

Activity of clove plant extract on histopathological changes of testes tissue in adult white rats.

فعالية المستخلص الكحولي لنبات القرنفل على التغيرات النسجية المرضية لنسيج الخصى في ذكور الجرذان البيض

عبد، رضية نجم
كلية طب الأسنان/ جامعة كربلاء

الخلاصة

يتضمن البحث الحالي دراسة تثبيط التغيرات النسجية المرضية الحاصلة لنسيج خصى ذكور الجرذان البيض بفعل التأثير السمي لعقار المايتومايسين – سي MMC وذلك باستخدام المستخلص الميثانولي/المائي لنبات القرنفل (clove) *Syzygium aromaticum*. إذ تم معاملة ذكور الجرذان البالغة بجرعة 2ملغم/كغم من وزن الجسم من عقار MMC لمدة أسبوع واحد وذلك لبيان تأثير العقار السمي على نسيج الخصية ، كما تم تجريب مجاميع أخرى من الجرذان عقار المايتومايسين-سي بجرعة 2ملغم/كغم بالتداخل مع مستخلص القرنفل بتركيز 500 ملغم/كغم من وزن الجسم في نفس الوقت ولمدد زمنية مختلفة ، إذ كان التجريب لمدة أسبوع واحد وأربعين وثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع وخمسة أسابيع وذلك لمعرفة التأثير التراكمي للعقار والمستخلص على النسيج . وقد اشتملت التغيرات النسجية المرضية بفعل عقار المايتومايسين على ظهور مسافات بينية بين النبيبات الناقلة للمني، وحصول تنكص في عملية نشأة النطف في اغلب النبيبات المنوية ، إضافة إلى ظهور احتقان وتنكص في بعض خلايا النسيج الخصوي واختفاء لمعظم خلايا ليديك في النسيج بالمقارنة مع السيطرة السالبة. لقد بينت النتائج أيضا حصول تحسن كبير لنسيج الخصية بعد الأسبوع الخامس من التجريب بالعقار مع المستخلص الكحولي لنبات القرنفل في نفس الوقت مقارنة مع السيطرة الموجبة . ما يدل على الفعالية المضادة للأكسدة التي يمتاز بها المستخلص المستخدم في دراستنا هذه.

Abstract

this search aimed to study the pathological changes that happen in testicular tissue of white rats males by toxic action of mitomycin-c drug and inhibited that effect by using of methanolic water extract of clove. The adult male of white rats treated by dose 2 mg/kg from body weight of drug MMC for one week period to detect the effect of drug on the testis tissue, while the other groups of the rats had been gavaged with drug MMC in same dose interference with plant extract in concentration about 500 mg/kg from body weight for different period of time, one week, two weeks, three weeks, four weeks and five weeks to know the accumulative effects of clove extract and drug action on the testis tissue. The result of the oral gavage for one week of the drug had been showed, appear intercellular spaces between seminiferous tubules and lead to degeneration in spermatogenesis, disappear the sperms in tubule cavity, congestion and absence most of leydig cells compared with negative control , that improve the drug has toxic effect on testis tissue , it lead to pathological changes in that tissue. While the results of interference treatment of the drug and plant extract for five weeks was possessed a good improvement without any pathological tissue changing and testis tissue return to normal position compared with positive control .This result improve clove extract has antioxidant activity .

المقدمة

تحتوي النباتات الطبية على مجاميع عدة من المواد ذات التأثيرات الطبية المختلفة وهي موجودة أما كنواتج أيضية أو كمكونات أساسية في تركيبها ، ويمكن تقسيم هذه المواد على أساس تأثيرها في الكائنات الحية على ما هو سام وقاتل وعلى ما هو مفيد ومغذي ، وأن لكلا هذه المواد السامة وغير السامة تأثيرات حيوية وعلاجية عندما تؤخذ بكميات مناسبة وتحت إشراف مختصين(1). ونبات القرنفل (Clove) واسمه العلمي *Syzygium aromaticum* من العائلة الأسيية Myrtaceae، و هو من الأشجار دائمة الخضرة والتي تنمو إلى مديات عالية تتراوح من 10-20 متر وتمتلك أوراق بيضوية كبيرة وأزهار قرمزية اللون في مجاميع متعددة لعناقيد طرفية ، تكون البراعم الزهرية الناضجة ذات لون احمر مشع(2). وتصنيف النبات الكامل حسب Bin Mdderos⁽³⁾

