



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية العلوم - قسم علوم الحياة

دراسة نسجية مرضية مناعية لتأثير جسيمات الفضة النانوية والمورينغا في الكبد والكلى لذكور الارانب المعاملة بغذاء عالي الكوليسترول

رسالة

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

مصطفى حمود عبود مهدي

بكالوريوس علوم حياة جامعة كربلاء 2008

بإشراف

أ.م.د. جاسم حنون هاشم العوادي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَعِنْدَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يَعْلَمُهَا إِلَّا هُوَ وَيَعْلَمُ
مَا فِي الْبُرِّ وَالْبَحْرِ وَمَا تَسْقُطُ مِنْ وَرَقَةٍ إِلَّا
يَعْلَمُهَا وَلَا حَبَّةٌ فِي ظُلُمَاتِ الْأَرْضِ وَلَا
رَطْبٌ وَلَا يَابِسٌ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

صدق الله العلي العظيم

سورة الانعام "٥٩"

الإهداء

إلى من لا تدركه الأبصار وهو السميع البصير، له المنّة بما اعطى لعبده من الآت
إستحصال العلم والمعرفة، وحثّه للترقي على سائر المخلوقات بالفكر المؤمن
(وَسَخَّرَ لَكُمْ مَّا فِي السَّمَاوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ
يَتَفَكَّرُونَ) (١٣) الجاثية.

إلى مدينة العلم احمد وبابها الأوحد علي ابن طالب الأمد وألهم الميامين، اهدي
ثمرة جهدي الجهد، معترّ عن قصوري وتقصيري.

إلى الحاضر الى جوار ربه، الغائب عن فتحي هذا، لروحك الطاهرة وطيفك
الحاضر في قلبي دائماً، أخي الشهيد (حسين حمود عبود).

إلى اثنيّية وجودي، وتوأمي روحي، أنفاسهما نبضان فؤادي، امي وابي، لا
تحرمني الله اسعادكما.

إلى قوّتي، وحروف لغتي، سندي وحزام ظهري (إخوتي)

إلى من لا جزاء يليق بها، ولا كلمة تفي دائم فيئها، شريكة النجاحات، ومنتحمة
الصعوبات، سندي في الشدائد وملجأ في الازمات، من لا يكفيني شكرها ..
زوجتي الطيبة الغالية.

إلى ولدي العزيز وفلذة كبدي، حبيبي وصديقي " حسن " أتمنى ان ترتقي المراتب
العليا.

إلى كل من علمني حرفاً، فممكنني عبداً، اساتذتي الأفاضل المتفضلين بكرم العلم،
لمقامهم الكريم.

إلى أصدقائي احمد عباس وعلي الحامد و كل من ساندني وساعدني أسهم في
إنجاح رسالتي.

أجل انها محنة كبيرة ان يكتب الضعيف مثلي كلمات ليرفعها بإهداء متعثر الى
ربه العلي، ورسوله الكريم ووصيه وآله الميامين، واساتذته واهله ذوي الفضل
السابق، لكن كاتبها يتطلّع بوجل الى وجه الله وكل كريم بالقبول المضاعف.

فإليك يا سيدي جهد المقل، برجاء القبول.

والحمد لله

شكر و إمتنان

الحمد لله كما هو أهله، حمداً مستطياً حتى يبلغ الحمد منتهاه، له الشكر أولاً وآخرأً،
والصلاة والسلام على أفضل الخلق أجمعين ابي القاسم محمد وآل محمد الطيبين
الطاهرين.

وبعد؛ من لم يشكر المخلوق، لم يشكر الخالق..

الشكر الجزيل والثناء الجميل للمشرف الفاضل الدكتور (جاسم حنون هاشم العوادى) لما
ابداه من تعاون وما بذل.

الشكر اللائق والثناء المنبسط لجناب الدكتور حيدر علي محمد – كلية الطب البيطري –
جامعة كربلاء لمساعدتي في عمل التحليلات الإحصائية.

الشكر الكبير والامتنان الوفير لجهود الدكتورة لينا اديب مهدي الموقرة.

الشكر والثناء اللائقين بجناب الطبيب البيطري علي وصفي صادق مسؤول البيت
الحيواني – جامعة كربلاء لمساهمته الفاعلة في اكمال تجربتي.

الشكر والاعتزاز لجناب الدكتورة ابتسام عباس ناصر المحترمة

من ثمّ الشكر الأعظم الى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم
الحياة لإتاحتهم لي الفرصة لإكمال دراستي، وتذليل الصعوبات.

والشكر موصول الى مديرية زراعة كربلاء التي منحتني الفرصة للخوض في غمار هذه
التجربة المميزة

الشكر لزملائي الطلبة الذين شاركوني العلم والتعلم، وفاضوا بما لديهم من مساندة
ومعونة.

وأخيراً الى توأمي التكويني والروحي، اقدم الشكر والاعتزاز ووافر الإمتنان الى طالب

الدراسات العليا، اخي (احمد حمود عبود) لدوره الكبير والمساهمة الفاعلة في إنجاز
رسالتي، وتذليل صعوباتها، وإعارته الوقت والجهد والدعم الكامل لي، فله مني مضاعف
الشكر، واتمنى له دوام التوفيق

الباحث : مصطفى حمود عبود مهدي



توصية الأستاذ المشرف

إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع:

الاسم: د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه, أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع :

الاسم: د . خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2021

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية لتقييم التغيرات النسجية والمرضية النسجية المناعية Immunohistopathological الناتجة من تغذية حيوانات التجربة على غذاء عالي الكوليسترول ومن ثم معالجتها بجسيمات الفضة النانوية بالمقارنة مع مستخلص أوراق نبات المورينغا .

استخدم في التجربة (30) من ذكور الارانب ، و قسمت الى ستة مجاميع منها خمس مجاميع جرت تغذيتها لمدة (90) يوماً بعليقة حاوية على 2.5% كوليسترول ، بينما تركت مجموعة السيطرة تتغذى بغذاء اعتيادي .

تم تجريع الحيوانات المغذاة بعليقة حاوية على 2.5 % كوليسترول لمدة 90 يوماً بثلاث تراكيز من جسيمات الفضة النانوية Silver nanoparticles AgNPs (5، 10 و 15 ملغم / كغم من وزن الجسم) ومستخلص اوراق نبات المورينغا بتركيز (200 ملغم / كغم من وزن الجسم) ولمدة 21 يوماً .

وتم سحب 1 مل دم من المجاميع المعاملة بالعليقة الحاوية على 2.5% كوليسترول شهرياً للتأكد من استحداث فرط الكوليسترول في دم حيوانات التجربة وبعد مدة التغذية وبعد مدة التجريع بجسيمات الفضة النانوية AgNPs وكذلك مستخلص أوراق نبات المورينغا . ولغرض اجراء قياس مستوى الدهون في الدم (صورة الدهون Lipid profile) والتي شملت (الكوليسترول الكلي TC, الكلسريدات الثلاثية TG ، البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL ، البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL ، و البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً VLDL) تم سحب 10 مل من كل حيوان من حيوانات التجربة لغرض قياس معايير الدهون بعد التضحية بالحيوانات وانتهاء مدة التجربة .

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في أوزان الحيوانات بعد مدة التغذية للمجاميع التي جرت تغذيتها لمدة (90) يوماً بعليقة حاوية على 2.5% كوليسترول.

اوضحت نتائج الدراسة حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى الدهون في الدم للمجاميع التي جرت تغذيتها لمدة (90) يوماً بعليقة حاوية على 2.5% كوليسترول .

بينت نتائج مجموعة فرط الكوليسترول حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى الكوليسترول والكلسريدات الثلاثية و البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL ، و البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً VLDL مع الاستمرار في تغذيتها بالغذاء عالي الكوليسترول ، بينما

سجلت النتائج حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL .

وسجل حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في مستوى الكوليسترول الكلي بعد فترة التجريع لمجموعات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (5 و 10 ملغم / كغم من وزن الجسم) ، بينما لوحظ وجود انخفاض غير معنوي ($P>0.05$) في مستوى الكوليسترول بعد فترة التجريع لمجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (15 ملغم / كغم من وزن الجسم) وكذلك مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي ($P>0.05$) في مستوى الكليسيريدات الثلاثية لمجاميع المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (5 , 10 و 15 ملغم / كغم من وزن الجسم) و لمدة 21 يوماً بينما لوحظ حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) لمجموعة المعاملة بمستخلص اوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم من وزن الجسم) .

و اوضحت نتائج الدراسة حصول انخفاض غير معنوي ($P>0.05$) في مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة (HDL) لمجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (5 ملغم / كغم من وزن الجسم) ، بينما لوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) لمجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 و 15 ملغم / كغم من وزن الجسم) وكذلك مجموعة المعاملة بمستخلص اوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم من وزن الجسم) لمدة 21 يوماً .

