في الحامض النووي Changes of DNA

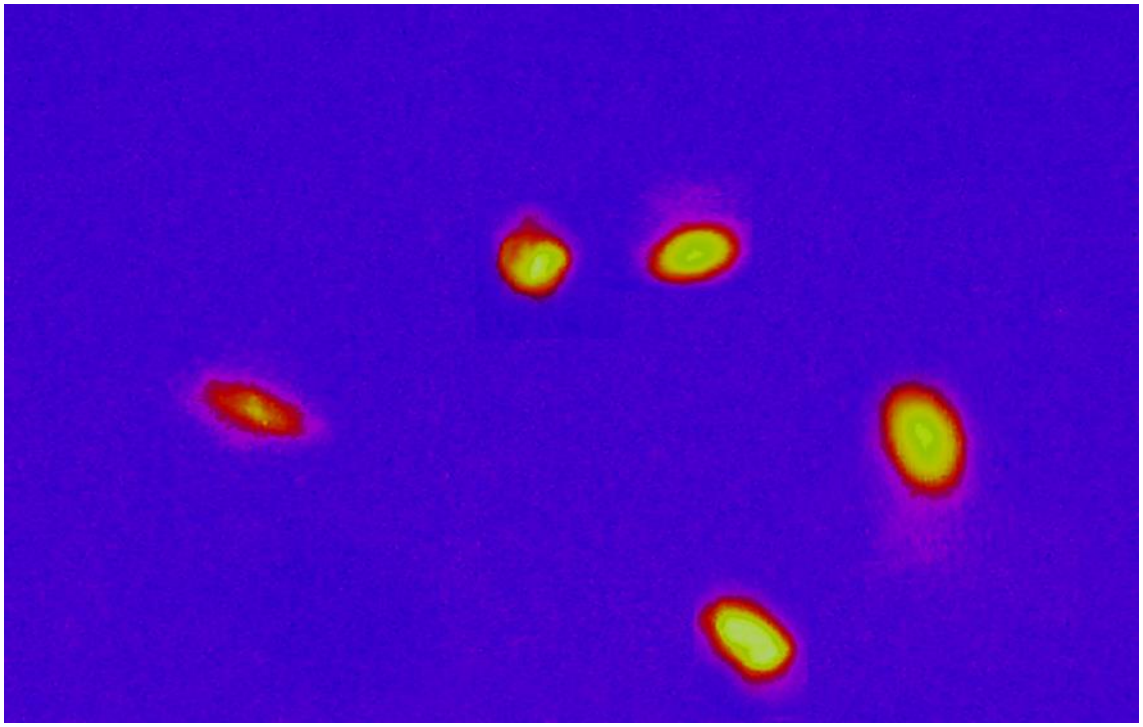
تشير النتائج في الجدول (4-11) والصور (4-11, 12, 13, 14,15) إلى وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في أعداد النطف التي أظهرت شكل المذنب وارتفاع معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للحامض النووي DNA المتجزأ في منطقة الذنب لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول (T3) مقارنة بها لدى حيوانات مجموعة السيطرة (C) ووجود انخفاض معنوي ($p<0.05$) في المعيارين (العدد والنسبة المئوية) لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) مقارنة بالمجموعة (T3). لم تشير النتائج إلى وجود اختلاف معنوي ($p>0.05$) في عدد الخلايا المذنبة والنسبة المئوية للحامض النووي المتجزأ بين مجموعة المعاملة بالمستخلص (T2) ومجموعة السيطرة في حين أظهرت كلتا المجموعتين انخفاضاً معنوياً ($p<0.05$) مقارنة بالمجموعة T4.

جدول(4-11) تأثير المعاملة بالمستخلص الكحولي لرايزومات نبات الخولنجان الأصغر *A. officinarum* (400 ملغم/كغم) في مقدار الضرر في الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA.

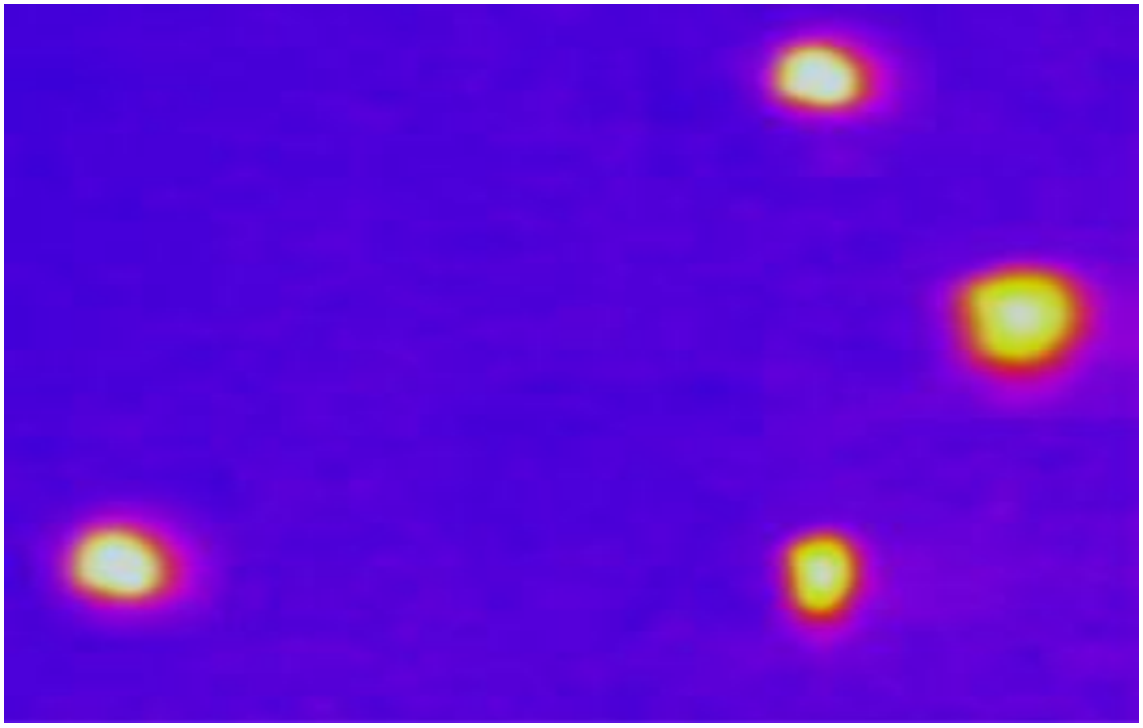
المجموعات	عدد الخلايا المذنبة/100	نسبة DNA المتجزأ في الذنب (DNA%)
C : سيطرة سالبة	16±0.73 **c**	2.32±0.21 **c**
T1 : سيطرة (زيت الزيتون)	17 ±0.58 **c**	2.39±0.20 **c**
T2 : مستخلص (400 ملغم/كغم)	18 ±0.58 **c**	3.19±0.21 **c**
T3 : BPA (50 ملغم/كغم)	28 ±1.26 **a**	8.47±0.52 **a**
T4 : مستخلص ثم BPA	21±1.06 **b**	5.63±0.35 **b**
L.S.D (p<0.05)	2.58	0.96

- **القيم تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ القياسي.**
- **الحروف المختلفة بين أي متوسطين حسابيين تشير إلى وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية (p<0.05).**

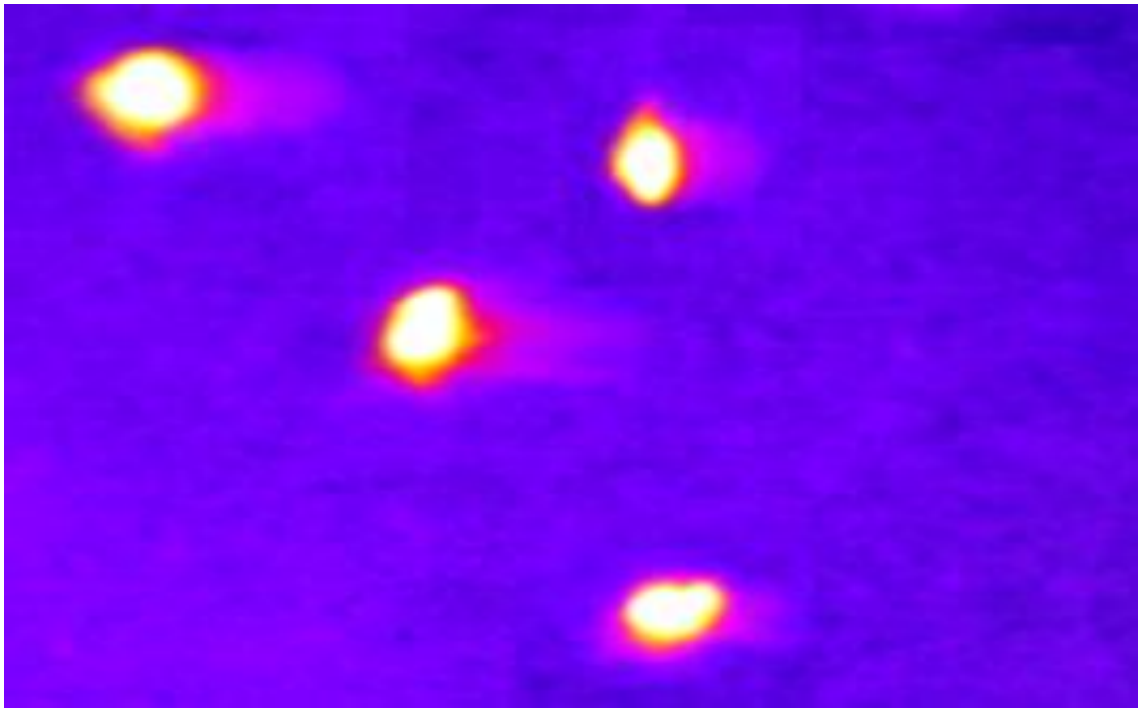
صورة (4-11) صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة السيطرة بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي لخلية واحدة (اختبار المذنب comet assay)
(الصبغة الحمراء SAF RED, قوة التكبير 400X)



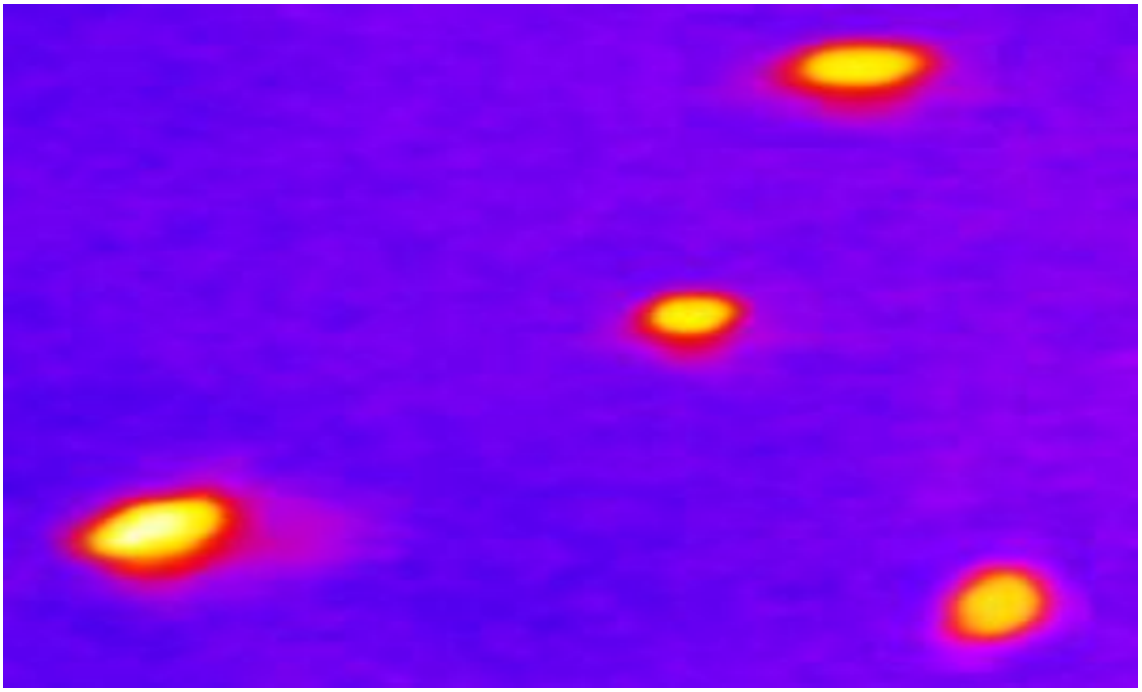
صورة (4-12) صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بزيت الزيتون بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي لخلية واحدة (اختبار المذنب comet assay) (الصبغة الحمراء SAF RED, قوة التكبير 400X)



صورة (4-13) صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400mg/kg) بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي لخلية واحدة (اختبار المذنب comet assay) (الصبغة الحمراء SAF RED, قوة التكبير 400X)



صورة (4-15) صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (50mg/kg) بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي لخلية واحدة (اختبار المذنب comet assay) (الصبغة الحمراء SAF RED, قوة التكبير 400X)



صورة (4-15) صورة مجهرية تظهر نمط هجرة الحامض النووي لنوى الحيوانات المنوية في ذيل البربخ لجرذ من مجموعة الوقاية المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر (400mg/kg) ثم بيسفينول أ (50mg/kg) بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي لخلية واحدة (اختبار المذنب comet assay) (الصبغة الحمراء SAF RED, قوة التكبير 400X)

يظهر من نتائج الدراسة الموضحة في الجدول 4-11 والصور (4-11)-(4-15) وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في أعداد النطف التي أظهرت شكل المذنب وفي النسبة المئوية للحامض النووي DNA المتجزأ الموجود ضمن منطقة الذنب لدى حيوانات مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ (T3) بالمقارنة مع حيوانات مجموعة السيطرة (C) وهذه النتائج تتوافق مع دراسة الباحث Ullah وجماعته (2017) الذي أشارإلى أن السبب الاساس وراء ضرر الحامض النووي DNA في نطف الجرذان المعرضة للبيسفينول أ هو الاجهاد التأكسدي وارتفاع مستوى أنواع الأوكسجين التفاعلية, كما توافقت أيضاً مع ما توصل إليه الباحث Sahu وجماعته (2020).