Kingdom: Plantae
Division: Magnoliophyta.
Class: Magnoliopsida.
Order: Myrtales
Family: Myrtaceae
Genus: Syzygium
Species: *Syzygium aromaticum*

يحتوي نبات القرنفل على الزيوت الطيارة إضافة إلى المركبات غير الطيارة كالتانينات والفلافونويدات والستيرولات والكلايكوسيدات وهذا ما جعل له أهمية طبية كبيرة ، و اليوجينول هو المركب الفعال لزيت القرنفل والذي يشكل نسبة 70-95 % من الوزن الكلي للزيت وله استعمالات واسعة ، منها استعماله في طب الأسنان كمخدر موضعي (4). كما كشفت الدراسات وجود المركبات الفلافونويدية في نبات القرنفل وهذه المركبات هي التي تمتلك فعالية مضادة للالتهاب وتحمي الغشاء المخاطي المعدي من مختلف العوامل المسببة للقرح ulcerogenic في أنواع مختلفة من الثدييات (5). كما إن القرنفل يعمل على خفض مستويات إنزيمات الكبد في المصل كونه يحوي مضادات الأكسدة إضافة إلى أنه يحتوي على مركبات فينولية تعمل ككاسحات للجذور الحرة (6).

أما عقار المايتومايسين فهو احد المضادات الحياتية والذي ينتج بواسطة بكتيريا *Streptomyces caesprtous* ، وقد اكتشف لأول مرة في سنة 1956(7). وعلى الرغم من كون المايتومايسين دواءً فعالاً إلا انه في نفس الوقت مركب عالي السمية ، و يعد العقار دواءً مضاداً للسرطان(anti neoplastic) إذ يكون ارتباط تساهمي مع شريط DNA المكمل وبذلك يثبط تخليق الـ DNA (8). لذا فان الخلل في بنية الحامض النووي منقوص الأوكسجين هو المسئول عن كبح النمو السرطاني بعد استعمال العقار (9). أما الأشكال الأيضية للمايتومايسين فهي : 2-7- diminomitosene و Trans-1-hydroxy و Cis-1-hydroxyl و-1 phosphate ويرتبط المايتومايسين تساهمياً مع الموقع N2 لقاعدة الكوانين (10) . وقد هدفت الدراسة إلى الكشف عن فعالية المستخلص الكحولي لنبات القرنفل في التقليل من أو إزالة التأثير السمي لعقار المايتومايسين- سي على نسيج الخصية في ذكور الجرذان البيض.

المواد وطرائق العمل

المواد:

استخدم في هذه الدراسة البراعم الزهرية الجافة dried flower buds لنبات القرنفل المتوفرة في السوق المحلية لدى العطارين وبائع الأعشاب الطبية وقد صنف النبات استناداً إلى Bin Mdderos⁽³⁾. كما استخدمت في هذه التجربة ذكور الجرذان البيض (White albinos' rats *Rattus rattus*) بعمر 8-10 أسابيع وتركت على الأقل أسبوعين للتكيف مع ظروف المختبر قبل إجراء التجارب عليها.

حضر مستخلص القرنفل من البراعم الزهرية الجافة وحسب طريقة Sato وزملاؤه⁽¹¹⁾. وركز باستخدام المبخر الدور(Rotary evaporator) ووضع في الحاضنة بدرجة 50 م للحصول على المستخلص الجاف، حفظ في مكان جاف لحين الاستعمال. بعدها استخدم عقار المايتومايسين المتوفر بشكل مسحوق بتركيز 2 ملغم/كغم من وزن الجسم بعد إذابته في الماء المقطر(12). كما استخدم مستخلص القرنفل بتركيز 500 ملغم/كغم من وزن الجسم بعد إذابته في الماء المقطر(13) ، ثم جرعت الحيوانات فموياً للعقار والمستخلص بواسطة انبوبة الحقن .