كما بينت النتائج وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في متوسط تركيز البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL في مصل دم الارانب قبل التجريع و بعد مدة التجريع للمجموعات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5 , 10 و 15 ملغم / كغم / وزن الجسم) و مجموعة المعاملة بمستخلص المجموعات المعاملة أوراق نبات المورينغا(200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

و اوضحت نتائج الدراسة عدم وجود فرق معنوي ($P>0.05$) في مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً (VLDL) لمجاميع المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (5 ، و 15 ملغم / كغم من وزن الجسم) لمدة 21 يوماً بينما لوحظ حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) لمجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم من وزن الجسم) و مجموعة المعاملة بمستخلص اوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم من وزن الجسم) .

كما سجلت تغيرات نسجية عديدة في كبد المجاميع التي جرت تغذيتها لمدة (90) يوماً بعليقة حاوية على 2.5% كوليسترول ، وشملت عدم انتظام المظهر الشعاعي للخلايا الكبدية حول الوريد الكبدي وحصول ارتشاح للخلايا اللمفاوية , وحصول تنخر وانتفاخ بعض الخلايا الكبدية فضلاً عن تراكم القطرات الدهنية بأحجام مختلفة في نسيج الكبد .

وفيما يتعلق باكباد الحيوانات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية ومستخلص أوراق نبات المورينغا لمدة 21 يوماً فقد اظهرت عودة المظهر الشعاعي لانتظام الخلايا الكبدية حول الوريد الكبدي وعدم وجود ارتشاح للخلايا الالتهابية ، مع وجود القليل من الخلايا المنتفخة و اعداد اقل من القطرات الدهنية.

اما المقاطع النسجية لكلى الحيوانات التي جرت تغذيتها لمدة (90) يوماً بعليقة حاوية على 2.5% كوليسترول فقد سجلت وجود نزف دموي و توسع النبيبات الكلوية ، وارتشاح الخلايا اللمفاوية ، واحتقان ، فضلاً عن تراكم المواد البروتينية داخل النبيبات الكلوية .

كما أظهرت المقاطع النسجية لكلى الحيوانات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية ومستخلص أوراق نبات المورينغا لمدة 21 يوماً عودة المظهر النسيجي الطبيعي للكلى مع وجود بعض النبيبات الكلوية المتوسعة .

و عززت الدراسة النسجية المناعية نتائج الدراسة وظهرت تلون الانسجة باللون البني دلالة على وجود الساييتوكاينات المناعية المتمثلة بـ $Interleukin\ 6$ و $Interleukin\ 1\beta$.

يمكن الاستنتاج من هذه الدراسة ان استخدام تراكيز منخفضة من جسيمات الفضة النانوية ومستخلص أوراق نبات المورينغا ولمدة 21 يوماً للحيوانات المصابة بفرط الكوليسترول له تأثير في تحسين صورة الدهون Lipid profile في الدم ، علاوة على تحسين المظهر النسيجي للكبد والكلى .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	المحتويات	التسلسل
1	المقدمة	
3	استعراض المراجع	1
3	الكوليسترول	1-1
3	اكتشاف الكوليسترول	1-1-1
4	التركيب الكيميائي للكوليسترول	2-1-1
6	أهمية الكوليسترول	3-1-1
6	أهمية الكوليسترول في الأغذية	1-3-1-1
6	أهمية الكوليسترول في إنتاج الهرمونات والفيتامينات	2-3-1-1
6	إنتاج هرمونات الستيرويد	1-2-3-1-1
7	إنتاج فيتامين D3	2-2-3-1-1
10	أهمية الكوليسترول في إنتاج الأحماض الصفراوية	3-3-1-1
10	وجود الكوليسترول	4-1-1
11	وجود الكوليسترول في الجسم	1-4-1-1
12	وجود الكوليسترول في الأغذية	2-4-1-1
12	تنظيم الكوليسترول	5-1-1
13	التصنيع الحيوي الكوليسترول	1-5-1-1
15	نقل الكوليسترول	2-5-1-1
16	نقل الكوليسترول داخل الخلايا	1-2-5-1-1
16	نقل الكوليسترول عبر البلازما	2-2-5-1-1
17	البروتينات الدهنية	1-2-2-5-1-1

18	خصائص البروتينات الدهنية	1-1-2-2-5-1-1
19	أنواع البروتينات الدهنية	2-1-2-2-5-1-1
23	امتصاص الكوليسترول المعوي	3-5-1-1
23	أكسدة الكوليسترول	4-5-1-1
24	فرط الكوليسترول	2-1
24	أنواع فرط الكوليسترول	1-2-1
24	فرط الكوليسترول الاعتيادي (المكتسب)	1-1-2-1
26	فرط الكولسترول العائلي	2-1-2-1
28	علاج فرط الكوليسترول	2-2-1
29	الجسيمات النانوية	3-1
30	جسيمات الفضة النانوية	1-3-1
31	تصنيع جسيمات الفضة النانوية	1-1-3-1
31	التصنيع الفيزيائي لجسيمات الفضة النانوية	1-1-1-3-1
32	التصنيع الكيميائي الضوئي لجسيمات الفضة النانوية	2-1-1-3-1
32	التصنيع البيولوجي لجسيمات الفضة النانوية	3-1-1-3-1
33	التطبيقات الطبية الحيوية لجسيمات الفضة النانوية	2-1-3-1
34	تأثير جسيمات الفضة النانوية في خفض الكوليسترول في الدم	3-1-3-1
35	المورينغا	4-1
35	خصائص المورينغا	1-4-1
36	اهمية المورينغا	2-4-1

36	استخدامات المورينغا الغذائية	3-4-1
37	استخدامات المورينغا العلاجية	4-4-1
37	أهمية المورينغا في علاج فرط الكوليسترول	5-4-1
39	الكيمياء النسيجية المناعية	5-1
41	المستضدات والأجسام المضادة والـ Epitopes	1-5-1
41	استعادة Epitope (الانتي جين)	2-5-1
41	التعامل مع الأنسجة مباشرة بعد اخذ العينات والتثبيت والمعالجة	3-5-1
42	التخزين المناسب والتعامل مع مقاطع الأنسجة	4-5-1
43	استرجاع الـ Epitope المناسبة والفعالة	5-5-1
44	الاختيار المناسب للأجسام المضادة (أحادية النسيلة مقابل متعددة النسيلة)	6-5-1
46	المواد وطرائق العمل	2
46	المواد والأجهزة المستخدمة	1-2
46	الادوات والمعدات	1-1-2
47	المواد الكيمياوية	2-1-2
48	طرق العمل	2-2
48	حيوانات التجربة	1-2-2
48	تقسيم حيوانات التجربة	1-1-2-2
49	وزن حيوانات التجربة	2-1-2-2
51	التحضيرات	2-2-2
51	تحضير العليقة الحاوية على مادة الكوليسترول	1-2-2-2

51	تحضير جسيمات الفضة النانوية	2-2-2-2
51	تحضير مستخلص المورينغا	3-2-2-2
52	تحضير محلول Harris's Haematoxylin	4-2-2-2
52	تحضير محلول Eosin	5-2-2-2
52	الفحوصات الكيميائية الحيوية	3-2-2
52	قياس مستوى الكوليسترول الكلي في الدم	1-3-2-2
54	قياس مستوى الكليسيريدات الثلاثية في الدم	2-3-2-2
55	قياس مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة HDL في الدم	3-3-2-2
57	قياس مستوى البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL و البروتين الدهني منخفض الكثافة جداً VLDL في الدم	4-3-2-2
58	عينات الدم	4-2-2
58	تشريح الحيوانات	5-2-2
59	تحضير المقاطع النسيجية	5-2-2
61	فحص وتصوير المقاطع النسيجية	6-2-2
61	بروتوكول تصبغ HIC	7-2-2
62	تحضير المقاطع النسيجية المناعية الكيميائية (IHC)	1-6-2-2
66	الاحصاءات	7-2-2
67	النتائج والمناقشة	3
67	التغيرات الوزنية	1-3
67	التغير في وزن الجسم	1-1-3

71	التغير في وزن الاعضاء	2-1-3
73	التغير في مستوى الدهون	2-3
73	التغير في مستوى الكوليسترول الكلي Total T.C. Cholesterol في مصل الدم	1-2-3
73	التغير في مستوى الكليسيريدات الثلاثية الكلي T.G في مصل الدم	2-2-3
74	التغير في مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL في مصل الدم	3-2-3
74	التغير في مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL في مصل الدم	4-2-3
75	التغير في مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة VLDL في مصل الدم	5-2-3
80	الدراسة النسجية	3-3
80	التغيرات في نسيج الكبد	1-3-3
87	التغيرات في نسيج الكلية	2-3-3
94	الدراسة المناعية في النسجية	4-3
94	دراسة انترلوكين IL1 β	1-4-3
102	دراسة انترلوكين IL6	2-4-3
109	الاستنتاجات والتوصيات	4
109	الاستنتاجات	1-4
110	التوصيات	2-4
111	المصادر	

قائمة الاشكال

الصفحة رقم	الشكل	التسلسل
5	التركيب الكيميائي للكوليسترول	1-1
8	الهرمونات المشتقة من الكوليسترول	2-1
9	انتاج فيتامين D3 من الكوليسترول	3-1
50	مخطط التجربة	1-2
82	مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات السيطرة السالبة يوضح الشكل الطبيعي لمكونات الكبد	1-3
82	مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول)	2-3
83	مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (5 ملغم / كغم)	3-3
83	مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (10 ملغم / كغم)	4-3
84	مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (15 ملغم / كغم)	5-3
84	مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم)	6-3
89	مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة	7-3
89	مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول)	8-3
90	مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم)	9-3
90	مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم)	10-3
91	مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم)	11-3
91	مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (5 ملغم / كغم)	12-3
96	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة	13-3
96	مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول)	14-3