أوضح Pan وجماعته (2020) إن تعريض الحيوانات المختبرية إلى مستويات واطئة من البيسفينول أ يزيد من تجزئة الحامض النووي منقوص الأوكسجين في النطف فيما كشف Meeker وجماعته (2010) عن الارتباط بين التعرض للبيسفينول أ والتغيرات في الحامض النووي للنطف لدى الإنسان خلال تقييم الاضرار في الحامض النووي لدى الذكور الذين يعانون من مشاكل في الخصوبة.

إن تزايد مستوى عناصر الأوكسجين التفاعلية يمكن أن يستحث الضرر خلال تضاعف الحامض النووي منقوص الأوكسجين أو خلال عملية الترجمة والأحداث بعد الترجمة مؤدياً إلى تجزئة الحامض النووي للنطف وعدم انتظام تكاثف الكروماتين فضلاً عن خلل في تعبير البروتامين (Paoli *et al.*, 2019).

تعاني مجموعات الخلايا المختلفة من إعادة تشكيل مكثفة للمعلومات فوق الجينية epigenetic information والتي تتضمن تعديلات وراثية تغير التعبير الجيني دون التأثير على التسلسل الأولي للحامض النووي منقوص الأوكسجين، كمثيلة الحامض النووي، وتعديلات الهيستون بعد الترجمة وكذلك التعبير للحوامض النووية الرايبية (Champroux *et al.*, 2018).

بيّن Schulz وجماعته (2010) إن الحيوانات المنوية هي خلايا متخصصة بشكل استثنائي تتشكل عن طريق عملية تمايز تتضمن الانقسامات الخيطية المتكررة للخلايا السلفية والاطوار الاختزالية اللازمة لتحول الخلايا المنوية الأولية إلى ثانوية ثم إلى أرومات نطف تتبعها عملية التحول النطفي وهي عملية تحول الحيوانات المنوية أحادية المجموعة الكروموسومية إلى حيوانات منوية مسوطة متحركة. هناك اليات جزيئية مختلفة تكمن وراء كل خطوة من الخطوات المذكورة تتضمن خلالها أحداث عدة كضغط الكروماتين (Ribas-Maynou and Benetet, 2019) والأحداث فوق الجينية في الحامض النووي منقوص الأوكسجين والهستونات المرتبطة به (Labbé *et al.*, 2017).

أشار الباحث Lombó وجماعته (2019) إلى أن المعلومات الوراثية الجينية وفوق الجينية لخلايا النطف تتأثر بشكل كبير بسبب تعرض الآباء للبيسفينول أ أثناء فترة الانقسامات الخيطية فقط أو طوال عملية تكوين النطف, إذ أن تأثير التعرض للبيسفينول على معلومات الحيوانات المنوية وآثارها على الجيل التالي تعتمد بقوة على مقدار الجرعة وعلى المرحلة المتأثرة بالتعرض وبالتالي فأن التعرض طوال عملية تكوين الحيوانات المنوية يؤدي إلى مزيد من تلف الحامض النووي مقارنة بالتعرض خلال مرحلة الانقسامات الخيطية فقط , لذا وبسبب التجزئة الكبيرة للحامض النووي يتم تجاوز قدرة الجنين على تنشيط آلية الإصلاح وتبدأ عملية الموت المبرمج للخلايا. لوحظ أيضاً أن التعرض الأبوي لـ BPA حتى بجرعات واطئة خلال فترة الانقسام الخيطي يؤدي إلى تعديلات في أستلة هيستون الحيوانات المنوية وأن هذه التعديلات فوق الجينية تنتقل إلى الجيل التالي مما يهدد النمو المبكر للجنين ويورث الأجيال القادمة التعديلات الناجمة عن البيئة.

أظهرت نتائج الجدولين أعلاه أختزالاً كبيراً في مقدار الضرر في الحامض النووي DNA لدى حيوانات مجموعة الوقاية (T4) إذ اظهرت انخفاضاً معنوياً ($p<0.05$) في أعداد النطف التي كونت الشكل المذنب وفي النسبة المئوية للحامض النوي في ذنب المذنب بالمقارنة مع مجموعة المعاملة بالبيسفينول أ لوحده (T3) وربما يعزى هذا التأثير إلى الخصائص المضادة للأكسدة التي تتمتع بها رايزومات الخولنجان الأصغر والتي تختزل مقدار الضرر في الحامض النووي DNA كما أشار إلى ذلك Alasmary وجماعته (2019) , فيما بين Li وجماعته (2012) إن الكالانجين والذي يعد المركب الاساس من بين المركبات الفعالة في رايزومات الخولنجان الأصغر يمتلك القابلية لاختزال إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية وتقليل الموت المبرمج بوساطة تثبيط الـ caspase أو عن طريق خفض تعبير الـ Bax وزيادة تعبير الـ Bcl-2 .

1-5. الإستنتاجات Conclusions

1- إحتواء المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان على العديد من المركبات الفعالة التي تنتمي إلى مجاميع الفينولات والفلافونويدات وغيرها.

2- امتلاك المستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر بالتركيز 400 ملغم/كغم فعالية عالية مضادة للأكسدة مقارنة بالتركيزين 100,200 ملغم/كغم.

3- ينتج عن التعرض للبيسفينول أ بالتركيز 50 ملغم/كغم تغيرات وزنية ، وفسلجية ، ونسجية وجزيئية في الجهاز التكاثري الذكري للجرذان البيض.

4- للمستخلص الكحولي لرايزومات الخولنجان الأصغر القابلية على منع أو اختزال التغيرات في أوزان الخصى والبرابخ، معايير النطف، هرمونات التكاثر، عوامل ومضادات الأكسدة ، المورفولوجية والإمراضية النسجية والضرر في الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA التي تنتج عن التعرض للبيسفينول أ بالتركيز 50 ملغم/كغم.

5- يمتلك المستخلص الكحولي للخولنجان الأصغر القدرة على زيادة فعالية النظام المضاد للأكسدة في الجسم وتحسين كفاءة الجهاز التكاثري بوساطة زيادة التنظيم الهرموني وتحفيز عملية تكوين النطف وزيادة انتاجها.

2-5. التوصيات Recommendations

1- دراسة تأثير المركبات الفعالة لنبات الخولنجان الأصغر بصورة مستقلة عن بعضها لمعرفة تأثراتها المحسنة والوقائية والعلاجية.

2- دراسة تأثير المعاملة بمستخلص الخولنجان الأصغر على كفاءة الجهاز التناسلي الأنثوي المعرض للإجهاد التأكسدي.

3- تقييم فعالية مستخلصات هذا النبات على الجهازين المناعي والغدي للجسم.

4- أجراء المزيد من الدراسات لتقييم الفعالية العلاجية والوقائية لمستخلصات هذا النبات ضد الاضطرابات الناجمة عن تأثير الأمراض والملوثات البيئية على أجهزة وأعضاء الجسم كالجهاز التنفسي والكبد والمعدة والمعدة والكلى.

5- إجراء المزيد من الدراسات الجزيئية لأيجاد الحلول المناسبة لمنع أو الحد من وقوع الطفرات الوراثية في أنزيم UGT2B15 المسؤول عن مسار الكلوكورونويد المؤدي الى استقلاب البيسفينول أ في الكبد وإخراجه من الجسم عن طريق الصفراء أو البول.

6- تقييم فعالية أنواع أخرى من الجنس Alpinia لما يتميز به من محتوى عالي من المركبات الفعالة.

7- العمل على نشر ثقافة الاستطباب بالمستحضرات الدوائية ذات المحتوى الطبيعي من الأعشاب لما تتميز به من فعالية دوائية ووقائية ذات تأثيرات جانبية قليلة نسبياً.

1-6. المصادر العربية والأجنبية

المختار، انتصار جواد حمد. (1994). دراسة بعض الخصائص الدوائية لبعض النباتات الطبية في بعض الديدان الطفيلية في الفئران المختبرية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بغداد ، العراق:65.

المختار، كواكب عبد الرزاق والعلاف، سهيلة محمود والعطار، عدنان عبد الله (1982).التحضيرات المجهرية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي- جامعة بغداد.

Aalto-Korte, K., Alanko, K., Henriks-Eckerman, M. L., Estlander, T., & Jolanki, R. (2003). Allergic contact dermatitis from bisphenol A in PVC gloves. *Contact Dermatitis*, *49*(4), 202-205.

Abdellatief, R. B., Elgamal, D. A., & Mohamed, E. E. M. (2015). Effects of chronic tramadol administration on testicular tissue in rats: an experimental study. Andrologia, 47(6), 674-679.

Abraham, A., & Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. Reviews on environmental health, 35(2), 201-210.

Abubakar, I. B., Malami, I., Yahaya, Y., & Sule, S. M. (2018). A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Alpinia officinarum* Hance. *Journal of ethnopharmacology*, *224*, 45-62.

Adegoke, E. O., Rahman, M. S., & Pang, M. G. (2020). Bisphenols threaten male reproductive health via testicular cells. Frontiers in Endocrinology, 11, 624.

Agarwal, A., & Prabakaran, S. A. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology.

Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*, *79*(4), 829-843.

Agarwal, A., Sharma, R. K., Nallella, K. P., Thomas Jr, A. J., Alvarez, J. G., & Sikka, S. C. (2006). Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and sterility*, *86*(4), 878-885.

Agarwal, A., Sharma, R., Gupta, S., Harlev, A., Ahmad, G., Du Plessis, S. S., ... & Durairajanayagam, D. (Eds.). (2017). Oxidative stress in human reproduction: shedding light on a complicated phenomenon. Springer.

Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, *32*(1), 1-17.

Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Molecular mechanisms in spermatogenesis, 154-171.

Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., & Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. Reproduction, *Fertility and Development*, *28*(2), 1-10.

Akarca-Dizakar, S. Ö., Erdoğan, D., Peker, T. U. N. C. A. Y., Coşkun Akçay, N., Türkoğlu, İ., Eşmekaya, M. A., & Ömeroğlu, S. (2020). Effects of co-administered melatonin, fructose and bisphenol A (BPA) on rat epididymis and sperm characteristics. *Biotechnic & Histochemistry*, *95*(1), 18-26.

Akbar, S. (2020). Handbook of 200 medicinal plants: a comprehensive review of their traditional medical uses and scientific justifications.

Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R., & Hardy, M. P. (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, *145*(2), 592-603.

Alabi, O. A., Ologbonjaye, K. I., Awosolu, O., & Alalade, O. E. (2019). Public and environmental health effects of plastic wastes disposal: a review. *J Toxicol Risk Assess, 5*(021), 1-13.

Alasmary, F. A., Assirey, E. A., El-Meligy, R. M., Awaad, A. S., El-Sawaf, L. A., Allah, M. M., & Alqasoumi, S. I. (2019). Analysis of Alpina officinarum Hance, chemically and biologically. *Saudi Pharmaceutical Journal, 27*(8), 1107-1112.