السيطرة السالبة تضمنت تجريب ثلاثة حيوانات ماء مقطر فقط لمدة أسبوع وشرحت في اليوم الثامن من التجريب، السيطرة الموجبة جرعت ثلاثة حيوانات عقار المايتومايسين-سي فقط لمدة أسبوع وشرحت في اليوم الثامن من التجريب، المجموعة الأولى جرعت ثلاثة حيوانات العقار مع المستخلص النباتي لمدة أسبوع و شرحت في اليوم الثامن من التجريب، المجموعة الثانية جرعت ثلاثة حيوانات العقار مع المستخلص النباتي لمدة أسبوعين و شرحت في اليوم 15 من التجريب، المجموعة الثالثة جرعت ثلاثة حيوانات العقار مع المستخلص النباتي لمدة ثلاثة أسابيع شرحت في اليوم 22 من التجريب، المجموعة الرابعة جرعت ثلاثة حيوانات العقار مع المستخلص النباتي لمدة أربعة أسابيع شرحت في اليوم 29 من التجريب، المجموعة الخامسة جرعت ثلاثة حيوانات العقار مع المستخلص النباتي لمدة خمسة أسابيع شرحت في اليوم 36 من التجريب.

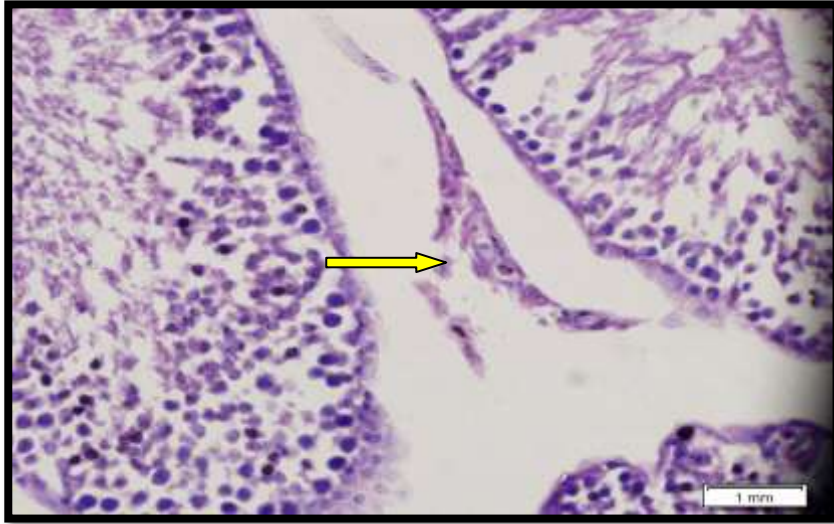
بعد انتهاء عمليات التجريع والتجربة تم تحضير المقاطع النسيجية لخصى الجرذان قيد الاختبار وفقاً لLauna⁽¹⁴⁾.

النتائج والمناقشة

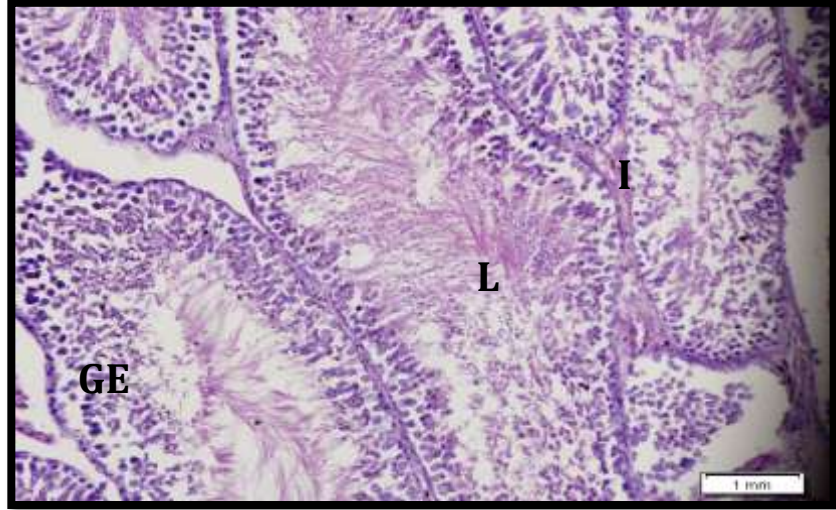
أظهرت مشاهدات الفحص المجهرى للمقاطع النسيجية لخصى ذكور الجرذان المعاملة بعقار المايتومايسين- سي بجرعة 2ملغم/ كغم ولمدة أسبوع واحد (السيطرة الموجبة) حدوث تغيرات نسيجية واضحة تمثلت بظهور مسافات بينية بين النبيتات الناقلة للمني intercellular spaces وانعدام الخلايا البينية (خلايا لايدك) leydig cells بالإضافة إلى حدوث تنكص في بعض خلايا النبيتات المنوية وعملية نشأة النطف incomplete spermatogenesis كما لوحظ وجود احتقان congestion في النسيج أيضاً، كذلك برز توسع تجويف النبيب المنوي tubular dilatation وخلوه من النطف انظر شكل (3) و(4) بالمقارنة مع السيطرة السالبة شكل (1) و(2).