97	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم)	15-3
97	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم)	16-3
98	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم)	17-3
98	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة يمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم)	18-3
103	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة	19-3
103	مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول)	20-3
104	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم)	21-3
104	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم)	22-3
105	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم)	23-3
105	مقطع مستعرض في كبد وكلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة يمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم)	24-3

قائمة الجداول

رقم الصفحة	الجدول	التسلسل
12	نسبة الكوليسترول بالملغرام لكل 100 غرام من الطعام في بعض الاغذية	1-1
13	كفاءة النسيج في تكوين الكوليسترول في بعض أعضاء الجسم	2-1
18	خصائص الفئات المختلفة من البروتينات الدهنية Lipoproteins	3-1
46	جدول (1- 4) تفسير نتائج المقاطع النسجية بثلاث مستويات	4-1
46	الادوات والمعدات والشركات المصنعة لها	1-2
47	المواد الكيميائية او المحاليل والشركات المصنعة لها	2-2
68	اوزان جسم الارانب المعاملة قبل التغذية قبل التجريع وبعد التجريع	1-3
72	الفرق في اوزان الأعضاء بالمقارنة مع مجموعة السيطرة	2-3
76	الفرق في مستوى معايير الدهون في مختلف مجموعات المعاملة قبل التغذية وقبل التجريع وبعد التجريع	3-3
95	التعبير عن انترلوكين $IL-1\beta$ في سايتوبلازم والغشاء الخلوي لأنسجة كبد الارانب	8-3
95	التعبير عن انترلوكين $IL-1\beta$ في سايتوبلازم والغشاء الخلوي لأنسجة كلى الارانب	9-3
102	التعبير عن انترلوكين $IL-6$ في سايتوبلازم والغشاء الخلوي لأنسجة كبد الارانب	10-3
102	التعبير عن انترلوكين $IL-6$ في سايتوبلازم والغشاء الخلوي لأنسجة كلى الارانب	11-3

قائمة المختصرات

المعنى	الاختصار
3-Aminopropyltriethoxysilane	APTS
Alkaline phosphatase	AP
Antibody	Ab
Antigen retrieval	AR
Antigens	Ag
Cholesteryl ester	CE
Cholesteryl ester transfer protein	CETP
Chylomicrons	CM
Chylomicrons	CM
Coronary artery disease	CAD
Diaminobenzidine	DAB
Familial hypercholesterolemia	FH
Formalin fixed - paraffin embedded	FFPE
Heat-induced epitope retrieval	HIER
High density lipoprotein-cholesterol	HDL
Horseradish peroxidase	HRP
Hydroxy methyl glutaryl CoA	HMG-CoA
Immunohistochemistry	IHC
Interleukin 1 Beta	IL-1 β
Interleukin 6	IL-6
Intermediate-density lipoprotein	IDL
Lecithin-cholesterol acyltransferase	LCAT
Lipoprotein lipase	LPL

Low density lipoprotein-cholesterol	LDL
National cholesterol education program	NCEP
Non-alcoholic fatty liver disease	NAFLD
Nonalcoholic steatohepatitis	NASH
Peripheral vascular disease	PVD
Polyunsaturated fatty acid	PUFA
Proteolytic enzyme-induced epitope retrieval	PIER
Reactive oxygen species	ROS
Silver nanoparticles	Ag-NPs
Total cholesterol	T.C
Triglyceride	T.G
Tumor necrosis factor	TNF
Very low density lipoprotein-cholesterol	VLDL



المقدمة

Introduction



Introduction

المقدمة

يُعرّف فرط كوليسترول الدم بأنه ارتفاع مفرط في مستوى الكوليسترول في الدم ، وهو عامل خطر للعديد من الامراض القلبية ، و تعد مستويات الكوليسترول الإجمالية التي تزيد عن 200 مجم /ديسيلتر كعامل خطر لتطور امراض القلب والاعوية الدموية (Sacks *et al.*, 2017).

تم توجيه اهتمام كبير نحو تقييم الآليات التي قد يؤثر بها فرط كوليسترول الدم على الأوعية الدموية ، فكان لا بد من تطوير العلاجات المباشرة لخفض الكوليسترول والتدخلات البديلة لتحسين وظائف الأوعية الدموية ، و يمكن أن تكون العلاجات التداخلية الفعالة صعبة لأن بعض عوامل الخطر (التأثيرات الجانبية) لا يمكن تجاهلها ببساطة ، ومع ذلك ، فإن بعض خيارات علاج فرط كوليسترول الدم أصبحت مستخدمة على نطاق واسع ، بما في ذلك العلاجات الصيدلانية التي يمكن أن تقلل الكوليسترول عن طريق منع تكوينه في الكبد أو امتصاصه في الأمعاء . (Stapleton *et al.* , 2010) .

أشارت بعض التقارير في السنوات الاخيرة الى قدرة الجسيمات النانوية على خفض مستوى الدهون في الدم مثل (جسيمات الفضة ، الذهب والزنك) ، وتعرف جسيمات الفضة النانوية (Ag Nanoparticles) بأنها جسيمات يقل حجمها عن 100 نانومتر ، و نظراً لأبعادها ، فإنها تتمتع بخصائص فيزيائية وكيميائية ويمكن أن تتخلل الخلايا وتتداخل مع عملياتها الطبيعية ولها تأثيرات كبيرة مضادة للميكروبات ، فضلاً عن ذلك تعد جسيمات الفضة النانوية منتجات قيمة في تقنيات النانو والتي لها تطبيقات واسعة في العلوم الطبية ، استخدمت الجسيمات النانوية في مجالات مختلفة مثل الطب والزراعة وعلم الصيدليات وغيرها (Razavian & Masaimanesh, 2014 ; Jorkesh *et al.* , 2016)

أشارت دراسة أجريت من قبل (Al-Dujaili & Al-shemeri , 2016) ، إلى أن جسيمات الفضة النانوية تسهم في تحسن مظهر دهون الدم وتعويض الطاقة والإجهاد التأكسدي ونسبة السكر في الدم ، و أن إعطاء جسيمات الفضة النانوية كان فعالاً في تقليل كمية الدهون الثلاثية في الدم لدى حيوانات التجارب .

في الأونة الأخيرة اثبتت دراسة انخفاض مستوى الكوليسترول بالدم باستخدام الجسيمات النانوية من حيث قدرتها على أكسدة الدهون في الجسم ، ولذلك كانت استعمال جسيمات الفضة النانوية فعالة في تقليل كمية الدهون الثلاثية في الدم (Sulaiman *et al.*,2015) .

اثبتت دراسة ان تناول Ag Nanoparticles عن طريق الفم تسبب أكسدة الدهون و عليه يجب أن يكون الترشح المحيطي للجسيمات النانوية تأثير بيولوجي مكثف على حالة التأكسد . يمكن أن يؤدي التعرض لـ AgNP إلى تغيير نسبة الدهون في الدم وان التغذية بـ AgNP لها تأثير في خفض دهون الدم مع انخفاض مستوى الدهون الثلاثية في الدم (Guyton & Hall , 2006) .

وبجانب اخر، استعمل مستخلص أوراق نبات المورينغا لدراسة قدرتها في خفض مستوى الدهون وتأثيرها على انسجة الكبد والكلية لحيوانات التجربة ، اذ اشارت الدراسات ان استخدام مستخلص أوراق نبات المورينغا لعلاج فرط الكوليسترول كان له تأثير واضح في خفض نسبة الكوليسترول في الدم ، وكمكمل غذائي يمكن وصفه للمرضى المصابين بأمراض الشريان التاجي جنباً إلى جنب مع الأدوية العادية (El-Rabey *et al.*,2018;Yunita *et al.*,2021) .

كما يؤدي نبات المورينغا إلى خفض مستوى الكوليسترول بالدم وذلك لأنها غنية بالستيرولات النباتية Phytosterols, حيث يمتلك السيترول النباتي خصائصاً كيميائية مشابهة الى درجة كبيره للكوليسترول والتي تمكنه من منع امتصاص الكوليسترول عن طريق التنشيط التنافسي (Mannock *et al.*,2015) .