Alazouny, Z. M., Mohamed, E. M., & Ahmed, G. A. (2014). Effect of cyclosporine A on the structure of adult albino rat testis and the role of lycopene supplementation: a histological and immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Histology, 37*(2), 292-303.

Alboghobeish, S., Mahdavinia, M., Zeidooni, L., Samimi, A., Oroojan, A. A., Alizadeh, S., ... & Khorsandi, L. (2019). Efficiency of naringin against reproductive toxicity and testicular damages induced by bisphenol A in rats. *Iranian journal of basic medical sciences, 22*(3), 315

Al-Gnami, S. A. L., & Al-Mayali, H. K. A. (2018). Ameliorating effect of allicin on reproductiv e functions in cyclophosphamide treated male rats. *Plant Arch, 18*(1), 415-424.

Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H., & Elbetieha, A. M. (2004). Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *European journal of oral sciences, 112*(3), 267-272.

Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of food biochemistry, 44*(3), e13145.

Alwachi, S. N., Al-Kobaisi, M. F., Mahmoud, F. A., & Zahid, Z. R. (1986). Possible effect of nicotine on the spermatogenesis and testicular activity

of the mature male albino mice. *Journal of Biological Science Research, 17*(3), 185-194.

Amjad, S., Rahman, M. S., & Pang, M. G. (2020). Role of antioxidants in alleviating bisphenol A toxicity. *Biomolecules, 10*(8), 1105.

An, N., Zhang, H. W., Xu, L. Z., Yang, S. L., & Zou, Z. M. (2010). New diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* Hance. *Food chemistry, 119*(2), 513-517.

Anghel, A., Zamfirescu, S., Coprean, D., & Sogorescu, E. (2009). The Effects of cystein, bovine serum albumin and vitamin E on the calitative parameters of frozen-thawed ram semen. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology, 14*(2).

Ashtari, A., Niazvand, F., Chamkouri, N., Mohammadi, A., & Karami, A. B. (2022). The ameliorative effects of *Alpinia officinarum* rhizome hydroalcoholic extract on cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *JBRA Assisted Reproduction*.

Azzouz, A., Rascón, A. J., & Ballesteros, E. (2016). Determination of free and conjugated forms of endocrine-disrupting chemicals in human biological fluids by GC− MS. *Bioanalysis, 8*(11), 1145-1158.

Balcik, O. S., Koroglu, M., Cipil, H., Kaftan, O., Maral, S., Gurel, A., ... & Kosar, A. (2012). A placebo-controlled, randomized, double-blinded, cross-over phase-I clinical study indicating the safety of topical ankaferd hemostat in healthy volunteers. *International Journal of Hematology and Oncology, 32*(1), 267-274.

Bancroft, J. D., Stevens, A., & Turner, R. (1982). Theory and practice of histological techniques. 2nd ed. churchill living stone. New York.

Bebars, N. M. A. E. Z., El Habeby, M. M., Issa, N. M., & El-Dien, N. M. N. (2021). Effect of *Alpinia Officinarum* Rhizome Extract on Fertility and

Sexual Behavior of Adult Male Albino Rats Treated with Sotalol. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine, 84*(1), 2285-2296.

Bestwick, C. S., & Milne, L. (2006). Influence of galangin on HL-60 cell proliferation and survival. *Cancer letters, 243*(1), 80-89.

Biedermann, S., Tschudin, P., & Grob, K. (2010). Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin. *Analytical and bioanalytical chemistry, 398*(1), 571-576.

Brehm, E., & Flaws, J. A. (2019). Transgenerational effects of endocrine-disrupting chemicals on male and female reproduction. *Endocrinology, 160(6), 1421-1435.*

Burtis, C. and Ashood, E. (1999). Text book of clinical chemistry. 3th ed. London (2) Chapter (33): 1145-1150.

Canesi, L., & Fabbri, E. (2015). Environmental effects of BPA: focus on aquatic species. *Dose-Response, 13*(3), 1559325815598304.

Cao, J., Wang, H., Chen, F., Fang, J., Xu, A., Xi, W., ... & Wang, Z. (2016). Galangin inhibits cell invasion by suppressing the epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports, 13*(5), 4238-4244.

Caprio, M., Isidori, A. M., Carta, A. R., Moretti, C., Dufau, M. L., & Fabbri, A. (1999). Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology, 140*(11), 4939-4947.

Castellini, C., Totaro, M., Parisi, A., D'Andrea, S., Lucente, L., Cordeschi, G., ... & Barbonetti, A. (2020). Bisphenol A and male fertility: Myths and realities. *Frontiers in endocrinology*, 11, 353.

Cavalca, V., Cighetti, G., Bamonti, F., Loaldi, A., Bortone, L., Novembrino, C., ... & Guazzi, M. D. (2001). Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clinical chemistry, 47*(5), 887-892.

Chakraborty, P., Mukhopadhyay, M., Sampath, S., Ramaswamy, B. R., Katsoyiannis, A., Cincinelli, A., & Snow, D. (2019a). Organic micropollutants in the surface riverine sediment along the lower stretch of the transboundary river Ganga: Occurrences, sources and ecological risk assessment. *Environmental Pollution*, 249, 1071-1080.

Chakraborty, P., Sampath, S., Mukhopadhyay, M., Selvaraj, S., Bharat, G. K., & Nizzetto, L. (2019b). Baseline investigation on plasticizers, bisphenol A, polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in the surface soil of the informal electronic waste recycling workshops and nearby open dumpsites in Indian metropolitan cities. *Environmental Pollution*, *248*, 1036-1045.

Champroux, A., Cocquet, J., Henry-Berger, J., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2018). A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: paternal epigenetic and transgenerational inheritance. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 50.

Chauhan, A., & Chauhan, V. (2006). Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*, *13*(3), 171-181.

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox biology*, *14*, 450-464.

Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity□ a review. *Environmental science & technology*, *50*(11), 5438-5453.

Chen, F., Yu, J., & He, F. (2012). Analysis of the chemical elements of *Alpinia offtcinarum* Hance from Guangxi. *China Condiment*, (5), 106-108.

Chen, S. J., Allam, J. P., Duan, Y. G., & Haidl, G. (2013). Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Archives of gynecology and obstetrics, 288*(1), 191-199.

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews, 64*(1), 16-64.

Chin, K. Y., Pang, K. L., & Mark-Lee, W. F. (2018). A review on the effects of bisphenol A and its derivatives on skeletal health. *International journal of medical sciences, 15*(10), 1043.

Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Molecular cell, 37*(3), 299-310.

Cho, C. L., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2016). Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology, 18*(2), 186.

Choudhary, R., Chawala, V. K., Soni, N. D., Kumar, J., & Vyas, R. K. (2010). Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. *Pakistan Journal of Physiology, 6*(2), 54-59.

Chouni, A., & Paul, S. (2018). A review on phytochemical and pharmacological potential of *Alpinia galanga*. *Pharmacognosy Journal, 10*(1).

Conlon, J. L. (2017). Diethylstilbestrol: Potential health risks for women exposed in utero and their offspring. *Journal of the American Academy of PAs*, *30*(2), 49-52.

Corrales, J., Kristofco, L. A., Steele, W. B., Yates, B. S., Breed, C. S., Williams, E. S., & Brooks, B. W. (2015). Global assessment of bisphenol A in the environment: review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose-response*, *13*(3), 1559325815598308.

D'Cruz, S. C., Jubendradass, R., Jayakanthan, M., Rani, S. J. A., & Mathur, P. P. (2012). Bisphenol A impairs insulin signaling and glucose homeostasis and decreases steroidogenesis in rat testis: an in vivo and in silico study. *Food and chemical toxicology*, *50*(3-4), 1124-1133.

Dahia, C. L., & Rao, A. J. (2006). Demonstration of follicle-stimulating hormone receptor in cauda epididymis of rat. *Biology of Reproduction*, *75*(1), 98-106.

Darbre, P. D. (2017). Endocrine disruptors and obesity. *Current obesity reports*, *6*, 18-27.

de Lamirande, E., & O'Flaherty, C. (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1784*(1), 106-115.

Devi, K. U., Devi, T. I., & Devi, S. J. (2018). Essential oil content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of two zingiberace plants in the hill of Manipur.

Ding, J., Cheng, Y., Hua, Z., Yuan, C., & Wang, X. (2019). The Effect of dissolved organic matter (DOM) on the release and distribution of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) from sediment under hydrodynamic forces, A Case Study of Bisphenol A (BPA) and

Nonylphenol (NP). *International Journal of Environmental Research and Public Health, 16*(10), 1724.

Ding, P., Yang, L., Feng, C., & Xian, J. C. (2019). Research and application of *Alpinia officinarum* in medicinal field. *Chinese Herbal Medicines, 11*(2), 132-140.

Domínguez-Rebolledo, Á. E., Fernández-Santos, M. R., Bisbal, A., Ros-Santaella, J. L., Ramón, M., Carmona, M., ... & Garde, J. J. (2010). Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. *Reproduction, Fertility and Development*, *22*(5), 856-870.

Dong, G. Z., Lee, S. Y., Zhao, H. Y., Lee, Y. I., Jeong, J. H., Jeon, R., ... & Ryu, J. H. (2015). Diarylheptanoids from lesser galangal suppress human colon cancer cell growth through modulating Wnt/β-catenin pathway. *Journal of functional foods*, *18*, 47-57.

Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Halabi, J., & Tvrda, E. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of assisted reproduction and genetics, 32*(4), 509-520.

Dualde, P., Pardo, O., Corpas-Burgos, F., Kuligowski, J., Gormaz, M., Vento, M., ... & Yusà, V. (2019). Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Science of the total environment*, 668, 797-805.

Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab journal of urology, 17*(2), 87-97.

Dziewirska, E., Hanke, W., & Jurewicz, J. (2018). Environmental non-persistent endocrine-disrupting chemicals exposure and reproductive

hormones levels in adult men. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, *31*(5).

Elobeid, M. A., Almarhoon, Z. M., Virk, P., Hassan, Z. K., Omer, S. A., ElAmin, M., ... & AlOlayan, E. M. (2012). Bisphenol A detection in various brands of drinking bottled water in Riyadh, Saudi Arabia using gas chromatography/mass spectrometer. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *11*(3), 455-459.

Ermler, S., Scholze, M., & Kortenkamp, A. (2011). The suitability of concentration addition for predicting the effects of multi-component mixtures of up to 17 anti-androgens with varied structural features in an in vitro AR antagonist assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *257*(2), 189-197.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*, *11*(1), 81-128.

Esteves, S. C. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *International Braz j Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, *28*(5), 484-485.

Eumkeb, G., Sakdarat, S., & Siriwong, S. (2010). Reversing β-lactam antibiotic resistance of Staphylococcus aureus with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine*, *18*(1), 40-45.

Experts, I. (2016). Bisphenol-A-a global market overview. Columbus, OH: Hexion Inc.

Farmer, E. E., & Davoine, C. (2007). Reactive electrophile species. *Current opinion in plant biology*, *10*(4), 380-386.

Fenichel, P., Chevalier, N., & Brucker-Davis, F. (2013). Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor. *In Annales d'endocrinologie*, 74, 3, 211-220. Elsevier Masson.

Fitzgerald, A. C., Peyton, C., Dong, J., & Thomas, P. (2015). Bisphenol A and related alkylphenols exert nongenomic estrogenic actions through a G protein-coupled estrogen receptor 1 (Gper)/epidermal growth factor receptor (Egfr) pathway to inhibit meiotic maturation of zebrafish oocytes. *Biology of reproduction*, *93*(6), 135-1.

Fowler, P. A., Bellingham, M., Sinclair, K. D., Evans, N. P., Pocar, P., Fischer, B., ... & O'Shaughnessy, P. J. (2012). Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Molecular and cellular endocrinology*, *355*(2), 231-239.

Galigher, A. and Kozloff, E. (1964). Essential practical microtechnique. 2nd ed.

Gao, H., Yang, B. J., Li, N., Feng, L. M., Shi, X. Y., Zhao, W. H., & Liu, S. J. (2015a). Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. *Medicine, 94*(1).

Gao, Y., Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015b). Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis–a mechanistic and therapeutic insight. *Expert opinion on therapeutic targets*, *19*(8), 1073-1090.

Gao, Z. H., Chen, Y. F., Yang, Q., & Jiang, M. W. (2016). Research progress of Rhizoma *Alpinia officinarum*. Journal of Guangdong College of Pharmacy, 32(6,(818–820.