أن السبب في حدوث هذه التغيرات المرضية ناشئ من أن عقار المايتومايسين يؤدي إلى توليد الجذور الحرة free radicals مثل superoxide و hydroxyl radicals (15). كما أن المعاملة بهذا العقار تؤدي إلى تكوين أنواع أخرى من الجذور الحرة ومنها أصناف الأوكسجين الفعالة ROS (Reactive Oxygen Species) والتي تعمل على العديد من التشوهات في الحيوانات المنوية من خلال مهاجمتها للغشاء الخلوي للنطف وعملها على حث عملية أكسدة الدهون الموجودة في الغشاء الخلوي للنطف وبالتالي تغير في تركيب هذه الدهون مما يؤدي إلى زيادة سيولة الغشاء الخلوي (Fluidity) للنطف (16). كما لوحظ أن فرط إنتاج ROS يمكن أن يتسبب بالتفاعل مع الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة لغشاء الخلية واستحداث عملية بيروكسدة الدهون (17). حيث أن الأنواع الفعالة للأوكسجين لها تأثير مباشر على خلايا سرتولي التي تلعب دوراً مهماً في عملية نشأة النطف (Spermatogenesis)، مما يؤدي إلى تشوهات تخليقية لأرومات النطف (Spermatids) (18).

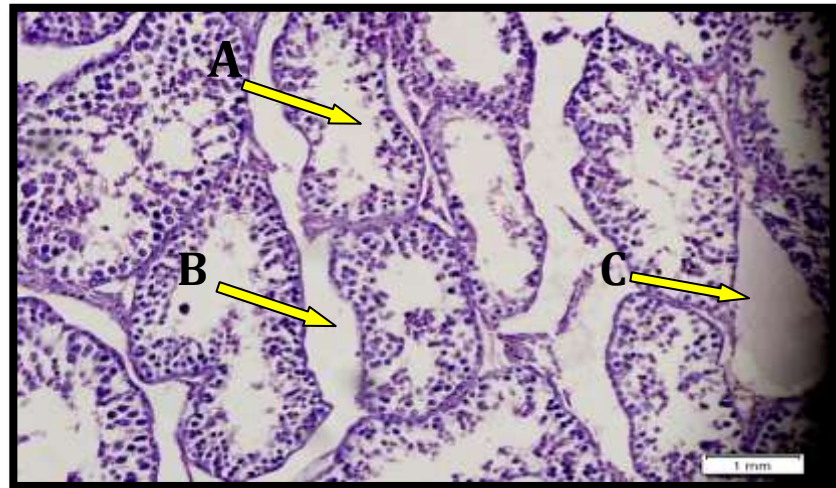
بالإضافة إلى ذلك فقد وجد Fernandez وزملاؤه⁽¹⁹⁾ أن عقار المايتومايسين سبب تغيرات مرضية شديدة لخلايا spermatogonia في النبيتات المنوية مما أدى إلى فقدان وظيفتها في تكوين النطف، مؤثراً على الإنتاج اليومي للنطف وصفاتها الفسلجية إضافة إلى الصفات الفسلجية للأنسجة الحشوية الخصوية عند الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من المايتومايسين.



شكل (1) مقطع مستعرض لخصية جرد طبيعي (400X صبغة H&E) يشير السهم إلى خلايا لايدك



شكل (2) مقطع مستعرض لخصية جرد طبيعي (200X صبغة H&E) يوضح امتلاء النبيب المنوي بالنطف وعدم وجود مسافات بينية بين النببيات ووجود طبقات الخلايا المكونة للنطف. GE: Germinal epithelium, I: Interstitium, L: Central lumen.