أهداف البحث:

بالنظر لكون ارتفاع الدهون ومايصاحبه من عواقب صحية وخيمة ناتجة من العادات الغذائية غير الصحيحة و لأهمية خفض مستوى الدهون في الدم ولمنع تطور الاعتلالات المصاحبة لفرط الكوليسترول . فقد هدفت الدراسة الحالية الى معرفة تأثير الكوليسترول في الدم وبعض انسجة الجسم وأعضاءه كالكبد والكلية ، ومدى تقليل الاثار الناجمة عن الكوليسترول باستخدام جسيمات الفضة النانوية بالمقارنة مع مستخلص أوراق نبات المورينغا ويمكن تحقيق ذلك عن طريق تحقيق المحاور الآتية:

1. استئثاره فرط الكوليسترول في حيوانات التجربة من خلال تغذيتها على غذاء عالي الكوليسترول بتركيز 2.5% من وزن العليقة ولمدة ثلاثة اشهر .
2. تحديد التركيز الأفضل لجسيمات الفضة النانوية والذي يساهم في خفض كوليسترول الدم ويقلل من اثاره في أعضاء الجسم وانسجة الكبد والكلية .
3. دراسة معايير الدهون في الدم (الكوليسترول الكلي T.C , الكليسيريدات الثلاثية T.G , البروتين الدهني عالي الكثافة HDL , البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL والبروتين الدهني منخفض الكثافة جداً VLDL) .
4. دراسة نسجية ومرضية نسجية مناعية لتأثير جسيمات الفضة في أعضاء الكلية والكبد لحيوانات التجربة بعد معالجتها بجسيمات الفضة النانوية ومستخلص أوراق نبات المورينغا .



الفصل الاول

استعراض المراجع

**Literature
Review**



Literatures Review

1 - استعراض المراجع

Cholesterol

1-1 الكوليسترول

يعد الكوليسترول أكثر أنواع الدهون انتشاراً بسبب ارتباطه القوي بأمراض القلب والأوعية الدموية عند ارتفاع نسبه في الدم ، كما ويعد الكوليسترول كجزء أساسي في العديد من الحيوانات، إذ يمكن لجميع الخلايا تصنيعه من اسلاف بسيطة (Nelson et al., 2017) .
و كحول ستيرويد ، يعد الكوليسترول موجود حصراً في الحيوانات ويتواجد في جميع الخلايا وسوائل الجسم تقريباً ويعد الكوليسترول المادة الأساس للعديد من الإستيرويدات المهمة من الناحية الفسيولوجية بما في ذلك الأحماض الصفراوية والهرمونات الستيرويدية (صفحة رقم 6) . (Crook , 2012)

Discovery of cholesterol

1-1-1 إكتشاف الكوليسترول

إن كلمة الكوليسترول مشتقة من الكلمات اليونانية Chole (صفراء) وStero (صلب) وOL (الكحول) (Vasudevan et al.,2011) . وسمى العالم Chevreul (1816) هذه المادة بالكوليسترين cholesterine ولكن اسم الكوليسترول اعتمد من قبل الباحثين الفرنسيين والإنجليز عندما أظهر Berthelot عام (1859) أن الكوليسترين cholesterine كان عبارة عن كحول ، وبحلول الأربعينيات من القرن التاسع عشر ظهر أن المركب المعروف الآن باسم الكوليسترول هو مكون طبيعي للعديد من الأنسجة الحيوانية ، وفي عام 1843 اشار فوغل Vogel أنه يسبب امراض تصلب الشرايين البشرية ، ثم في السنوات الأولى من القرن العشرين تم تطوير طرق القياس اللونية واستخدام الجاذبية البسيطة نسبياً لفحص الكوليسترول في البلازما والأنسجة ، إن توفر هذه الأساليب للعمل الروتيني قد فتح الطريق لدراسة الكوليسترول من قبل الأطباء وعلماء الأمراض وعلم الأوبئة، فصنّف الكوليسترول كمسؤول إلى حد كبير فيما يتعلق بصحة الإنسان والمرض ، اما الآن فقد اصبح لدينا معلومات أكثر عن الكوليسترول وعن الدهون الأخرى ، حيث كان أول تقرير دقيق عن هذه المادة هو تقرير تانريت Tanret عام (1889) الذي عزل مركباً بلورياً يشبه الكوليسترول من بذور الجاودار Rye seeds المصابة بالإيرغوت Ergot واطلق عليه اسم الإيرجوسترين Ergosterine (المعروف الآن باسم الإيرجستيرول Ergosterol) ، وفي عام 1906، قام Windaus وHauth بعزل Calabar من حيوب (Physostigma venenosum) وهي مادة شبيهة بالكوليسترول والتي قاموا بتسميتها Stigmasterin ، تم عزل عدد كبير جداً من "الستيرولات" الأخرى من الجزء غير

القابل للتصبن (Nonsaponifiable) الذي تم الحصول عليه من أجزاء مختلفة من النباتات (Myant, 1981) .

تم اعلان البنية الكاملة للكوليسترول من قبل هينريكيولاند Heinrich Wiel & في عام 1918 الذي حصل على جائزة نوبل في عام 1927 (Vasudevan et al., 2011) .

2-1-1 التركيب الكيميائي للكوليسترول

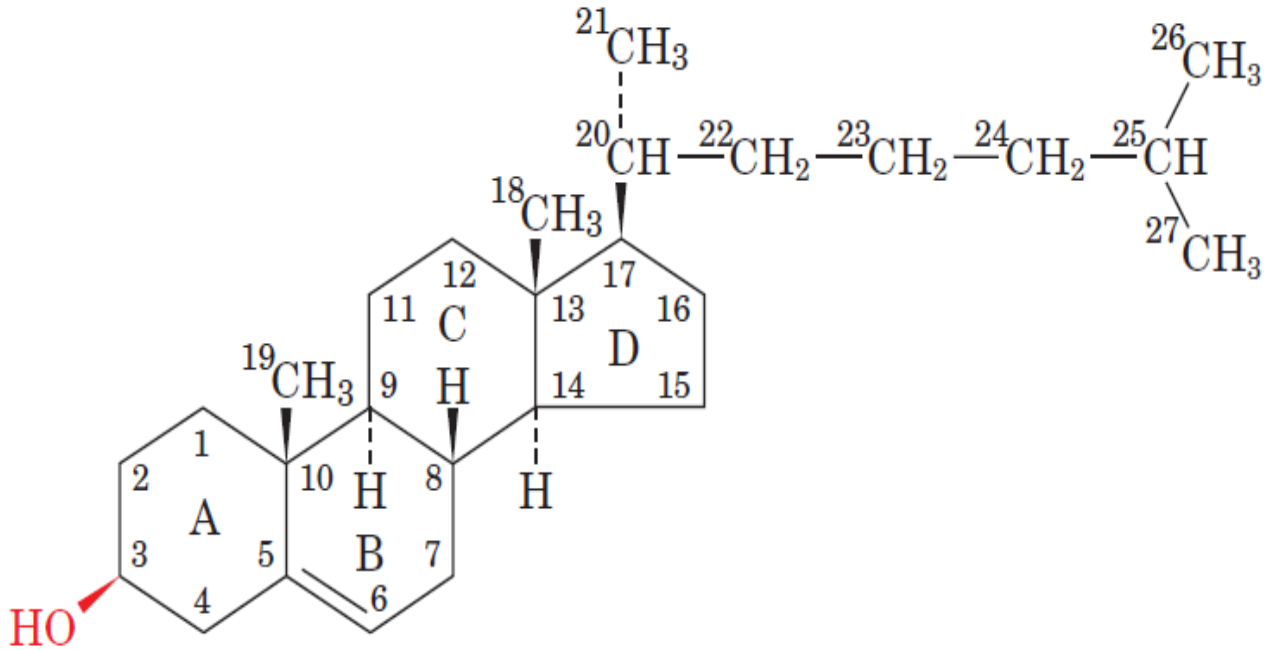
Chemical structure of cholesterol

ان الكوليسترول مادة صلبة بلورية صفراء خفيفة عندما يتم فحصها تحت المجهر، فإنها تظهر مظهراً مسنناً ، ويعد الستيرويد الحيواني الأكثر أهمية الذي تتشكل منه مركبات الستيرويد الأخرى (Vasudevan et al., 2011) .

يوجد الكوليسترول كحبيبات بيضاء أو صفراء باهتة خالية من الرائحة ورقية الشكل أو حبيبية الشكل. الكوليسترول غير قابل للذوبان في الماء ولكن قابل للذوبان في الكحول بشكل معتدل وقابل للذوبان ايضاً في الأثير، والكلوروفورم، والكحول الساخن، وخلات الأيثيل والزيوت النباتية. يتبلور الكوليسترول بسهولة من المحاليل على شكل صفائح عديمة اللون ومعينية الشكل مع واحد أو أكثر من التلمات المميزة في الزاوية (Vasudevan et al., 2013) .

ويعد الكوليسترول مركب كاره للماء ، ويتكون من أربع حلقات هيدروكربونية مدمجة مع بعضها يمكن تسميتها (A-B-C-D) تدعى مجتمعة بـ "نواة الستيرويد". للكوليسترول سلسلة هيدروكربونية متفرعة من ثمانية ذرات كربون متصلة بذرة رقم (17) من الحلقة D من نواة الستيرويد ، اذ تحتوي الحلقة A على مجموعة هيدروكسيل عند ذرة الكربون رقم (3) ، اما الحلقة B لها رابطة مزدوجة بين ذرة الكربون رقم (5) وذرة الكربون رقم (6) شكل (1-1) (Chatterjea & Shinde ,2011) .

ويشمل التركيب الكيميائي للكوليسترول هما :-



الشكل (1-1) يوضح التركيب الكيميائي للكوليسترول (Chatterjea & Shinde, 2011)

Sterol

أ. الستيروول

تم تصنيف الإستيرويدات التي تحتوي على ثماني إلى عشر ذرات كربون في السلسلة الجانبية عند ذرة الكربون رقم (17) ومجموعة الهيدروكسيل في ذرة الكربون رقم (3) على أنها ستيروولات (Sterols) حيث يعد الكوليسترول هو الستيروول الرئيسي في الأنسجة الحيوانية (Harvey & Ferrier, 2011).