Gayrard, V., Lacroix, M. Z., Collet, S. H., Viguié, C., Bousquet-Melou, A., Toutain, P. L., & Picard-Hagen, N. (2013). High bioavailability of bisphenol A from sublingual exposure. *Environmental health perspectives*, *121*(8), 951-956.

Geens, T., Roosens, L., Neels, H., & Covaci, A. (2009). Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere, 76*(6), 755-760.

Gharagozloo, P., & Aitken, R. J. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human reproduction, 26*(7), 1628-1640.

Giagulli, V. A., Kaufman, J. M., & Vermeulen, A. (1994). Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 79*(4), 997-1000.

Go, Y. M., & Jones, D. P. (2014). Redox biology: interface of the exposome with the proteome, epigenome and genome. *Redox biology, 2*, 358-360.

Go, Y. M., Chandler, J. D., & Jones, D. P. (2015). *The cysteine proteome. Free Radical Biology and Medicine, 84*, 227-245.

Gomes, M. L., Monteiro, J. C., Freitas, K. M., Sbervelheri, M. M., & Dolder, H. (2011). Association of the infusion of Heteropterys aphrodisiaca and endurance training brings spermatogenetic advantages. *Biological Research, 44*(3), 235-241.

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., ... & Zoeller, R. T. (2015b). EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine reviews, 36*(6), E1-E150.

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., ... & Zoeller, R. T. (2015a). Executive summary to EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine reviews, 36*(6), 593.

Grami, D., Rtibi, K., Hammami, I., Selmi, S., De Toni, L., Foresta, C., ... & Sebai, H. (2020). Protective action of Eruca sativa leaves aqueous

extracts against bisphenol a-caused in vivo testicular damages. *Journal of medicinal food*, *23*(6), 600-610.

Graziani, N. S., Carreras, H., & Wannaz, E. (2019). Atmospheric levels of BPA associated with particulate matter in an urban environment. *Heliyon*, *5*(4), e01419.

Guha, G., Rajkumar, V., Ashok Kumar, R., & Mathew, L. (2011). Therapeutic potential of polar and non-polar extracts of Cyanthillium cinereum in vitro. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2011.

Guignard, D., Gauderat, G., Gayrard, V., Lacroix, M. Z., Picard-Hagen, N., Puel, S., ... & Viguié, C. (2016). Characterization of the contribution of buccal absorption to internal exposure to bisphenol A through the diet. *Food and Chemical Toxicology*, *93*, 82-88.

Guo, A. J., Xie, H. Q., Choi, R. C., Zheng, K. Y., Bi, C. W., Xu, S. L., ... & Tsim, K. W. (2010). Galangin, a flavonol derived from Rhizoma *Alpinia Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. *Chemico-biological interactions*, *187*(1-3), 246-248.

Gupta, A. K., & Tandon, N. (2004). Reviews on Indian medicinal plants. *Indian council of medical research, New Delhi 2004; 1*:196-197.

Gurmeet, K. S. S., Rosnah, I., Normadiah, M. K., Das, S., & Mustafa, A. M. (2014). Detrimental effects of bisphenol A on development and functions of the male reproductive system in experimental rats. *EXCLI journal*, *13*, 151.

Ha, T. K., Kim, M. E., Yoon, J. H., Bae, S. J., Yeom, J., & Lee, J. S. (2013). Galangin induces human colon cancer cell death via the mitochondrial dysfunction and caspase-dependent pathway. *Experimental biology and medicine*, *238*(9), 1047-1054.

Habsah, M., Amran, M., Mackeen, M. M., Lajis, N. H., Kikuzaki, H., Nakatani, N., ... & Ali, A. M. (2000). Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of ethnopharmacology, 72*(3), 403-410.

Hadwan, M. H., & kadhum Ali, S. (2018). New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. *Analytical biochemistry, 542*, 29-33.

Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., ... & Reshi, M. S. (2022). Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives. *Cells, 11*(3), 552.

Hales, D. B., Allen, J. A., Shankara, T., Janus, P., Buck, S., Diemer, T., & Hales, K. H. (2005). Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1061*(1), 120-134.

Hampl, R., Drábková, P., Kanďár, R., & Stěpán, J. (2012). Impact of oxidative stress on male infertility. *Ceska gynekologie, 77*(3), 241-245.

Hanaoka, T., Kawamura, N., Hara, K., & Tsugane, S. (2002). Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occupational and environmental medicine, 59*(9), 625-628.

Hancock, J. L. (1951). A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature, 167*, 323-324.

Hanioka, N., Naito, T., & Narimatsu, S. (2008). Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation. *Chemosphere, 74*(1), 33-36.

Harborne, J. B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry, 1*, 1-28.

Harborne, J. B. (1984). Phenolic compounds. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, 37-99.

Hass, U., Christiansen, S., Boberg, J., Rasmussen, M. G., Mandrup, K., & Axelstad, M. (2016). Low-dose effect of developmental bisphenol A exposure on sperm count and behaviour in rats. *Andrology*, *4*(4), 594-607.

Heidari, H., Abdollahi, M., Khani, S., Nojavan, F., & Khani, S. (2021). Effect of *Alpinia officinarum* extract on reproductive damages in streptozotocin induced diabetic male rats. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, *20*(1), 77-85.

Heinälä, M., Ylinen, K., Tuomi, T., Santonen, T., & Porras, S. P. (2017). Assessment of occupational exposure to bisphenol A in five different production companies in Finland. *Annals of work exposures and health*, *61*(1), 44-55.

Henkel, R. R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology*, *13*(1), 43.

Hines, C. J., Christianson, A. L., Jackson, M. V., Ye, X., Pretty, J. R., Arnold, J. E., & Calafat, A. M. (2018). An evaluation of the relationship among urine, air, and hand measures of exposure to bisphenol A (BPA) in US manufacturing workers. *Annals of work exposures and health*, *62*(7), 840-851.

Hines, C. J., Jackson, M. V., Christianson, A. L., Clark, J. C., Arnold, J. E., Pretty, J. R., & Deddens, J. A. (2017). Air, hand wipe, and surface wipe sampling for Bisphenol A (BPA) among workers in industries that manufacture and use BPA in the United States. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, *14*(11), 882-897.

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).

Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Gargano, M., & Cao, J. (1998). The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environmental health perspectives, 106*(suppl 5), 1219-1228.

Honmore, V. S., Rojatkar, S. R., Nawale, L. U., Arkile, M. A., Khedkar, V. M., Natu, A. D., & Sarkar, D. (2016). In vitro and ex vivo antitubercular activity of diarylheptanoids from the rhizomes of *Alpinia officinarum* Hance. *Natural Product Research, 30*(24), 2825-2830.

Hoque, E., Sujan, K. M., Haque, M. I., Mustary, A., Miah, M. A., Hossain, M. M., & Islam, M. K. (2019). Evaluation of bisphenol a induced effects on blood bio-chemical constituents and histo-structure of liver in Swiss albino mice and its 'one health'perspectives. *J Vet Med One Heal Res, 1*, 75-83.

Hormann, A. M., Vom Saal, F. S., Nagel, S. C., Stahlhut, R. W., Moyer, C. L., Ellersieck, M. R., ... & Taylor, J. A. (2014). Holding thermal receipt paper and eating food after using hand sanitizer results in high serum bioactive and urine total levels of bisphenol A (BPA). *PloS one, 9*(10), e110509.

Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Hartig, P. C., Ankley, G. T., ... & Gray, L. E. (2008). Fifteen years after "Wingspread"—environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicological Sciences, 105*(2), 235-259.

Houston, B. J., Nixon, B., King, B. V., De Iuliis, G. N., & Aitken, R. J. (2016). The effects of radiofrequency electromagnetic radiation on sperm function. *Reproduction, 152*(6), R263-R276.

Huang, M., Liu, S., Fu, L., Jiang, X., & Yang, M. (2020). Bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce oxidative stress and biomacromolecular damage in human granulosa KGN cells. *Chemosphere, 253*, 126707.

Huang, X., Tang, G., Liao, Y., Zhuang, X., Dong, X., Liu, H., ... & Shi, L. (2016). 7-(4-Hydroxyphenyl)-1-phenyl-4E-hepten-3-one, a Diarylheptanoid from *Alpinia officinarum*, Protects Neurons against Amyloid-β Induced Toxicity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, b16-00411.

Huo, S. X. (2013). Spectrum-effect relasionship of extract from rhizome of *Alpinia officinarum* on promotion of melanogenesis. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 995-1002.

Huo, S. X., Liu, X. M., Ge, C. H., Gao, L., Peng, X. M., Zhao, P. P., & Yan, M. (2014). The effects of galangin on a mouse model of vitiligo induced by hydroquinone. *Phytotherapy research, 28*(10), 1533-1538.

Huo, X., Chen, D., He, Y., Zhu, W., Zhou, W., & Zhang, J. (2015). Bisphenol-A and female infertility: a possible role of gene-environment interactions. *International journal of environmental research and public health, 12*(9), 11101-11116.

Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. Oxidative medicine and cellular longevity, 2016.

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase

(GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine, 54*(4), 287-293.

Inadera, H. (2015). Neurological effects of bisphenol A and its analogues. *International journal of medical sciences, 12*(12), 926.

Indrayan, A. K., Agrawal, P., Rathi, A. K., Shatru, A., Agrawal, N. K., & Tyagi, D. K. (2009). Nutritive value of some indigenous plant rhizomes resembling Ginger.

Jahan, S., Ain, Q. U., & Ullah, H. (2016). Therapeutic effects of quercetin against bisphenol A induced testicular damage in male Sprague Dawley rats. *Systems biology in reproductive medicine, 62*(2), 114-124.

Ješeta, M., Crha, T., Žáková, J., & Ventruba, P. (2019a). Bisphenols in the pathology of reproduction. *Ceska Gynekologie, 84*(2), 161-165.

Jeseta, M., Moravec, J., Zakova, J., Nevoral, J., Lousová, E., Crha, I., & Ventruba, P. (2019b). Bisphenol S content in human follicular fluid and its effect on IVF outcomes. *In Human Reproduction, 34*, 240-240. Great Clarendon St, Oxford Ox2 6dp, England: Oxford Univ Press.

Ješeta, M., Navrátilová, J., Franzová, K., Fialková, S., Kempisty, B., Ventruba, P., ... & Crha, I. (2021). Overview of the mechanisms of action of selected bisphenols and perfluoroalkyl chemicals on the male reproductive axes. *Frontiers in Genetics*, *12*.

Jin, P., Wang, X., Chang, F., Bai, Y., Li, Y., Zhou, R., & Chen, L. (2013). Low dose bisphenol A impairs spermatogenesis by suppressing reproductive hormone production and promoting germ cell apoptosis in adult rats. *Journal of biomedical research, 27*(2), 135.

Jo, C., & Ahn, D. U. (1998). Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poultry science, 77*(3), 475-480.

Joskow, R., Barr, D. B., Barr, J. R., Calafat, A. M., Needham, L. L., & Rubin, C. (2006). Exposure to bisphenol A from bis-glycidyl dimethacrylate–based dental sealants. *The Journal of the American Dental Association, 137*(3), 353-362.

Kamel, A. H., Foaud, M. A., & Moussa, H. M. (2018). The adverse effects of bisphenol A on male albino rats. *The Journal of Basic and Applied Zoology, 79*(1), 1-9.

Kaneko, T., Iuchi, Y., Kobayashi, T., Fujii, T., Saito, H., Kurachi, H., & Fujii, J. (2002). The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *European Journal of Biochemistry, 269*(5), 1570-1578.

Kang, J. H., Aasi, D., & Katayama, Y. (2007). Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical reviews in toxicology, 37*(7), 607-625.

Karrer, C., Roiss, T., von Goetz, N., Gramec Skledar, D., Peterlin Mašič, L., & Hungerbühler, K. (2018). Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of the bisphenols BPA, BPS, BPF, and BPAF with new experimental metabolic parameters: comparing the pharmacokinetic behavior of BPA with its substitutes. *Environmental health perspectives, 126*(7), 077002.

Kaur, S., & Sadwal, S. (2020). Studies on the phytomodulatory potential of fenugreek (Trigonella foenum-graecum) on bisphenol-A induced testicular damage in mice. *Andrologia, 52*(2), e13492.

Kaushik, D., Yadav, J., Kaushik, P., Sacher, D., & Rani, R. (2011). Current pharmacological and phytochemical studies of the plant *Alpinia galanga*. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 9*(10), 1061-1065.

Kazemi, S., Bahramifar, N., Moghadamnia, A. A., & Jorsarae, S. G. A. (2016). Detection of bisphenol A and nonylphenol in rat's blood serum, tissue and impact on reproductive system. *Electronic Physician, 8*(8), 2772.