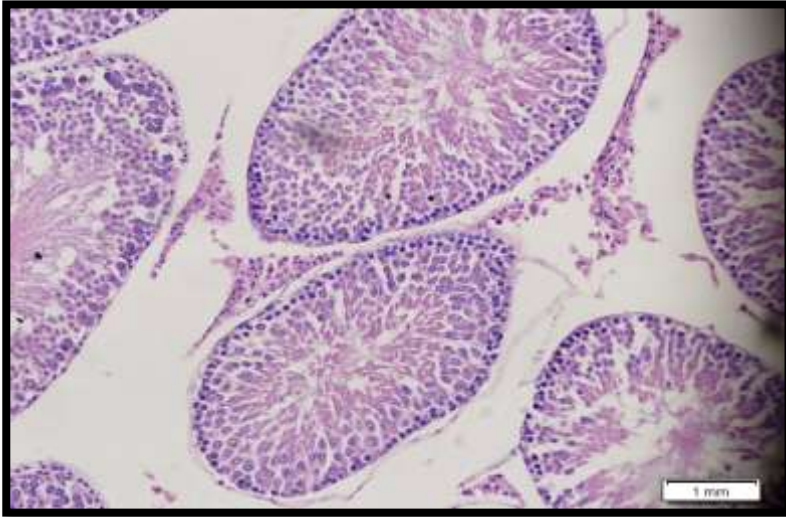
شكل (3) السيطرة الموجبة، مقطع مستعرض لخصية جرد معاملة بالعقار لاسبوع واحد (A: توسع تجويف النبيب المنوي، B: المسافات البينية الظاهرة بين النببيات، C: ظهور الاحتقان. غياب خلايا لايدك وتنكص عملية نشأة النطف.



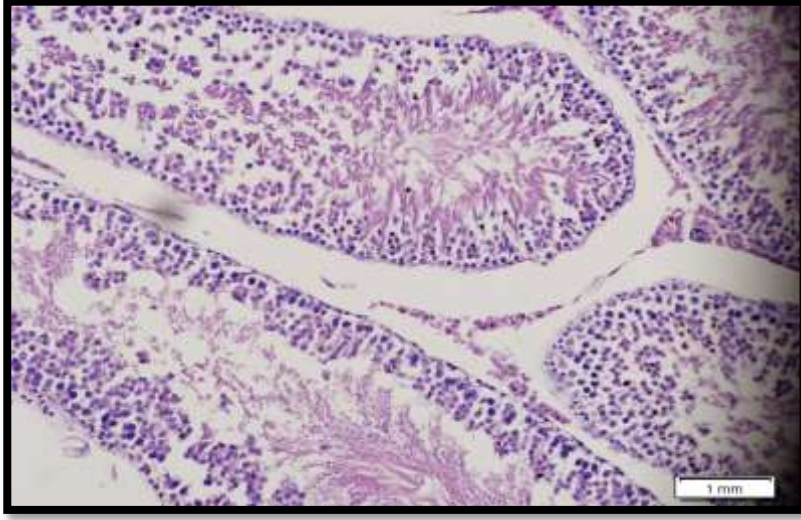
شكل (4) السيطرة الموجبة ، مقطع مستعرض لخصية جرد معاملة بالعقار لأسبوع واحد (200X صبغة H&E) يوضح التغيرات النسيجية المرضية. يشير السهم إلى الاحتقان.

من جهة أخرى بينت نتائج المعاملة بالمستخلص الكحولي لنبات القرنفل مع العقار وللأسبوع الأول من التجريب بقاء المؤشرات السلبية للعقار على نسيج الخصية للحيوانات المعاملة ، إذ لم يحدث أي تحسن في النسيج ، كذلك الحال بالنسبة إلى الأسبوع الثاني من التجريب وهذا يدل على التأثير السمي التراكمي للعقار في النسيج كما في الشكل (5) و(6) ، أما نتائج الأسبوع الثالث والرابع للمعاملة بالمستخلص مع العقار فقد أظهرت تحسنا جزئيا في التغيرات المرضية للنسيج بسبب تأثير المستخلص على الفعل السمي للعقار ، إذ بدأت خلايا لايدك بالانتعاش مما أختزل التوسع في تجويف النبيب المنوي وقل الاحتقان والمسافات البينية بين النبيبات ناقلة المنى كما في الشكل (7) و(8) .