Cholesteryl esters

ب. أسترات الكوليسترول

ان معظم الكوليسترول في البلازما يكون في صورة أستر (مع حمض دهني مرتبط بذرة الكربون رقم (3) مما يجعل هذا التركيب أكثر كراهة للماء من الكوليسترول الحر (غير المؤستر) ، وتعد أسترات الكوليسترول تراكيب غير موجودة في الأغشية وعادة ما تكون موجودة فقط بمستويات منخفضة في معظم الخلايا ، يجب ان ينتقل الكوليسترول وإستراته بالاقتران مع البروتين كميكون من جزيء البروتين الدهني أو يتم إذابته بواسطة الدهون الفوسفورية والأملاح الصفراوية في الصفراء بسبب كراهيته الشديدة للماء (Harvey & Ferrier, 2011).

The importance of cholesterol

3-1-1 أهمية الكوليسترول

يعد الكوليسترول مقدمة التمثيل الغذائي لهرمونات الستيرويد ، ان معظم الخلايا تستهلك الكوليسترول وذلك عن طريق تحويله إلى هرمونات الستيرويد أو الى الأحماض الصفراوية ، لكن جميع الخلايا بحاجة إلى الكوليسترول للحفاظ على سيولة اغشيتها (Voet & Voet, 2011) .

1-3-1-1 أهمية الكوليسترول في الاغشية

The Importance of Cholesterol In Membranes

ان الكوليسترول عبارة عن دهون شحمية وعليه فهو مكون هيكلي أساسي للأغشية (Rodwell et al., 2018) . الكوليسترول بحد ذاته لا يشكل طبقة ثنائية وعليه سوف يعمل على التقليل من سيولة الاغشية الحيوية بالقرب من سطح الاغشية وذلك لأن نظام الحلقة الستيرويدية الصلبة للكوليسترول تتداخل مع حركة ذبول الأحماض الدهنية التي سوف تصبح أكثر ترتيباً ، نظراً لأن الكوليسترول لا يمتد عبر الاغشية بشكل ابعده من معظم الدهون فإنه ، يعمل أيضاً بمثابة فاصل يسهل زيادة حركة ذبول الأحماض الدهنية بالقرب من النهايات الميثيلية ، و يوسع الكوليسترول أيضاً نطاق درجة الحرارة للانتقال المنتظم وغير المنتظم ، و يثبط الكوليسترول تبلور ذبول الأحماض الدهنية (التجميع التسهمي في مصفوفات مرتبة) عن طريق تركيبها فيما بينها ، وهكذا يعمل الكوليسترول كنوع من المُلدنات الغشائية. (Voet & Voet, 2011)

2-3-1-1 أهمية الكوليسترول في انتاج الهرمونات والفيتامينات

The importance of cholesterol in the production of hormones & vitamins

1-2-3-1-1 انتاج هرمونات الستيرويد

Production of steroid hormones

تشمل الستيرويدات المشتقة من الكوليسترول في الحيوانات خمس عائلات من الهرمونات (الأندروجينات Androgens ، والإستروجين Estrogens ، والبروجستين Progestins ، والقشرانية السكرية Glucocorticoid ، والقشرانية المعدنية

(Mineralocorticoid) وكلها محبة للدهون وقابلة للذوبان في الماء فضلاً عن الأحماض الصفراوية شكل (1-2) . (Amenyogbe *et al.*, 2011 ; Vasudevan *et al.*, 2020)

الأندروجينات مثل (هرمون التستوستيرون Testosterone) والإستروجينات Estrogens مثل (هرمون استراديول) تسهم في تطوير الخصائص الجنسية والوظائف الجنسية في الحيوانات ، بينما يسهم البروجستين مثل (هرمون البروجسترون) في السيطرة على الدورة الشهرية والحمل ، تشارك الهرمونات القشرية السكرية مثل (هرمون الكورتيزول) في التحكم في ايض الكربوهيدرات والبروتينات والدهون ، و تنظم هرمونات القشرانية المعدنية توازن املاح (الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم في الأنسجة Macdonald & Chaney, 2007).

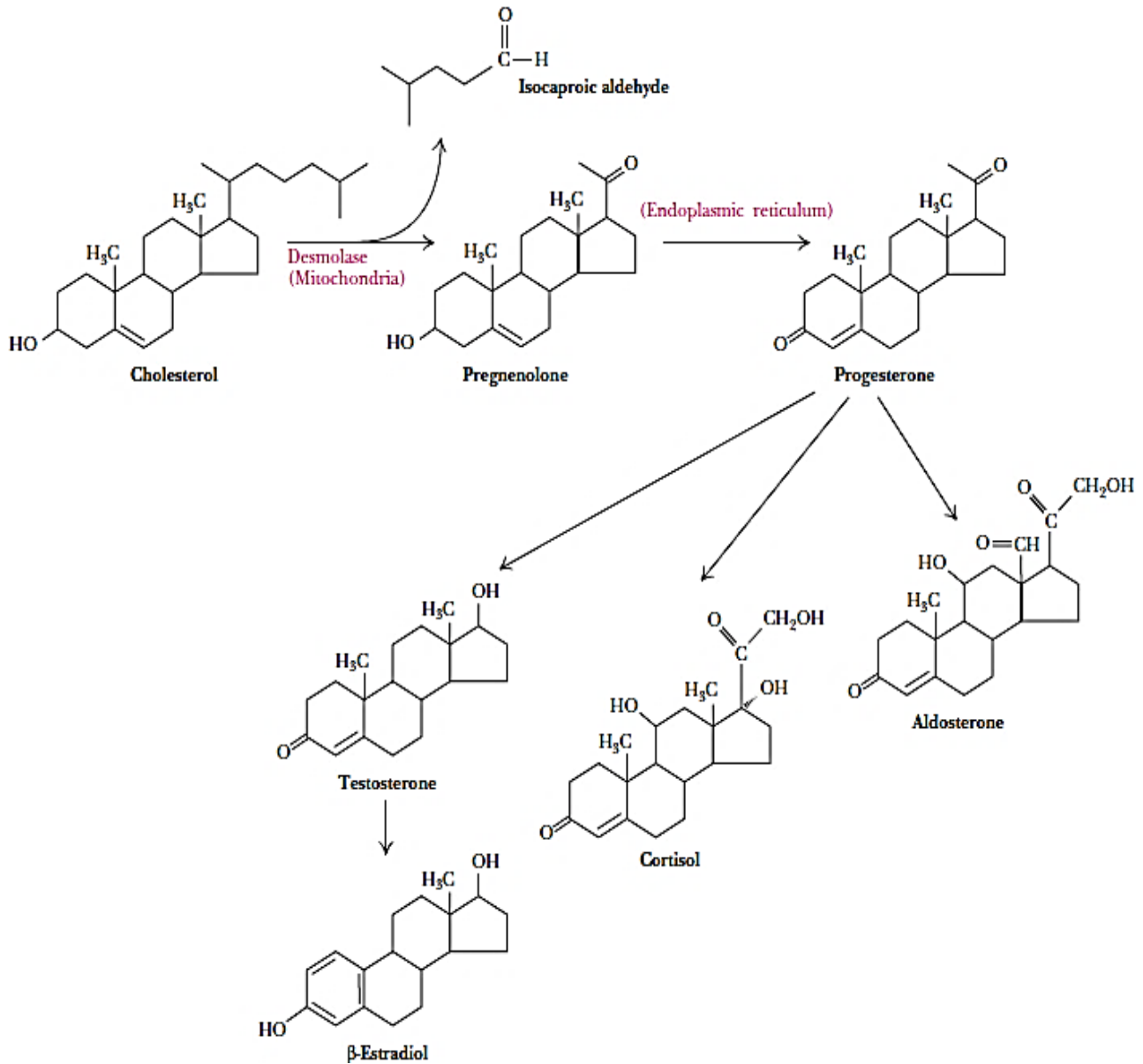
الأنسجة المنتجة للهرمونات الستيرويدية مثل المشيمة والمبيضين والخصيتين والقشرة الكظرية وكذلك الغدد التناسلية وغيرها (Harvey & Ferrier, 2011 ; Nelson *et al.*, 2017)