Khan, N. G., Correia, J., Adiga, D., Rai, P. S., Dsouza, H. S., Chakrabarty, S., & Kabekkodu, S. P. (2021). A comprehensive review on the carcinogenic potential of bisphenol A: clues and evidence. *Environmental Science and Pollution Research, 28*(16), 19643-19663.

Kiuchi, F., Iwakami, S., Shibuya, M., Hanaoka, F., & Sankawa, U. (1992). Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chemical and Pharmaceutical bulletin, 40*(2), 387-391.

Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M., & Hocevar, B. A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic pathology, 38*(1), 96-109.

Kolangi, F., Shafi, H., Memariani, Z., Kamalinejad, M., Bioos, S., Jorsaraei, S. G. A., ... & Mozaffarpur, S. A. (2019). Effect of *Alpinia officinarum* Hance rhizome extract on spermatogram factors in men with idiopathic infertility: A prospective double-blinded randomised clinical trial. *Andrologia, 51*(1), e13172.

Kolangi, F., Shafi, H., Memariani, Z., Kamalinejad, M., Bioos, S., Jorsaraei, S. G. A., ... & Mozaffarpur, S. A. (2019). Effect of *Alpinia officinarum* Hance rhizome extract on spermatogram factors in men with idiopathic infertility: A prospective double-blinded randomised clinical trial. *Andrologia, 51*(1), e13172.

Konno, K., Miura, M., Toriyama, M., Motohashi, S., Sawamura, R., Watanabe, W., ... & Kurokawa, M. (2013). Antiviral activity of

diarylheptanoid stereoisomers against respiratory syncytial virus in vitro and in vivo. *Journal of natural medicines, 67*(4), 773-781.

Konno, K., Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W., ... & Kurokawa, M. (2011). Antiviral activities of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum* against respiratory syncytial virus, poliovirus, measles virus, and herpes simplex virus type 1 in vitro. *Natural product communications, 6*(12), 1934578X1100601222.

Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of biological chemistry, 257*(10), 5751-5754.

Korkmaz, A., Ahbab, M. A., Kolankaya, D., & Barlas, N. (2010). Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food and Chemical Toxicology, 48*(10), 2865-2871.

Kosar, A., Cipil, H. S., Kaya, A., Uz, B., Haznedaroglu, I. C., Goker, H., ... & Firat, H. C. (2009). The efficacy of Ankaferd Blood Stopper in antithrombotic drug-induced primary and secondary hemostatic abnormalities of a rat-bleeding model. *Blood coagulation & fibrinolysis, 20*(3), 185-190.

Köse, L. P., Gülcin, I., Gören, A. C., Namiesnik, J., Martinez-Ayala, A. L., & Gorinstein, S. (2015). LC–MS/MS analysis, antioxidant and anticholinergic properties of galanga (*Alpinia officinarum* Hance) rhizomes. *Industrial crops and products, 74*, 712-721.

Kubwabo, C., Kosarac, I., Stewart, B., Gauthier, B. R., Lalonde, K., & Lalonde, P. J. (2009). Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Additives and Contaminants, 26*(6), 928-937.

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2015). Free radicals: health implications and their mitigation by herbals. *British Journal of Medicine and Medical Research*, *7*(6), 438-457.

Kurutas, E. B. (2015). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, *15*(1), 1-22.

Labbé, C., Robles, V., & Herraez, M. P. (2017). Epigenetics in fish gametes and early embryo. *Aquaculture*, *472*, 93-106.

Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S. M., Belzunces, L. P., Emond, C., Guerbet, M., & Rousselle, C. (2015). Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health*, *14*(1), 1-15.

Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama*, *300*(11), 1303-1310.

Le, H. H., Carlson, E. M., Chua, J. P., & Belcher, S. M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology letters*, *176*(2), 149-156.

Lee, H. J., Chattopadhyay, S., Gong, E. Y., Ahn, R. S., & Lee, K. (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Sciences*, *75*(1), 40-46.

Leemans, M., Couderq, S., Demeneix, B., & Fini, J. B. (2019). Pesticides with potential thyroid hormone-disrupting effects: a review of recent data. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 743.

Lehmler, H. J., Liu, B., Gadogbe, M., & Bao, W. (2018). Exposure to bisphenol A, bisphenol F, and bisphenol S in US adults and children: The national health and nutrition examination survey 2013–2014. *ACS omega*, *3*(6), 6523-6532.

Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, *125*(2), 288-306.

Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., ... & Swan, S. H. (2017). Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human reproduction update*, *23*(6), 646-659.

Li, D. K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Qing, D., Wu, T., ... & Yuan, W. (2010). Relationship between urine bisphenol-A level and declining male sexual function. *Journal of andrology*, *31*(5), 500-506.

Li, H. F., Li, Y. H., Wang, Y., Wei, N., Tan, Y. F., & Zhang, J. Q. (2014). Advances in studies on chemical constituents in *Alpiniae officinarum* rhizoma and their pharmacological activities. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Form*, *20*, 236-244.

Li, M. W., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2009). Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics?. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *41*(11), 2302-2314.

Li, S., Wu, C., Zhu, L., Gao, J., Fang, J., Li, D., ... & Yang, H. (2012). By improving regional cortical blood flow, attenuating mitochondrial dysfunction and sequential apoptosis galangin acts as a potential neuroprotective agent after acute ischemic stroke. *Molecules*, *17*(11), 13403-13423.

Li, X., Wen, Z., Wang, Y., Mo, J., Zhong, Y., & Ge, R. S. (2020). Bisphenols and Leydig cell development and function. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 447.

Lim, T. K. (2016). *Alpinia officinarum*. *In Edible medicinal and non-medicinal plants* , 178-195. Springer, Cham.

Liu, H. H., Shih, T. S., Chen, I. J., & Chen, H. L. (2008). Lipid peroxidation and oxidative status compared in workers at a bottom ash recovery plant and fly ash treatment plants. *Journal of Occupational Health*, *50*(6), 492-497.

Liu, J. X., Sun, Y. H., & Li, C. P. (2015b). Volatile oils of Chinese crude medicines exhibit antiparasitic activity against human Demodex with no adverse effects in vivo. *Experimental and Therapeutic Medicine, 9*(4), 1304-1308.

Liu, J., & Martin, J. W. (2017). Prolonged exposure to bisphenol A from single dermal contact events. *Environmental Science & Technology, 51*(17), 9940-9949.

Liu, X., Wang, Z., & Liu, F. (2021). Chronic exposure of BPA impairs male germ cell proliferation and induces lower sperm quality in male mice. *Chemosphere, 262*, 127880.

Liu, Y. N., Zha, W. J., Ma, Y., Chen, F. F., Zhu, W., Ge, A., ... & Huang, M. (2015a). Galangin attenuates airway remodelling by inhibiting TGF-β1-mediated ROS generation and MAPK/Akt phosphorylation in asthma. *Scientific Reports*, *5*(1), 1-13.

Liu, Y., Wang, Z., & Zhang, J. (2015c). Dietary Chinese Herbs. Springer2015, 61-67.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, *4*(8), 118.

Loganathan, S. N., & Kannan, K. (2011). Occurrence of bisphenol A in indoor dust from two locations in the eastern United States and implications for human exposures. A*rchives of environmental contamination and toxicology*, *61*(1), 68-73.

Lombó, M., Fernández-Díez, C., González-Rojo, S., & Herráez, M. P. (2019). Genetic and epigenetic alterations induced by bisphenol A exposure during different periods of spermatogenesis: from spermatozoa to the progeny. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-13.

Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.

Lušin, T. T., Roškar, R., & Mrhar, A. (2012). Evaluation of bisphenol A glucuronidation according to UGT1A1* 28 polymorphism by a new LC–MS/MS assay. *Toxicology*, *292*(1), 33-41.

Ly, C., Yockell-Lelievre, J., Ferraro, Z. M., Arnason, J. T., Ferrier, J., & Gruslin, A. (2015). The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development. *Human reproduction update*, *21*(2), 228-248.

Ma, Y. L., Zhao, F., Yin, J. T., Liang, C. J., Niu, X. L., Qiu, Z. H., & Zhang, L. T. (2019). Two approaches for evaluating the effects of galangin on the activities and mrna expression of seven cyp450. *Molecules*, *24*(6), 1171.

Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., ... & Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental research*, *176*, 108575.

Maamar, M. B., Lesné, L., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Lassurguère, J., Lavoué, V., ... & Jégou, B. (2015). An investigation of the endocrine-disruptive effects of bisphenol a in human and rat fetal testes. *PLoS One, 10*(2), e0117226.

Madhukar, D., & Rajender, S. (2009). Hormonal treatment of male infertility: promises and pitfalls. *Journal of Andrology, 30*(2), 95-112.

Manfo, F. P. T., Jubendradass, R., Nantia, E. A., Moundipa, P. F., & Mathur, P. P. (2014). Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 228*, 57-82.

Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, *47*(3), 469-474.

Martens, J. H., Rao, N. A., & Stunnenberg, H. G. (2011). Genome-wide interplay of nuclear receptors with the epigenome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1812*(8), 818-823.

Martin, L. J., & Touaibia, M. (2020). Improvement of testicular steroidogenesis using flavonoids and isoflavonoids for prevention of late-onset male hypogonadism. *Antioxidants*, *9*(3), 237.

Martínez-Luna, G., Castillo-Cadena, J., & Serment-Guerrero, J. H. (2015). Modified procedure to assess dna breakage in spermatozoa by means of the comet assay. *Revista internacional de contaminación ambiental*, *31*(1), 39-45.

Masuno, H., Kidani, T., Sekiya, K., Sakayama, K., Shiosaka, T., Yamamoto, H., & Honda, K. (2002). Bisphenol A in combination with insulin can

accelerate the conversion of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. *Journal of lipid research*, *43*(5), 676-684.

Matsuda, H., Nakashima, S., Oda, Y., Nakamura, S., & Yoshikawa, M. (2009). Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(16), 6048-6053.

Matthews, J. B., Twomey, K., & Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β. *Chemical research in toxicology*, *14*(2), 149-157.

Mazaheri, M., Shahdadi, V., & Boron, A. N. (2014). Molecullar and biochemical effect of alcohlic extract of *Alpinia galanga* on rat spermatogenesis process. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, *12*(11), 765.

Meeker, J. D., Ehrlich, S., Toth, T. L., Wright, D. L., Calafat, A. M., Trisini, A. T., ... & Hauser, R. (2010). Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reproductive toxicology*, *30*(4), 532-539.

Merker, H. J., Günther, T., Höllriegl, V., Vormann, J., & Schümann, K. (1996). Lipid peroxidation and morphology of rat testis in magnesium deficiency. *Andrologia*, *28*(1), 43-51.

Moghaddam, H. S., Samarghandian, S., & Farkhondeh, T. (2015). Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicology mechanisms and methods*, *25*(7), 507-513.

Mohapatra, D. P., Brar, S. K., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Physico-chemical pre-treatment and biotransformation of wastewater and wastewater Sludge–Fate of bisphenol A. *Chemosphere, 78*(8), 923-941.

Molayi-Jabdaragi, N., Esmaeilnejad, B., & Mohammadi, V. (2020). Evaluation of oxidative/nitrosative stress biomarkers and DNA damage in buffaloes naturally infected with Theileria annulata. *Microbial Pathogenesis, 138*, 103821.

Munir, B., Qadir, A., & Tahir, M. (2017). Negative effects of bisphenol A on testicular functions in albino rats and their abolitions with Tribulus terristeris L. *Brazilian journal of pharmaceutical Sciences, 53*.

Muratori, M., Tamburrino, L., Marchiani, S., Cambi, M., Olivito, B., Azzari, C., ... & Baldi, E. (2015). Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Molecular medicine, 21*(1), 109-122.

Murray, T. J., Yang, X., & Sherr, D. H. (2006). Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A. *Breast Cancer Research, 8*(2), 1-12.

Naciff, J. M., Hess, K. A., Overmann, G. J., Torontali, S. M., Carr, G. J., Tiesman, J. P., ... & Daston, G. P. (2005). Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17α-ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. *Toxicological Sciences, 86*(2), 396-416.

Nair, N., Bedwal, R. S., & Mathur, R. S. (1995). Effect of adrenalectomy and adrenalectomy+ hydrocortisone treatment on histopathological, biochemical and zinc and copper profiles in rat testes. *Indian Journal of Experimental Biology, 33*(9), 655-663.