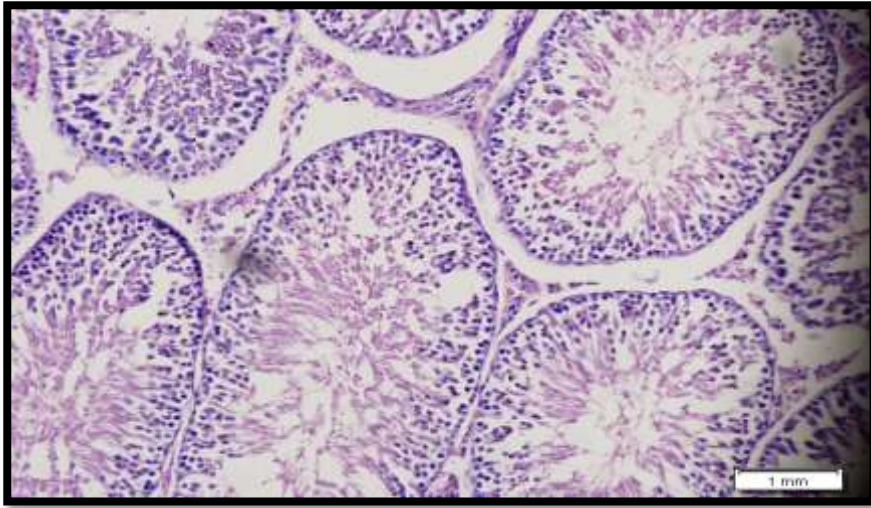
غير أن نتائج الأسبوع الخامس للتجريب بالمستخلص مع العقار أظهرت عودة الحالة الطبيعية للنسيج الخصوي لذكور الجرذان البيض من غياب المسافات البينية بين النبيبات المنوية وظهور خلايا لايدك واكتمال عملية نشأة النطف كما يتوضح ذلك في الشكل (9) .



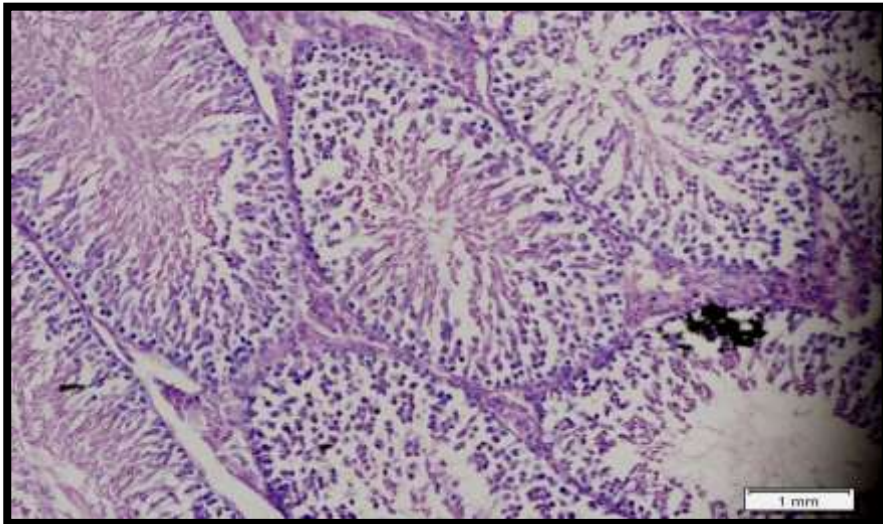
شكل (5) مقطع مستعرض لخصية جرد معاملة بالعقار والمستخلص لأسبوع واحد (200X صبغة H&E) يوضح استمرار التغيرات النسيجية المرضية



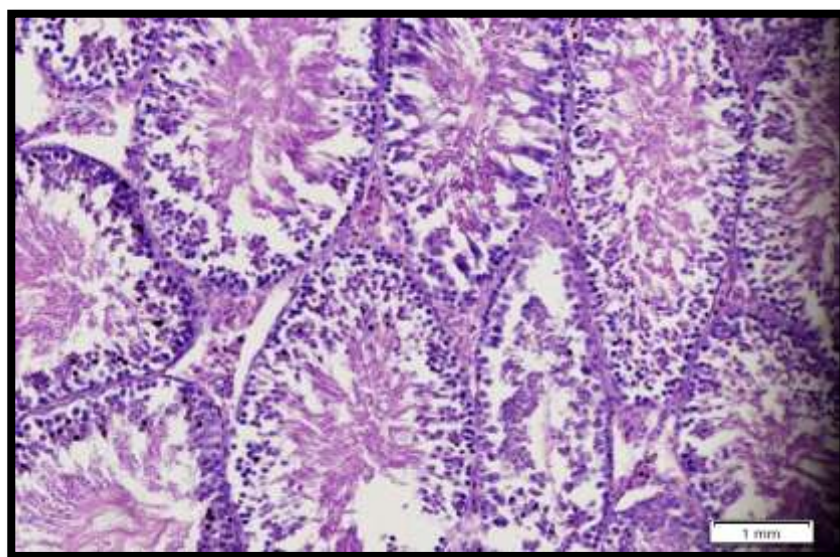
شكل (6) مقطع مستعرض لخصية جرذ معامل بالعقار والمستخلص لأسبوعين (200X صبغة H&E) يوضح استمرار التغيرات النسجية المرضية