Production of vitamin D3

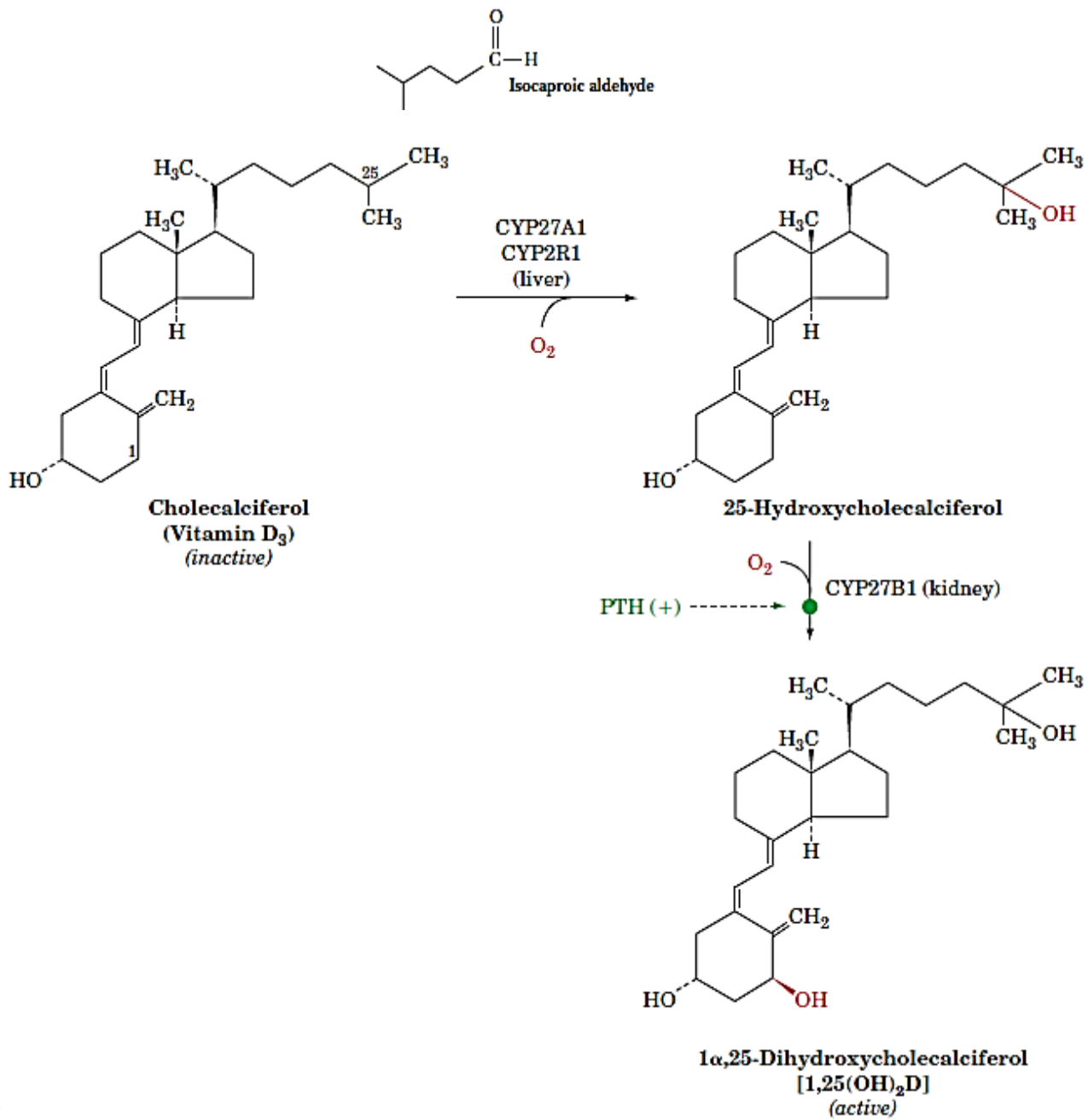
1-1-3-2-2 انتاج فيتامين D3

يتكون فيتامين D3 من 7-dehydro-cholesterol (Vasudevan *et al.*, 2011) . بينما يتكون 7-dehydro-cholesterol عن طريق الغشاء المخاطي للأمعاء ثم ينتقل إلى الجلد حيث المكان يتم تفعيل فيتامين D3 فيه عن طريق الأشعة فوق البنفسجية الشمسية. (Chatterjea & Shinde, 2011)

يُشتق فيتامين D3 من 7-dehydro-cholesterol بفعل الأشعة فوق البنفسجية ، ويعد الـ 7-dehydro-cholesterol وسيط من مسار ثانوي لتخليق الكوليسترول المتوفر في طبقة مالبيجي Malpighian من البشرة ، بينما في الجلد ، تكسر الأشعة فوق البنفسجية (290-315 نانومتر) الرابطة بين الموضعين 9 و 10 من حلقة الستيرويد ، لذلك يتم فتح الحلقة B لتشكيل البروفيتامين سيكوستيروول Secosterol ، ان الرابطة المزدوجة cis بين ذرات الكربون 5 و 6 تتحول إلى رابطة مزدوجة متحولة trans (أي الدوران على ذرة الكربون السادسة) لتكوين فيتامين D3 أو Cholecalciferol ، لذلك يسمى فيتامين D "فيتامين اشعة الشمس". (Vasudevan *et al.*, 2011)



الشكل (1-2) الهرمونات المشتقة من الكوليسترول (Vasudevan *et al.*, 2011)



الشكل (1-3) انتاج فيتامين D3 من الكوليسترول (Vasudevan *et al.*, 2011)

1-1-3-3 أهمية الكوليسترول في إنتاج الأحماض الصفراوية

The importance of cholesterol in the production of bile acids

الأحماض الصفراوية عبارة عن جزيئات غير محبة للماء Amphiphilic يتم تصنيعها من الكوليسترول في الكبد ، ويتم تخزينها في المرارة ولاحقاً تطلق في الأمعاء بعد تناول الطعام عن طريق إذابة الجزيئات المحبة للدهون ، ولذلك فهي تعزز إفراز الدهون الصفراوية Biliary lipid وامتصاص الدهون المعوية Intestinal fat ، و عبر امتصاصها النشط اللاحق في الأمعاء الدقيقة واسترجاعها في الكبد ، يتم الحفاظ على حجم تجمع الأحماض الصفراوية ، و يتم معادلة نسبة تصنيع الأحماض الصفراوية من الكوليسترول في الكبد عن طريق تدفق الأحماض الصفراوية عبر هذا الدوران المعوي الكبدي (Straniero et al., 2020) . يتم تصنيع أملاح الصفراء بواسطة الكبد حيث يتم استخدام الكوليسترول كمواد أولية وحسب الخطوات التالية :-

1. عمليات (إضافة مجموعة الهيدروكسيل Hydroxylation وتقصير سلسلة الهيدروكربون وإضافة مجموعة الكربوكسيل) تعمل على تحويل الكوليسترول عن طريق سلسلة معقدة من التفاعلات إلى الأحماض الصفراوية bile acids وحمض الكوليك cholic acid وحمض كينو ديوكسيكوليك chenodeoxycholic acid .
2. تقترن هذه احماض بالجلاليسين أو التورين في الكبد لتشكل الاملاح الصفراوية المختلفة وهي منظفات فعالة للغاية.
3. يتم إفراز الأملاح الصفراوية إما مباشرة في الاثني عشر أو يتم تخزينها في المرارة لاستخدامها في استحلاب الدهون الغذائية أثناء الهضم.
4. يتم التخلص من الصفراء إما على شكل أملاح صفراوية أو كولسترول بحد ذاته هو الآلية الرئيسية للجسم لإفراز الكوليسترول (Macdonald & Chaney, 2007) .

The presence of cholesterol

4-1-1 وجود الكوليسترول

هناك مصدران محتملان للكوليسترول في جسم الكائن الحي: الأول من النظام الغذائي والثاني هو تصنيع الكوليسترول ، ومن المنظور الغذائي يوجد الكولسترول بشكل ملحوظ في الدهون الحيوانية والتي هي مزيج معقد من الدهون الثلاثية ، لذلك فان جميع الأطعمة التي تحتوي على الدهون الحيوانية تكون حاوية على الكوليسترول بنطاقات مختلفة (Clayton , 1998).

ان حوالي 20-25% من إجمالي إنتاج الكوليسترول اليومي يحدث في الكبد ، في حين أن الأعضاء التناسلية والغدد الكظرية والأمعاء هي مواقع أخرى ذات معدلات تخليق عالية ، ويقوم الكبد بتحويل الكربوهيدرات والأحماض الدهنية إلى الدهون الثلاثية والتي تعبئ في البروتينات الدهنية ليتم تسليمها الى الأنسجة المختلفة ، ويعد الكبد مصدر للستيروول (Farnaghi,2017).

تحتوي النباتات على القليل من الكوليسترول ، و مكونات الستيروول الأكثر شيوعاً في الاغشية النباتية هي ستيغماستيروول Stigmasterol وبيتا سايتوستيروول β -sitosterol والتي تختلف عن الكوليسترول فقط في سلاسلها الجانبية الأليفاتية ، بينما تحتوي الخميرة والفطريات على ستيروولات غشائية أخرى مثل Ergosterol [الذي يحتوي على رابطة مزدوجة بين ذرة الكربون رقم (7) و ذرة الكربون رقم (8)] ، وكذلك تحتوي بدائيات النواة على القليل من الستيروول باستثناء الميكوبلازما (Voet & Voet, 2011) .

1-4-1-1 وجود الكوليسترول في الجسم

The presence of cholesterol in the body

ان الكوليسترول موجود في جميع الأنسجة الحيوانية وخاصة في الأنسجة العصبية وهو مكون رئيسي للأغشية الخلوية ، و هو أحد مكونات الصفراء وعليه فهو موجود في حصوات المرارة (Koolman & Roehm, 2005) . يتواجد معظم الكوليسترول الخلوي في الغشاء البلازمي حيث يشكل 35% إلى 45% من جزيئات الدهون (Soccio & Breslow, 2004) .