Nair, N., Bedwal, R. S., & Mathur, R. S. (2002). Effect of adrenalectomy on rat epididymidis. *Asian journal of andrology, 4*(4), 273-279.

Najeeb, Q., Bhaskar, N., Masood, I., Wadhwa, S., Kaur, H., & Ishaq, S. (2012). Malondialdehyde (MDA) Superoxide dismutase (SOD) levels-distinguishing parameters betweenbenign malignant pleural effusions. *Free Radicals and Antioxidants, 2*(2), 8-11.

Nanjappa, M. K., Simon, L., & Akingbemi, B. T. (2012). The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biology of reproduction*, *86(*5), 135-1.

Negm, S. H., & Ragheb, E. M. (2019). Effect of (*Alpinia officinarum*) hance on sex hormones and certain biochemical parameters of adult male experimental rats. *Journal of Food and Dairy Sciences, 10*(9), 315-322.

Niki, E. (1993). Antioxidant defenses in eukariotic cells: an overview. Free radicals: from basic science to medicine, 365-373.

Ning, A. (2006). Studies on the Chemical Constituents of *Alpinia officinarum* Hance and Studies on the Lipophilic Chemical Constituents of Euphorbia soongarica Boiss [D].

Noguchi, N., Watanabe, A., & Shi, H. (2000). Diverse functions of antioxidants. *Free radical research, 33*(6), 809-817.

Nuñez, P., Arguelles, J., & Perillan, C. (2021). Chronic exposure to low doses of bisphenol A alters hydromineral responses in rats. *Appetite, 167*, 105594.

Ohlstein, J. F., Strong, A. L., McLachlan, J. A., Gimble, J. M., Burow, M. E., & Bunnell, B. A. (2014). Bisphenol A enhances adipogenic differentiation of human adipose stromal/stem cells. *Journal of molecular endocrinology*, *53*(3), 345.

Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, *1*(1), 23-29.

Olukole, S. G., Lanipekun, D. O., Ola-Davies, E. O., & Oke, B. O. (2019). Maternal exposure to environmentally relevant doses of bisphenol A causes reproductive dysfunction in F1 adult male rats: protective role of melatonin. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*, 28940-28950.

Omran, G. A., Gaber, H. D., Mostafa, N. A. M., Abdel-Gaber, R. M., & Salah, E. A. (2018). Potential hazards of bisphenol A exposure to semen quality and sperm DNA integrity among infertile men. *Reproductive Toxicology*, *81*, 188-195.

Ooi, A., Wong, A., Esau, L., Lemtiri-Chlieh, F., & Gehring, C. (2016). A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization. *Frontiers in physiology*, *7*, 300.

Oršolić, N., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Đikić, D., Prskalo, Z. Š., & Sirovina, D. (2011). DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *European journal of pharmacology*, *656*(1-3), 110-118.

Ouattrocchi, U. (2000). CRC World Dictionary of Plant Names. 1: A-C, London, CRC Press.

Öztaş, E., Yılmaz, T. E., Güzel, E., Sezer, Z., Okyar, A., & Özhan, G. (2019). Gliclazide alone or in combination with atorvastatin ameliorated reproductive damage in streptozotocin-induced type 2 diabetic male rats. *Saudi pharmaceutical journal*, *27*(3), 422-431.

Pan, D., Feng, D., Ding, H., Zheng, X., Ma, Z., Yang, B., & Xie, M. (2020). Effects of bisphenol A exposure on DNA integrity and protamination of mouse spermatozoa. *Andrology*, *8*(2), 486-496.

Paoli, D., Pecora, G., Pallotti, F., Faja, F., Pelloni, M., Lenzi, A., & Lombardo, F. (2019). Cytological and molecular aspects of the ageing sperm. *Human Reproduction*, *34*(2), 218-227.

Patel, A. S., Leong, J. Y., Ramos, L., & Ramasamy, R. (2019). Testosterone is a contraceptive and should not be used in men who desire fertility. *The world journal of men's health*, *37*(1), 45-54.

Pelletier, G., Labrie, C., & Labrie, F. (2000). Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*, *165*(2), 359-370.

Peretz, J., Vrooman, L., Ricke, W. A., Hunt, P. A., Ehrlich, S., Hauser, R., ... & Flaws, J. A. (2014). Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007–2013. *Environmental health perspectives*, *122*(8), 775-786.

Pirzadeh, M., Barary, M., Hosseini, S. M., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2021). Ameliorative effect of *Alpinia officinarum* Hance extract on nonylphenol-induced reproductive toxicity in male rats. *Andrologia*, *53*(6), e14063.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017.

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, *88*(4), 1243-1276.

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, *88*(4), 1243-1276.

Pramodh, S. (2021). Male Infertility Management with Alternative Medicine: Promises, Practice, and Perspectives–Treatment of Male Infertility Using Plant-Based Alternative Medicine. *In Treating Endocrine and Metabolic Disorders With Herbal Medicines*, 164-186. IGI Global.

Presnell, J. K., Schreibman, M. P., & Humason, G. L. (1997). Humason's animal tissue techniques. Johns Hopkins University Press.

Prins, G. S., Hu, W. Y., Shi, G. B., Hu, D. P., Majumdar, S., Li, G., ... & van Breemen, R. B. (2014). Bisphenol A promotes human prostate stem-progenitor cell self-renewal and increases in vivo carcinogenesis in human prostate epithelium. *Endocrinology, 155*(3), 805-817.

Qian, W., Zhu, J., Mao, C., Liu, J., Wang, Y., Wang, Q., ... & Wang, J. (2014). Involvement of CaM-CaMKII-ERK in bisphenol A-induced Sertoli cell apoptosis. *Toxicology, 324*, 27-34.

Qiu, L. L., Wang, X., Zhang, X. H., Zhang, Z., Gu, J., Liu, L., ... & Wang, S. L. (2013). Decreased androgen receptor expression may contribute to spermatogenesis failure in rats exposed to low concentration of bisphenol A. *Toxicology letters, 219*(2), 116-124.

Qu, J. H., Hong, X., Chen, J. F., Wang, Y. B., Sun, H., Xu, X. L., ... & Wang, X. R. (2008). Fenvalerate inhibits progesterone production through cAMP-dependent signal pathway. *Toxicology letters, 176*(1), 31-39.

Qureshi, S., Shah, A. H., & Ageel, A. M. (1992). Toxicity studies on *Alpinia galanga* and Curcuma longa. *Planta medica, 58*(02), 124-127.

Rabeh, N. M. (2016). Effect of Halawa Tahinia Alone or with Ginger and Cinnamon on Sex Hormones in Adult Male Rats. *International Journal of Nutrition and Food Sciences, 5*(3), 211-219.

Radke, E. G., Braun, J. M., Meeker, J. D., & Cooper, G. S. (2018). Phthalate exposure and male reproductive outcomes: a systematic review of the human epidemiological evidence. *Environment international*, *121*, 764-793.

Rahman, M. S., Kwon, W. S., Yoon, S. J., Park, Y. J., Ryu, B. Y., & Pang, M. G. (2016). A novel approach to assessing bisphenol-A hazards using an in vitro model system. *Bmc Genomics*, *17*(1), 1-12.

Rajesh, I., Singh, M., Maheshwara, A. J. V. U., & Prathyusha, M. (2013). Hepatoprotective effect of *Alpinia officinarum* on hepatic ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Am J PharmTech Res*, *3*, 2249-4.

Rana, V. S., Verdeguer, M., & Blazquez, M. A. (2010). GC and GC/MS analysis of the volatile constituents of the oils of *Alpinia galanga* (L.) Willd and *A. officinarum* Hance rhizomes. *Journal of Essential Oil Research*, *22*(6), 521-524.

Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E., & Flaws, J. A. (2017). Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *Journal of Endocrinology*, *233*(3), R109-R129.

Rehman, S., Usman, Z., Rehman, S., AlDraihem, M., Rehman, N., Rehman, I., & Ahmad, G. (2018). Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. Translational andrology and urology, 7(3), 490.

Reid, K., Wright, V., & Omoregie, S. (2016). Anticancer properties of *Alpinia officinarum* (lesser galangal)–A mini review. *Int J Adv Res*, *4*, 300-6.

Rengan, A. K., Agarwal, A., van der Linde, M., & du Plessis, S. S. (2012). An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *10*(1), 1-8.

Ribas-Maynou, J., & Benet, J. (2019). Single and double strand sperm DNA damage: different reproductive effects on male fertility. *Genes*, *10*(2), 105.

Ross, M.H., Kaye, G.I., & Pawlina, C.W. (2003). Histology: A text and atlas. 4th ed. LWW. 682-724.

Roy, S., Rahaman, N., Ahmed, F., Metya, S., & Sannigrahi, S. (2013). Naringenin attenuates testicular damage, germ cell death and oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: naringenin prevents diabetic rat testicular damage. *Journal of Applied Biomedicine*, *11*(3), 195-208.

Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *127*(1-2), 27-34.

Russell, L. D., & de França, L. R. (1995). Building a testis. *Tissue and Cell*, *27*(2), 129-147.

Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., & Talebi, A. R. (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, *14*(4), 231.

Sadeghzadeh, M., Shirpoor, A., Naderi, R., Kheradmand, F., Gharalari, F. H., Samadi, M., ... & Gharaaghaji, R. (2019). Long-term ethanol consumption promotes changes in β-defensin isoform gene expression and induces structural changes and oxidative DNA damage to the

epididymis of rats. *Molecular Reproduction and Development, 86*(6), 624-631.

Sahu, C., Charaya, A., Singla, S., Dwivedi, D. K., & Jena, G. (2020). Zinc deficient diet increases the toxicity of bisphenol A in rat testis. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *34*(10), e22549.

Sakamoto, J., & Hashimoto, K. (1986). Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice—effects on fertility and sperm morphology. *Archives of toxicology*, *59*, 201-205.

Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., ... & Tohyama, C. (2001). Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *Journal of occupational health*, *43*(4), 185-190.

Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R., & Thomas Jr, A. J. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and sterility*, *78*(3), 491-499.

Salian, S., Doshi, T., & Vanage, G. (2009). Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, *265*(1-2), 56-67.

Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology*, *2*(1), 1-7.

Santhi, V. A., Sakai, N., Ahmad, E. D., & Mustafa, A. M. (2012). Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water. *Science of the Total Environment*, *427*, 332-338.

Sasso, A. F., Pirow, R., Andra, S. S., Church, R., Nachman, R. M., Linke, S., ... & Birnbaum, L. S. (2020). Pharmacokinetics of bisphenol A in

humans following dermal administration. *Environment International, 144*, 106031.

Sawamura, R., Shimizu, T., Sun, Y., Yasukawa, K., Miura, M., Toriyama, M., ... & Kurokawa, M. (2010b). In vitro and in vivo anti-influenza virus activity of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 21*(1), 33-41.

Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W., & Kurokawa, M. (2010a). Antiviral activities of diarylheptanoids against influenza virus in vitro. *Journal of natural medicines, 64*(1), 117-120.

Schiefer, W.C. (1980). Statistics for the biological sciences.2nd ed. Addison. Wesley publComp, California, London.

Schiffer, C., Müller, A., Egeberg, D. L., Alvarez, L., Brenker, C., Rehfeld, A., ... & Strünker, T. (2014). Direct action of endocrine disrupting chemicals on human sperm. *EMBO reports, 15*(7), 758-765.

Schneider, G., Kirschner, M. A., Berkowitz, R., & Ertel, N. H. (1979). Increased estrogen production in obese men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 48*(4), 633-638.

Schulz, R. W., França, L. R. D., Lareyre, J. J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Erratum to "Spermatogenesis in fish"[Gen. Comp. Endocrinol. 165 (2010) 390–411]. *General and Comparative Endocrinology, 167*(1), 179.

Selmi, S., Rtibi, K., Grami, D., Sebai, H., & Marzouki, L. (2018). Lavandula stoechas essential oils protect against Malathion-induces reproductive disruptions in male mice. *Lipids in Health and Disease, 17*(1), 1-13.

Sengupta, P., Dutta, S., & Krajewska-Kulak, E. (2017). The disappearing sperms: analysis of reports published between 1980 and 2015. *American journal of men's health, 11*(4), 1279-1304.

Shang, X., Tao, C., Miao, X., Wang, D., Wang, Y., Yang, Y., & Pan, H. (2012). Ethno-veterinary survey of medicinal plants in Ruoergai region, Sichuan province, China. *Journal of ethnopharmacology*, *142*(2), 390-400.

Shareef, A., Angove, M. J., Wells, J. D., & Johnson, B. B. (2006). Aqueous solubilities of estrone, 17β-estradiol, 17α-ethynylestradiol, and bisphenol A. *Journal of Chemical & Engineering Data*, *51*(3), 879-881.