شكل (7) مقطع مستعرض لخصية جرذ معامل بالعقار والمستخلص لثلاثة أسابيع (200X صبغة H&E) يوضح تحسن التغيرات النسجية المرضية



شكل (8) مقطع مستعرض لخصية جرذ معامل بالعقار والمستخلص لأربعة أسابيع (200X صبغة H&E) يوضح تحسن التغيرات النسجية المرضية



شكل (9) مقطع مستعرض لخصية جرذ معاملة بالعقار والمستخلص لخمسة أسابيع (200X صبغة H&E) يوضح عودة الحالة الطبيعية للنسيج

يتبين من النتائج المتحصل عليها من البحث الراهن أن المستخلص الكحولي للقرنفل يعد ذو تأثير ملموس على التغيرات النسجية المرضية الحاصلة بفعل عقار المايتومايسين ، وهذه دلالة على أن القرنفل مضاد جيد للأكسدة وهذا وافق ما أثبتته Oboh وShodehindei⁽²⁰⁾ من أن القرنفل يكون غنياً بالـ polyphenols مثل مركب اليوجينول الذي يمتلك فعل مضاد للأكسدة وهذا ما يثبط عملية بيروكسدة الدهون التي تحدث ضرراً في نسيج الخصى بفعل الجهد التأكسدي، وبالتالي فإن مضادات الأكسدة الطبيعية تعتبر مواد قوية قادرة على كسح أنواع الأوكسجين الفعالة ROS أو تحييد الجذور الحرة قبل أن تسبب ضرراً لخلايا الجسم⁽²¹⁾.

كما أثبتت النتائج إن الزيوت الأساسية للقرنفل والمجرعة للفئران لمدة 35 يوم وبجرعة 15 ملغم/كغم من وزن الجسم أدت إلى زيادة نسبة التستستيرون في الدم والإنزيمات الفعالة ($\Delta 5$, 3β -HSD and 17β -HSD) ما أدى إلى نجاح عملية الـ spermatogenesis وهي عملية تكوين النطف والـ spermiogenesis وهي عملية حوّل النطف⁽²²⁾. وقد تعود فعالية القرنفل إلى الفلافونيدات وهي مجموعة من المركبات المتعددة الفينول والتي تمتلك فعالية كاسحة للجذور الحرة ومثبطة لإنزيمات الأكسدة والهدرجة إضافة إلى فعلها المضاد للالتهاب⁽²³⁾. ناهيك عن قدرتها على تثبيط الأضرار المستحثة بعمليات الأكسدة و تحمي الخلايا والأنسجة من التأثير الضار لأنواع المتفاعلة من الجذور الحرة⁽²⁴⁾. كما إن إعطاء الزيوت الأساسية للقرنفل بطريقة الحقن في التجويف الخلي للجرذان التي سممت مسبقاً بكلوريد المنغنيز ساعد في إعادة تجديد النبيبات المنوية الرئيسية والخلايا البيئية (خلايا لايدك) وعملية نشأة النطف كما أدى إلى امتلاء النبيبات بالحيوانات المنوية spermatozoa⁽²⁵⁾.

المصادر (References)

- 1- ستاري ، فرانشيسيك و جيراسيك ، فاكلاف . (1986) . الأعشاب الطبية . ترجمة : سعد الدين ، شروق محمد كاظم، الطبعة الأولى ، دار الشؤون الثقافية العامة ، وزارة الثقافة والإعلام ، بغداد.
- 2- Kim , H. M.; Lee, E. H.; Hong, S. H.; Song, H. J.; Shin , M. K. ; S. H. & Shin, T.Y. (1998).Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. J. Ethnopharmacol. , **60**: 125-131.
- 3-Bin Mdderos, M. R. (2008). Production and characterization of extraction oil from natural spices: A comparison study with functional group content of *Zea mays* and *Elaeis guineensis jaco*. oil .Bachelor Thesis, Malaysia Pahang, Univ.
- 4-Curtis E. K. (1990). In pursuit of palliation: oil of cloves in the art of dentistry. Bull. Hist. Dent., **38**:9–14.
- 5-Magaji, R.A. & Yaro, A.H. (2006). Preliminary phytochemical screening of the cold aqueous extract of *Syzygium aromaticum*. Biol. & Environ. Sci. J. Tropics, **3** (1): 4-6.
- 6- Abdel-Wahhab, M.A. & Aly, S.E.(2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. J. Appl. Toxicol., **25**:218-23.
- 7-Hata, T.;Sano, Y. & Sugawara, R. (1956). Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. Int. J. Antibiot., **9**:141–146.