ويمكن لجميع الخلايا المنواة تقريباً (بما في ذلك جدران الشرايين) تصنيع الكوليسترول و يتم توزيعه على نطاق واسع في الجسم ، فمثلاً جسم رجل وزنه 70 كجم يتوفر فيه ما مجموعه حوالي 140 جم من الكوليسترول ويكون توزيعها بشكل تقريبي كالآتي (30 جم في الدماغ والأعصاب، 30 جم في العضلات، 30 جم في الأنسجة الدهنية، 20 جم في الجلد، 10 جم في الدم، 10 جم في الكبد والطحال، 5 جم في نخاع العظام، 3 جم في الامعاء ، و2 غرام في الغدة الكظرية (Vasudevan et al., 2011) .

ويوجد الكوليسترول أيضا في الاغشية الداخلية للأعضاء ، وكذلك يوجد الكوليسترول أيضا في خمس عوائل هرمونية حيث يعد الكوليسترول المادة الأساس لتصنيع الهرمونات الستيرويدية (Garrett & Grisham , 2010) .

1-1-4-2 وجود الكوليسترول في الأغذية

The presence of cholesterol in foods

يوجد الكوليسترول بنسب متفاوتة في الأطعمة والتي يتم تناولها في الوجبات الغذائية ويمكن تلخيص بعض الأطعمة ونسب الكوليسترول في الجدول (1-1) جدول (1-1) يبين نسبة الكوليسترول بالملغرام لكل 100 غرام من الطعام في بعض الاغذية (موقع www.ldlhdlcholesterollevels.org)

ت	نوع الغذاء	نسبة الكوليسترول بالملغرام لكل 100 غرام من الطعام
1	المخ	2100
2	صفار البيض	1500
3	كبد الدجاج	746
4	كلية العجل والخروف	375
5	كبد العجل والخروف	300
6	السمن الحيواني او الزبدة	250
7	الجمبري - القريدس	150
8	السردين المعلب	120
9	الجبنه الشيدر ومعظم الاجبان كاملة الدسم	100
10	اللوبيستر - الروبيان	100
11	اللحم السمين	95
12	الهمبرغر	75
13	لحم الدجاج	70
14	لحم السمك	70
15	الاييس كريم	65

Cholesterol regulation

1-1-5 تنظيم الكوليسترول

يعد توازن الكوليسترول عملية منظمة بإحكام تتضمن آليات دقيقة ، ومنها عمليات (التصنيع ، والامتصاص ، والنقل بواسطة جزيئات البروتين الدهني ، والتدفق الخلوي ، والتحويل

إلى هرمونات الستيرويد في الأنسجة الستيرويدية ، أو إلى أملاح الصفراء في خلايا الكبد كما تمت الإشارة إليها سابقاً ، وعليه فان المحافظة على توازن الكوليسترول يعد أمراً بالغ الأهمية لأن الزيادة في الكوليسترول الخلوي الحر يعد سام للخلايا وعليه يؤدي إلى موت الخلايا (Ballantyne , 2015) .

1-5-1-1 التصنيع الحيوي الكوليسترول Cholesterol biosynthesis

وصف السير جون كورنفورث John Cornforth وفلاديمير بريلوج Vladimir Prelog مسار التخليق الحيوي و كلاهما حصل على جائزة نوبل في عام 1975 ، وان عملية التخليق الحيوي للكوليسترول يتم تنظيمها عن طريق التركيز داخل الخلايا للكوليسترول الحر في خلايا الكبد (Vasudevan et al.,2011).

ان جميع الأنسجة تصنع الكوليسترول , ويعد الكبد هو الموقع الرئيسي لتخليق الكوليسترول كما ان بعض الأنسجة الأخرى تنشط بهذا الصدد على سبيل المثال تكون قشرة الغدة الكظرية والغدد التناسلية والجلد والأمعاء أكثر نشاطاً من الأنسجة الدهنية والعضلات والأورطي والأنسجة العصبية. يمكن أن يصنع دماغ الأطفال حديثي الولادة الكوليسترول بينما لا يستطيع دماغ البالغين تصنيع الكوليسترول جدول (1-2) . (Chatterjea & Shinde, 2011) وحسب الخطوات التالية :-

جدول (1-2) كفاءة النسيج في تكوين الكوليسترول في بعض أعضاء الجسم

النسيج	كفاءة النسيج في تكوين الكوليسترول (الكبد 100%)
الكبد	100
البشرة (البالغين)	90
الأمعاء الدقيقة	60
الغدد التناسلية	31
الكليتين	4
الدماغ (البالغين)	صفر
الدماغ (الرضع)	185

1. الخطوة الأولى تكوين 3-hydroxy -3-methyl glutaryl CoA (HMG-CoA) تتمثل الخطوة الأولى في تكثيف جزيئين من أسيتيل CoA (Acetyl-CoA) لتكوين أسيتو أسيتيل CoA (Acetoacetyl-CoA) بواسطة انزيم Thiolase (Garrett & Grisham, 2010). يتكثف جزيء ثالث من الأسيتيل CoA مع أسيتو أسيتيل CoA (Acetoacetyl-CoA) لإنتاج مركب سدائي الكربون بيتا - هيدروكسي- بيتا-ميثيل جلوتارييل CoA (3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA) ويكتب اختصاراً (HMG-CoA) بواسطة انزيم HMG-CoA synthase (Nelson *et al.*, 2017).

2. الخطوة الثانية تكوين ميفالونيت Mevalonate يتم اختزال HMG CoA الى الـ ميفالونيت ويتم تحفيز هذه الخطوة بواسطة انزيم HMG CoA reductase وهذه الخطوة تعد المفتاح التنظيمي ومن الخطوة المحددة لمعدلات تصنيع الكوليسترول ، يحدث التفاعل في العصارة الخلوية ويستخدم جزيئين من NADPH كعامل اختزال ويتم إطلاق CoA مما يجعل هذا التفاعل تفاعل غير عكسي (Vasudevan *et al.*, 2011).

3. الخطوة الثالثة تكوين مركب Squalene يتم فسفرة ميفالونات Mevalonate إلى فسفوميفالونات Phosphomevalonate ثم الى بيروفوسفوميفالونات Pyrophosphomevalonate ثم إلى 3-فوسفو-5-بيروفوسفوميفالونات 3-Phospho-5-pyrophosphomevalonate (6 ذرات كربون) ، و يخضع هذا المركب لعملية نزع الكربوكسيل لتكوين مركب جديد (5 ذرات كربون) الأيزوبنتنيل بيروفوسفات Isopentenyl pyrophosphate (هذا المركب هو المادة الأساس للعديد من المركبات ذات الوظائف المتعددة كـ Isoprenoids , الكوليسترول هو Sterol isoprenoids (Vasudevan *et al.*, 2013).

تتم ازمرة Isopentenyl pyrophosphate بواسطة انزيم Isomerase لتكوين مركب Dimethylallyl pyrophosphate (5 ذرات كربون) ، يخضع Isopentenyl pyrophosphate و Dimethylallyl pyrophosphate لتكثيف حيث يتم إزاحة مجموعة واحدة من البيروفوسفات وتشكل سلسلة من 10 ذرات كربون وتكوين مركب وهي كرانيل بيروفوسفات Geranyl pyrophosphate ، و يخضع Geranyl pyrophosphate لتكثيف آخر مما يؤدي إلى إنتاج مركب وسيط وهو Farnesyl pyrophosphate (15 ذرة كربون)، وأخيراً يتحد جزيئان من Farnesyl pyrophosphate مع التخلص من مجموعتي البيروفوسفات بواسطة انزيم Squalene synthase لتكوين مركب السكوالين Squalene (Harvey & Ferrier, 2011).

4. الخطوة الرابعة تكوين الكوليسترول Cholesterol

يتم تحويل سكوالين Squalene إلى لانوستيرول Lanosterol عن طريق سلسلة من التفاعلات المحفزة بواسطة الإنزيمات المرتبطة بالشبكة الإندوبلازمية ER التي تستخدم الأكسجين الجزيئي و NADPH ، ويعمل إنزيم Squalene monooxygenase على إضافة ذرة أكسجين O₂ واحدة إلى نهاية سلسلة السكوالين مكوناً أبوكسيد [مركب عضوي يحتوي ثلاث حلقات تشتمل على ذرات على ذرة أكسجين وذرتين من الكربون] ، ولاحقاً يختزل NADPH ذرة الأكسجين الأخرى من O₂ إلى H₂O ثم يتحول إلى المركب الحلقي اللانوستيرول Lanosterol [الذي يحتوي على أربع حلقات مميزة لنواة الستيرويد] (Nelson et al ., 2017) . و يعد تحول اللانوستيرول إلى كوليسترول عملية متعددة الخطوات يحدث فيها تقصير سلسلة الكربون من 30 إلى 27 كربوناً وإزالة مجموعتي الميثيل عند ذرة الكربون رقم (4) وانتقال الرابطة المزدوجة من ذرة الكربون رقم (8) إلى ذرة الكربون رقم (5) واختزال الرابطة المزدوجة بين ذرة الكربون رقم (24) وذرة الكربون رقم (25) (Harvey & Ferrier, 2011) .