Sharma, H. K., Chhangte, L., & Dolui, A. K. (2001). Traditional medicinal plants in Mizoram, India. *Fitoterapia*, *72*(2), 146-161.

Shum, W. W., Smith, T. B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L. S., Roy, J. W., Hill, E., ... & Da Silva, N. (2014). Epithelial basal cells are distinct from dendritic cells and macrophages in the mouse epididymis. *Biology of reproduction*, *90*(5), 90-1.

Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, *7*, 122-126.

Sifakis, S., Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *51*, 56-70.

Sikka, S. C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current medicinal chemistry*, *8*(7), 851-862.

Silva, D. F., Faria, F. J., Furtado, F. H., Fernandes, C. A., Silva, J. C., Garcia, A., & Costa, D. S. (2020). Functional Morphology of the Spermatogenesis of Gir Bulls. *Agricultural Sciences*, *11*(11), 1081-1094.

Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A., & Neri, L. M. (2018). Oxidative stress: role of physical exercise and

antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, *9*(24), 17181.

Srividya, A. R., Dhanabal, S. P., Misra, V. K., & Suja, G. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of *Alpinia officinarum*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, *72*(1), 145.

Staples, C., van der Hoeven, N., Clark, K., Mihaich, E., Woelz, J., & Hentges, S. (2018). Distributions of concentrations of bisphenol A in North American and European surface waters and sediments determined from 19 years of monitoring data. *Chemosphere*, *201*, 448-458.

Starkov, A. A. (2008). The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1147*(1), 37-52.

Sukhorum, W., & Iamsaard, S. (2017). Changes in testicular function proteins and sperm acrosome status in rats treated with valproic acid. *Reproduction, Fertility and Development*, *29*(8), 1585-1592.

Sun, H., Xu, L. C., Chen, J. F., Song, L., & Wang, X. R. (2006). Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene. *Food and chemical toxicology*, *44*(11), 1916-1921.

Sunderland, E. M., Hu, X. C., Dassuncao, C., Tokranov, A. K., Wagner, C. C., & Allen, J. G. (2019). A review of the pathways of human exposure to poly-and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, *29* (2), 131-147.

Sweeney, M. F., Hasan, N., Soto, A. M., & Sonnenschein, C. (2015). Environmental endocrine disruptors: effects on the human male

reproductive system. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 16*(4), 341-357.

Szliszka, E., Czuba, Z. P., Bronikowska, J., Mertas, A., Paradysz, A., & Krol, W. (2011). Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Tabata, K., Yamazaki, Y., Okada, M., Fukumura, K., Shimada, A., Sun, Y., ... & Suzuki, T. (2009). Diarylheptanoids derived from *Alpinia officinarum* induce apoptosis, S-phase arrest and differentiation in human neuroblastoma cells. *Anticancer Research*, *29*(12), 4981-4988.

Tainaka, H., Takahashi, H., Umezawa, M., Tanaka, H., Nishimune, Y., Oshio, S., & Takeda, K. (2012). Evaluation of the testicular toxicity of prenatal exposure to bisphenol A based on microarray analysis combined with MeSH annotation. *The Journal of toxicological sciences*, *37*(3), 539-548.

Takahashi, O., & Oishi, S. (2003). Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food and chemical toxicology, 41*(7), 1035-1044.

Teeguarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Yang, X., Fisher, J. W., Seryak, L. M., & Doerge, D. R. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicology and applied pharmacology, 288*(2), 131-142.

Teixidor-Toneu, I., Martin, G. J., Ouhammou, A., Puri, R. K., & Hawkins, J. A. (2016). An ethnomedicinal survey of a Tashelhit-speaking community in the High Atlas, Morocco. *Journal of ethnopharmacology, 188*, 96-110.

Thayer, K. A., Doerge, D. R., Hunt, D., Schurman, S. H., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., ... & Birnbaum, L. S. (2015). Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environment international, 83*, 107-115.

Thompson, A., Agarwal, A., & Du Plessis, S. S. (2013). Physiological role of reactive oxygen species in sperm function: a review. Antioxidants in male infertility: a guide for clinicians and researchers. *New York, USA: Springer Science and Business Media*, 69-89.

Thongkorn, S., Kanlayaprasit, S., Jindatip, D., Tencomnao, T., Hu, V. W., & Sarachana, T. (2019). Sex differences in the effects of prenatal bisphenol A exposure on genes associated with autism spectrum disorder in the hippocampus. *Scientific reports*, *9*(1), 1-14.

Tian, Z., An, N., Zhou, B., Xiao, P., Kohane, I. S., & Wu, E. (2009). Cytotoxic diarylheptanoid induces cell cycle arrest and apoptosis via increasing ATF3 and stabilizing p53 in SH-SY5Y cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *63*(6), 1131-1139.

Tiwari, D., & Vanage, G. (2013). Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reproductive Toxicology, 40*, 60-68.

Tolomeo, M., Grimaudo, S., Di Cristina, A., Pipitone, R. M., Dusonchet, L., Meli, M., ... & Simoni, D. (2008). Galangin increases the cytotoxic activity of imatinib mesylate in imatinib-sensitive and imatinib-resistant Bcr-Abl expressing leukemia cells. *Cancer letters*, *265*(2), 289-297.

Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Maekawa, M., Ito, C., & Toshimori, K. (2004). Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rats. *Archives of histology and cytology*, *67*(4), 373-381.

Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update, 14*(3), 243-258.

Trussell, J. C. (2013). Optimal diagnosis and medical treatment of male infertility. *In Seminars in reproductive medicine, 31*(4), 235-236. Thieme Medical Publishers.

Turner, T. T. (1991). Spermatozoa Are Exposed to a Complex Microenvironment as They Traverse the Epididymis a. *Annals of the New York Academy of Sciences, 637*(1), 364-383.

Tushar, Basak, S., Sarma, G.C., Rangan, L.(2010). Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India. *J. Ethnopharmacol. 132*, 286–296.

Tvrdá, E., Debacker, M., Ďuračka, M., Kováč, J., & Bučko, O. (2020). Quercetin and naringenin provide functional and antioxidant protection to stored boar semen. *Animals, 10*(10), 1930.

Ullah, A., Pirzada, M., Afsar, T., Razak, S., Almajwal, A., & Jahan, S. (2019 b). Effect of bisphenol F, an analog of bisphenol A, on the reproductive functions of male rats. *Environmental health and preventive medicine, 24*, 1-11.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., & Khan, M. J. (2019 a). Bisphenol A analogues bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S induce oxidative stress, disrupt daily sperm production, and damage DNA in rat spermatozoa: A comparative in vitro and in vivo study. *Toxicology and Industrial Health, 35(*4), 294-303.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., ... & Butt, M. A. (2018a). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere, 209*, 508-516.

Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Turi, N., Ullah, W., ... & Khan, M. M. (2018b). Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A and its analogue bisphenol B, bisphenol F and bisphenol S on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: A focus on the possible hormonal mode of action. *Food and chemical toxicology, 121*, 24-36.

Ullah, H., Ambreen, A., Ahsan, N., & Jahan, S. (2017). Bisphenol S induces oxidative stress and DNA damage in rat spermatozoa in vitro and disrupts daily sperm production in vivo. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *99*(5-6), 953-965.

Ullah, H., Ullah, F., Rehman, O., Jahan, S., Afsar, T., Al-Disi, D., ... & Razak, S. (2021). Chronic exposure of bisphenol S (BPS) affect hypothalamic-pituitary-testicular activities in adult male rats: possible in estrogenic mode of action. *Environmental Health and Preventive Medicine*, *26*, 1-11.

USEPA. Particulate matter (PM) pollution [Internet]. United States Environmental Protection Agency, (2018). Available at: https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics.

Usman, A., & Ahmad, M. (2016). From BPA to its analogues: is it a safe journey? *Chemosphere 158*, 131-142.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C, 27*(2), 120-139.

Van der Meer, T. P., Artacho-Cordón, F., Swaab, D. F., Struik, D., Makris, K. C., Wolffenbuttel, B. H., ... & van Vliet-Ostaptchouk, J. V. (2017). Distribution of non-persistent endocrine disruptors in two different

regions of the human brain. *International journal of environmental research and public health, 14*(9), 1059.

Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F. J., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental health perspectives, 118*(8), 1055-1070.

Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology*, *24*(2), 139-177.

Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews*, *30*(1), 75-95.

Venisse, N., Cambien, G., Robin, J., Rouillon, S., Nadeau, C., Charles, T., ... & Dupuis, A. (2019). Development and validation of an LC–MS/MS method for the simultaneous determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in adipose tissue. *Talanta, 204*, 145-152.

Vitku, J., Heracek, J., Sosvorova, L., Hampl, R., Chlupacova, T., Hill, M., ... & Starka, L. (2016). Associations of bisphenol A and polychlorinated biphenyls with spermatogenesis and steroidogenesis in two biological fluids from men attending an infertility clinic. *Environment international*, *89*, 166-173.

Wang, C., Fu, W., Quan, C., Yan, M., Liu, C., Qi, S., & Yang, K. (2015). The role of Pten/Akt signaling pathway involved in BPA-induced apoptosis of rat sertoli cells. *Environmental toxicology, 30*(7), 793-802.

Wang, C., Qi, S., Liu, C., Yang, A., Fu, W., Quan, C., ... & Yang, K. (2017b). Mitochondrial dysfunction and Ca2+ overload in injured sertoli cells exposed to bisphenol A. *Environmental toxicology, 32*(3), 823-831.

Wang, D., Hu, L., Zhang, G., Zhang, L., & Chen, C. (2010). G protein-coupled receptor 30 in tumor development. *Endocrine, 38*(1), 29-37.

Wang, C.; Qi, S.; Liu, C.; Yang, A.; Fu,W.; Quan, C.; Duan, P.; Yu, T.; Yang, K. (2016) Mitochondrial Dysfunction and Ca2+ Overload in Injured Sertoli Cells Exposed to Bisphenol A. Environ. *Toxicol, 32*, 823–831.

Wang, Y., Lin, B., Li, H., Lan, L., Yu, H., Wu, S., ... & Zhang, H. (2017a). Galangin suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation by reversing the Warburg effect. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 95*, 1295-1300.

Watkins, D. J., Sánchez, B. N., Téllez-Rojo, M. M., Lee, J. M., Mercado-García, A., Blank-Goldenberg, C., ... & Meeker, J. D. (2017). Impact of phthalate and BPA exposure during in utero windows of susceptibility on reproductive hormones and sexual maturation in peripubertal males. *Environmental Health, 16*(1), 1-10.

Wei, N., Zhou, Z., Wei, Q., Wang, Y., Jiang, J., Zhang, J., ... & Li, Y. (2016). A novel diarylheptanoid-bearing sesquiterpene moiety from the rhizomes of *Alpinia officinarum*. *Natural Product Research, 30*(20), 2344-2349.

Will, M. A., Swain, J., Fode, M., Sonksen, J., Christman, G. M., & Ohl, D. (2011). The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. *Fertility and sterility, 95*(3), 841-852.

Wisdom, G. B. (1976). Enzyme-immunoassay. *Clinical chemistry, 22*(8), 1243-1255.

Wisniewski, P., Romano, R. M., Kizys, M. M., Oliveira, K. C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., ... & Romano, M. A. (2015). Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology*, *329*, 1-9.

Wu, H. J., Liu, C., Duan, W. X., Xu, S. C., He, M. D., Chen, C. H., ... & Chen, Y. (2013). Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *752*(1-2), 57-67.

Xin, F., Jiang, L., Liu, X., Geng, C., Wang, W., Zhong, L., ... & Chen, M. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *769*, 29-33.

XU, Y. X. (2013). In vitro effects of galangin on cell proliferation, cycle progression and apoptosis of a human gastric cancer SGC-7901 cells. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 1274-1278.

Xue, J., & Kannan, K. (2019). Mass flows and removal of eight bisphenol analogs, bisphenol A diglycidyl ether and its derivatives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. *Science of the Total Environment*, *648*, 442-449.

Yadav, D. K., Rai, R., Kumar, N., Singh, S., Misra, S., Sharma, P., ... & Pratap, R. (2016). New arylated benzo [h] quinolines induce anti-cancer activity by oxidative stress-mediated DNA damage. *Scientific reports*, *6*(1), 1-13.

Yadav, P. N., Liu, Z., & Rafi, M. M. (2003). A diarylheptanoid from lesser galangal (*Alpinia officinarum*) inhibits proinflammatory mediators via inhibition of mitogen-activated protein kinase, p44/42, and transcription

factor nuclear factor-κB. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *305*(3), 925-931.