- 8-Iyer, V. & Szybalski, W.(1963). A molecular mechanism of mitomycin action: Linking of complementary DNA strands. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **50**:355-362.
- 9-Layer, V. N. & Saybaiski, W. (1964). Mitomycin and cross- linking of DNA .Sci., **145**:55-58.
- 10- Door , R. (1988). New findings in pharmacokinetic.6 metabolic and drug resistance aspects of Mitomycin-C . Sedmin. Oncol. **15**(3/4):32-43.
- 11-Sato, T.; Onse, Y.; Nagase, H. & Kito, H. (1990). Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against (benzo (a) yrene) in the *Salmonella* assay .J. Mut. Res ., **241**:283-290 .
- 12-Vancleve, J.F.; Salim, B. & Zavos, P.M.(1987) .The Effexy of Mitomycin-C on daily sperm production potential and other spermatogenic parameters in mice. Drug Chem. Toxicol., **10**:275-290.
- 13-Tajuddin ; Ahmed, S. ; Latif , A. & Qasmi, I. A.(2004). Effect of 50% ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) on sexual behavior of normal male rats .J. BMC. Comp. Alt. Med., **4**:1-7.
- 14- Luna, L. G.(1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Linstitute of Pathology.3rd edn. MC. Graw Hill Book Co., New York.
- 15- Kang, Y.H.; Lee, K.A.; Ryu, C.J. & Lee, H.G. (2006). Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. Cancer Lett., **237**: 33-44.
- 16- Kurpisz, .M .; Miesel, R .; Sanocka, D. & Jedrzejc, Z. (1996) .Seminal plasma can be predictive factor for male infertiliy . Human Reprod., **11**:223 – 1226.
- 17- Oboh, G.; Puntel, R.L.& Rocha, J.B.T.(2007). Hot pepper (*Capsicum annum*, Tepin and *Capsicum chinese*, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain-*in vitro*. Food Chem., **102**:178–185.
- 18- Hipler, U.C.; Gornig, M.; Hipler, B.; Romer, W. & Schreiber, G. (2000). Stimulation and scavestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. J. Arch. Androl., **44**: 147 – 154.
- 19- Fernandez-vancleve, J.; Salim, B. & Zavos, P.M.(1987).The effect of mitomycin C on daily sperm production potential and other spermatogenic parameters in mice. Drug Chem. Toxicol., **10**:275-290.
- 20- Shodehinde1 & Oboh, G.(2013). Antioxidant Properties of Aqueous Extracts of Unripe Musa paradisiaca on Sodium Nitroprusside Induced Lipid Peroxidation in Rat Pancreas *In Vitro* Sidiqat Adamson. Asian Pac J. Tropic. Biomed.,**3**(6):449-457.
- 21- Mahdavi R.; Nikniaz Z.; Rafrat M. & Jouyban A.(2010). Determination and comparison of total polyphenol and vitamin C contents of natural fresh and commercial fruit juices. Pak J Nutr., **9**(10):968–972.
- 22- Mishra, R. K. & Singh, S. K.(2008). Safety Assessment of *Syzygium aromaticum* flower Bud (Clove) Extract with Respect to Testicular Function in Mice. Food and Chem. Toxicol., **46** (10): 3333-3338.
- 23- Clavin, M. ; Gorzalczany, S. & Macho, A.(2007). Anti inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. J. Ethnopharmacol., **112**(3):585–589.
- 24-Duthie, S.J.; Collins, A.R.; Duthie, G.G. & Dobson, V.L. (1997). Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human lymphocytes. Mut. Res., **393**:223-231.
- 25- Boudou, F.; Berroukche, A.; Bendahmane-Salmi, M.; Kandouci, B. A.; Adli, D.H. & Tou , N. (2013). Effects of *Syzygium aromaticum* Essential Oil on Fertility in Male Rats Exposed to Manganese. Ameliorative., **3** (4):37412,7 pa