Yang, Y. J., Hong, Y. C., Oh, S. Y., Park, M. S., Kim, H., Leem, J. H., & Ha, E. H. (2009). Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environmental research*, *109*(6), 797-801.

Ye, L., Zhao, B., Hu, G., Chu, Y., & Ge, R. S. (2011). Inhibition of human and rat testicular steroidogenic enzyme activities by bisphenol A. *Toxicology letters*, *207*(2), 137-142.

Zaneveld, L. J. D., & Polakoski, K. L. (1977). Collection and physical examination of the ejaculate. Techniques of human andrology, 147-172.Wisdom, G. B. (1976). Enzyme-immunoassay. *Clinical chemistry*, *22*(8), 1243-1255.

Zeng, H., Huang, P., Wang, X., Wu, J., Wu, M., & Huang, J. (2015). Galangin-induced down-regulation of BACE1 by epigenetic mechanisms in SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, *294*, 172-181.

Zhang, R., Liu, R., & Zong, W. (2016). Bisphenol S interacts with catalase and induces oxidative stress in mouse liver and renal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(34), 6630-6640.

Zhou, H. M., Zhang, T., & Liu, Y. X. (1996). Rat epididymis expresses luteinizing hormone receptor (LHR). *Chinese Sci Bull*, *41*, 1608-1610.

الملاحق Appendices

ملحق 1: تقدير فعالية أنزيم السوبر أوكسيد دسميوتيز SOD activity في مصل الدم.

تم اعتماد طريقة القياس اللوني للباحثين Marklund و Marklund (1974) في تقدير نشاط الـ SOD في مصل الدم

- **المبدأ الأساس Basic Principle**

يقوم مبدأ الاختبار على دور أنزيم الـ SOD في تثبيط عملية الأكسدة التلقائية للـ Pyrogallol إذ يشار إلى نشاط الإنزيم بعدد من الوحدات التي تدل الواحدة منها على كمية الأنزيم (SOD) التي تثبط 50 ٪ من الأكسدة التلقائية للـ Pyrogallol عند 25 درجة مئوية وطول موجي 452 نانومتر.

- **تحضير الكواشف Reagents Preparation of**

1- محلول (Tris-EDTA buffer (pH 8.0 : تم تحضيره بإذابة 0.258 غم tris و 0.111 غم Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) في الماء المقطر وإكمال الحجم إلى 100 مل.

2- محلول (Pyragallol (0.2 mM : تم تحضيره بإذابة 0.0252 غم Pyragallol مع 10 مل حامض HCL وإكمال الحجم إلى 100 مل باستخدام الماء المقطر.

- **طريقة العمل Procedure**

الكواشف	انبوب العينة	الانبوب القياسي
المصل	50 مايكرولتر	-------
Tris buffer (pH 8.0)	2 مل	2 مل
ماء مقطر	1,950	2 مل
Pyragallol (0.2 mM)	0.5 مل	0.5 مل
تقرأ الامتصاصية بعد المزج ثم تقرأ بعد بعد دقيقة واحدة عند طول موجي 420 نانومتر		

- **الحسابات Calculation**

تم حساب نشاط SOD باستخدام المعادلة التالية :

$$SOD\ (U / ml)=((Vp-Vs)\ )/((Vp * 0.5)\ )\times(Vt\ )/Vs\times n$$

إذ أن :

معدل الأكسدة التلقائية للـ Pyragallol في الأنبوب القياسي = Vp

معدل الأكسدة التلقائي في انبوب العينة = Vs

الحجم الإجمالي لمواد التفاعل (مل) = Vt

حجم العينة المستعمل للمقايسة (مل) = Vs

أضعاف التخفيف للعينة = n

ملحق (2) : المحاليل Solutions

1-2. مثبت بوين Bouin's Fixative :

يستخدم لتثبيت الانسجة الرقيقة, وقد تم تحضيره وفقاً لطريقة Galigher و Kozlooff (1964) من المحلول المائي المشبع لحامض البكريك Picric acid (75 مل) , الفورمالين 40% (25 مل) وحامض الخليك الثلجي Glacial Acetic Acid (5 مل).

2-2. محلول الفورمالين الملحي Formal saline

تم تحضيره بإضافة 10مل من الفورمالين (40%) إلى 90 مل من محلول الملح الفسيولوجي (Sakamoto and Hashimoto, 1986) .

ملحق (3) : الملوّنات Stains

1-3. ملوّن الايوسين-النجروسين Eosin-Nigrosin stain

حضّر بإذابة 1غم من ملوّن الأيوسين في 100 مل من محلول سترات الصوديوم (3%), وإذابة 5غم من ملوّن النجروسين في 100 مل من محلول سترات الصوديوم (3%), ثم مزج جزء واحد من محلول ملوّن الأيوسين مع اربعة اجزاء من محلول ملوّن النجروسين. (Hancock, 1951).

2-3. ملوّن الايوسين Eosin stain

حضر بأذبة 10 غم من الأيوسين في 100 مل من الماء المقطر (Luna , 1968).

3-3. ملوّن الهيماتوكسلين-هارس Hematoxlin-Harris Stain:

تم تحضير هذا الملوّن بإذابة 1غم من الهيماتوكسلين في 10 مل من الكحول الأثيلي المطلق, وإذابة 20غم من شب البوتاسيوم Potassium Alum في 200 مل من الماء المقطر الدافيء وتم غلي المحلول. أضيف محلول الهيماتوكسلين إلى محلول الشب وغُلي لمدة نصف دقيقة ثم أُضيف إليه 0.5 غم من أوكسيد الزئبق الاحمر Red mercuric oxide وبعدها بُرّد المحلول بسرعة وأُضيفت إليه عدة قطرات من حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid (Bancroft & Steven, 1982).

4-3. ملوّن الأيوسين الكحولي Alcoholic-eosin stain

حُضّر بإذابة 1غم من ملوَّن الأيوسين واي (Y eosin) في 99 مل من الكحول الأثيلي 95% ثم اضيف للمحلول قليل من حامض الخليك الثلجي (0.5 مل لكل 100مل من الملوّن) لزيادة حدة الملوّن (Bancroft & Steven, 1982).

5-3. لاصق آح ماير Mayer's albumin Adhesive

تم تحضير هذا اللاصق عن طريق مزج زلال البيض و الكليسيرول بنسبة 1:1 (المختار وجماعتها 1982).

Summary

This study was conducted at the Department of Biology/College of Education for Pure Sciences/University of Karbala for the period from February 2022 to January 2023. It included the phytochemical analysis of the alcoholic extract of the rhizomes of Lesser Galangal plant (*Alpinia officinarum*) and the evaluation of its protective role against reproductive toxicity induced by BPA in male albino rats.

The study included two experiments, the first aimed at determining the most effective concentration out of three safe concentrations, in which 24 adult male rats of the *Ratus ratus* strain, aged 14 weeks, weighed between 200-220 g , were used. They were randomly distributed into four groups (6 rats per group): the first was left without treatment and counted as a control group, while the other three groups were adminstrated orally with one of the safe concentrations of alcoholic extract (100, 200, 400 mg/kg/day), then after one hour they were given a single dose of BPA (50 mg/kg) for a period of 30 days, After that, blood samples were taken to estimate SOD activity, which was adopted as a criterion for selecting the most effective concentration.

The second experiment was designed to evaluate the protective role of the extract at the concentration that was determined according to the results of the first experiment, as it used 30 adult male rats (of the same ages and weights above) distributed randomly into five groups (6 rats per group): the first was left without treatment and was counted as a control group, while The second, third and fourth groups were dosed orally for 60 days with olive oil, galangal extract (400 mg/kg), bisphenol A (50 mg/kg) respectively, while the fifth group was given galangal extract and then adminstrated after one hour with bisphenol A and was counted as a protection group.

The weights of the animals were recorded at the beginning and end of the experiment, and the animals were sacrificed 24 hours after the last dose. Blood samples were collected for the purpose of conducting biochemical tests (Serum levels of testosterone (T), interstitial cell stimulating hormone (ICSH), follicle-stimulating hormone (FSH), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and catalase (CAT) activity) and the testes and epididymis were removed for use in the study of other criteria (sperm parameters, histological changes, assessment of deoxyribonucleic acid (DNA) damage) after they were cleaned and weighed.

The inferential results showed that the alcoholic extract of of lesser galangal rhizomes contains alkaloids, steroids, terpenes, phenols, flavonoids, saponins and tannins, while the results of quantitative assessment showed that it has high concentrations of phenols and flavonoids. The results of the identification and separation of the bioactive compounds using GC-MS revealed the presence of a number of bioactive compounds that differed in their surface area and retention time.

The results of the first experiment revealed that there was a significant decrease ($p<0.05$) in the activity of the SOD enzyme in the animals of the two groups treated with the two doses of 100 and 200 mg/kg of the extract compared to the control group, which did not show a significant difference between them and the treatment group with the concentration of 400 mg/kg of the extract. These results led to adopting a concentration of 400 mg/kg in the second experiment to evaluate its protective role against reproductive toxicity induced by BPA.

The results of the second experiment showed a significant decrease ($p<0.05$) in the average absolute weight of testes and epididymis, sperm concentration in testis and epididymis cauda, percentage of sperm motility and viability, level of reproductive hormones (T, ICSH, FSH), level of GSH and CAT activity, numbers of germ cells and sertoli cells, diameters of seminiferous tubules and the thickness of the germinal layer, diameters of epididymis cauda tubules and the thickness of the epithelial tissue lining them, and a significant increase ($p<0.05$) in the percentage of abnormal sperm, level of MDA, number of sperms that showed the shape of comet and the percentage of caudate content of fragmented deoxyribonucleic acid in animals of the BPA-treated group compared to the control group, while no significant difference was observed ($p<0.05$) in the amount of body weight gain between the two groups.

On the other hand, the results showed a significant increase ($p<0.05$) in the average absolute weight of testes and epididymis, sperm concentration in testis and epididymis cauda, percentage of sperm motility and viability, T, ICSH and FSH levels, GSH level and CAT enzyme activity. Number of spermatogenic cells and Sertoli cells, diameters of seminiferous tubules and thickness of germinal layer, diameters of tubules of the caudal epididymis and thickness of epithelial tissue lining them, and a significant decrease ($p<0.05$) in the percentage of abnormal sperms, MDA level, numbers of

sperms that showed cometary shape and the percentage of tail content of fragmented DNA in the animals of the prevention group (the fifth group) compared to the control group, and there was no significant difference ($p>0.05$) in the amount of body weight gain between the two groups.

The results also revealed a significant increase ($p<0.05$) in the amount of body weight gain, testes and epididymis weights, sperm concentration in the testis and epididymis cauda, the level of T and FSH, the number of spermatogenic cells and Sertoli cells in the animals of the third group treated with the extract alone compared to a control group, while there was no significant difference ($p>0.05$) in the other criteria studied between the two groups.

changes in the tissues of the testis and epididymis cauda in the animals of the BPA-treated group compared with the control group, including: widening of the spaces between the seminiferous tubules, separation or sloughing of the germinal layer from the basement membrane with its disintegration significantly, the state of association between spermogenic cell and sertoli cells was decreased , reduction of the amount of sperm in the lumens of most of the seminiferous tubules and some of them being completely empty, it also included irregular distribution of epididymal tubules with disintegration and widening of the connective tissue between them, separation of the epithelial tissue lining the epididymal tubules from the basement membrane in some areas, reduction of sperm numbers in most epididymal tubules and some of them are empty. On the other hand, the histological sections of the animals of the prevention group showed a significant regression in the histological changes observed in the BPA-treated group.

It was concluded from the current study that the alcoholic extract of the rhizomes of Lesser Galangal plant at a concentration of 400 mg/kg has the ability to reduce the harmful effects on the male reproductive system resulting from exposure to BPA at a concentration of 50 mg/kg and provide the necessary protection to carry out the required functions through its direct effect and antioxidant activity.

Kerbala university

Evaluation of the protective role of alcoholic extract of *Alpinia officinarum* plant against Bisphenol-induced reproductive toxicity in male albino rats.

A Thesis
submitted to Council of the College of Education Pure Science - Karbala University, as a partial fulfillment of the requirements for Doctor of Philosophy degree in Biology-Zoology

Written by

Mahdi Hamzah Khashan Al-jubouri

Supervised By

Prof.Dr.	Prof.Dr.
Rasha Abdul Amir Jawad	Nasser Merza Hamza

2023 A.D. **1444 A.H.**