Cholesterol transport

1-1-5-2 نقل الكوليسترول

ان الدهون غير قابلة للذوبان نسبياً في الوسط المائي لذا يتم نقلها في سوائل الجسم كمعقدات بروتينية كروية قابلة للذوبان تسمى بالبروتينات الدهنية Lipoprotein ، وتحتوي البروتينات الدهنية على مجموعات بروتينية قابلة للذوبان في الماء (القطبية) ودهون فسفورية وكوليسترول الحر تتجه إلى الخارج بينما تحاط بنواة غير قابلة للذوبان (غير قطبية) داخلية من استرات الدهون الثلاثية والكوليسترول ، و يتم تصنيف البروتينات الدهنية على اساس كثافتها الطافية ، والتي تؤثر عكسياً على حجمها ، فكلما زادت نسبة الدهون إلى البروتين يزداد حجمها وتنخفض كثافتها (Crook, 2012) .

1-1-5-2-1 نقل الكوليسترول داخل الخلايا

Transport of cholesterol inside cells

يجب أن يتحرك الكوليسترول الذي تم تصنيعه حديثاً بعيداً عن الشبكة الإندوبلازمية لإداء وظيفته ، لذلك ينتقل عبر تدرج تركيز للوصول إلى الغشاء البلازمي ، وان إحدى طرق الانتقال من الشبكة الإندوبلازمية إلى الغشاء البلازمي هو النقل الحويصلي عبر جهاز جولجي ، على الرغم من أن النقل الحويصلي عبر جهاز كولجي يمكن أن ينقل بعض الكوليسترول المصنع حديثاً إلى الغشاء البلازمي فإنه لا يعد المسار الرئيسي لأن نقل الكوليسترول من الشبكة الإندوبلازمية إلى الغشاء البلازمي من المحتمل أن يكون غير حويصلي (Soccio & Breslow, 2004)

قد يقوم الكوليسترول بالانتقال الحويصلي إلى الإندوسومات للدخول إلى الشبكة الإندوبلازمية وبعدها تتم عملية الأسترة ، وبصرف النظر عن الإندوسومات فإن النقل الحويصلي العكسي عبر جهاز جولجي مرتبط بالنقل من الغشاء البلازمي إلى الشبكة الإندوبلازمية أيضاً (Wojtanik & Liscum , 2003) .

و يُعتقد أن النقل من الغشاء البلازمي إلى الشبكة الإندوبلازمية يحتاج إلى تنظيم صارم حيث يمكن أن يبقى بعض الكوليسترول الحر الزائد على مساحة كبيرة من سطح الشبكة الإندوبلازمية وعليه تصنع الدهون الفوسفاتية ، وأشارت دراسة أجريت بواسطة Kellner-Weibel *et al.* (1999) عن أن زيادة الكوليسترول في الغشاء البلازمي يحفز استجابة موت الخلايا المبرمج Apoptotic response في الخلايا البلمعية Macrophages في الفئران ، ومع ذلك، أشارت دراسة بارتباط الكوليسترول الموجود في الشبكة الإندوبلازمية بمسار موت الخلايا المبرمج Apoptosis ، ويكشف هذا الارتباط عن مجال بحث جديد ويسلط الضوء أيضا على أهمية تنظيم الكوليسترول والنقل من وإلى الشبكة الإندوبلازمية (Clin , 2002) .

1-1-5-2-2 نقل الكوليسترول عبر البلازما

Transfer of cholesterol through plasma

ينقل الكوليسترول في البلازما بواسطة البروتينات الدهنية ويكون الجزء الأكبر منه على شكل إسترات الكوليستريل Cholesteryl ester ، وفي البشر توجد النسبة الأعلى من البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL ، و يتوازن الكوليسترول الغذائي مع كوليسترول البلازما في غضون ايام ومع كوليسترول الأنسجة في غضون أسابيع ، و يتحلل الكوليسترول إستر الموجود في النظام الغذائي إلى كولسترول والذي تمتصه الأمعاء لاحقاً مع الكوليسترول غير المؤسّر في النظام الغذائي والدهون الأخرى (Rodwell *et al.*, 2018) .

ترتبط الأحماض الدهنية البسيطة غير المؤسّرة فقط باليومين المصل والبروتينات الأخرى في بلازما الدم ولكن يتم نقل الدهون الفوسفورية وثلاثي الجلسرين والكوليسترول وإسترات الكوليسترول على شكل بروتينات دهنية (Garrett & Grisham , 2010) .

Lipoproteins

1-1-5-2-2 البروتينات الدهنية

البروتينات الدهنية في البلازما عبارة عن معقدات من جزيئات كبيرة كروية تتألف من الدهون وبروتينات خاصة (Apolipoproteins or Apoproteins) . جزيئات البروتين الدهني تشمل Chylomicrons (CM) والبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً (VLDL) والبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL) والبروتينات الدهنية عالية الكثافة (HDL) ، وهي

تختلف في تكوين الدهون والبروتينات وحجمها وكثافتها وموقع المنشأ ، وان للبروتينات الدهنية وظيفتان رئيسيتان أولها الحفاظ على مكونات الدهون القابلة للذوبان أثناء نقلها في البلازما والثانية لتوفير آلية فعالة لنقل المحتويات الدهنية من وإلى الأنسجة. في البشر يكون نظام النقل أقل كمالاً مما هو عليه في الحيوانات الأخرى ونتيجة لذلك يعاني البشر من ترسب تدريجي للدهون (وخاصة الكوليسترول) في الأنسجة ، و من المحتمل ان يسبب تهديد للحياة وذلك عندما يساهم ترسب الدهون في تكوين اللويحات (Plaque) مما يتسبب في تضيق الأوعية الدموية (وعليه يسبب تصلب الشرايين) جدول رقم (3-1) (Vasudevan *et al.*,2011 ; Harvey & Ferrier, 2011) .

جدول (3-1) خصائص الفئات المختلفة من البروتينات الدهنية (Vasudevan *et al.*,2011)

وظيفة النقل	proteins-Apo	الكوليسترول	البروتينات الفسفورية	الدهون الثلاثية	البروتين	النقل الكهربائي %	القطر nm	الكثافة g/ml	الفئة
من TG ينقل القناة الهضمية إلى العضلات والنسيج الدهني	A,B-48, C-II,E	8	10	80	2	origin	500	<0.95	Chylomicron
من TAG ينقل الكبد إلى العضلات	B-100, C-II, E	20	20	50	10	pre-beta	70	0.95-1.006	VLDL
	B-100, E	30	20	30	20	broad beta	30	1.006-1.019	IDL
ينقل الكوليسترول من الكبد إلى الانسجة المحيطة	B-100	50	20	10	20	beta	25	1.019-1.063	LDL
ينقل الكوليسترول من الانسجة المحيطة إلى الكبد	A-I, C, E	10-30	20-30	10	30-60	alpha	15	1.063-1.121	HDL

1-1-2-2-5-1-1 خصائص البروتينات الدهنية

Properties of lipoproteins

يتم تجميع الـ HDL و VLDL بشكل أساسي في الشبكة الإندوبلازمية للكبد (تنتج أيضاً في الأمعاء ولكن بكميات أصغر) بينما يصنع Chylomicrons في الأمعاء ، لا يتم تصنيع LDL بشكل مباشر ولكنه يصنع من VLDL ، حيث يظهر البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL على شكل معقد حلقي من الكوليسترول و أسترات الكوليسترول ، و تعد المهمة الأساسية للـ Chylomicrons هي نقل الكليسيريدات الثلاثية Triacylglycerols (TG) ، وتعد الكميات النسبية من HDL و LDL مهمة في التخلص من الكوليسترول في الجسم ، ان للبروتينات الدهنية المختلفة تكون تراكيبها متشابهة تقريباً اذ تتكون من: لب من الكليسيريدات الثلاثية Triacylglycerols (TG) أو أسترات الكوليسترول وتكون محاطة بطبقة واحدة من الدهون الفسفورية Phospholipids ويتم إدخال مزيج من الكوليسترول والبروتينات فيها ، بينما الدهون الفسفورية تحتوي مجموعات رأسية قطبية تتجه باتجاه الخارج للتفاعل مع الماء المذيب وعليه فان الدهون الفسفورية تحمي الدهون الكارهة للماء الموجودة بالداخل من الماء المذيب بالخارج (Garrett & Grisham, 2010) .

1-1-2-2-5-1-1 أنواع البروتينات الدهنية

Types of lipoprotein

1. Chylomicrons :-

يرتبط Chylomicrons بحركة الكليسيريدات الثلاثية (TG) والكوليسترول من الأمعاء إلى أنسجة أخرى ، و هي أكبر البروتينات الدهنية والأقل كثافة وتحتوي على نسبة عالية من الكليسيريدات الثلاثية TG ، و يتم تصنيع Chylomicrons من الدهون الغذائية في الشبكة الإندوبلازمية (ER) في الخلايا المعوية والخلايا الظهارية التي تبطن الأمعاء الدقيقة (Nelson et al ., 2017) .

يعمل Chylomicrons الذي يتم تجميعه بواسطة الغشاء المخاطي في الأمعاء على إبقاء TG والكوليسترول معلقاً في محلول مائي ، اذ يتم إطلاق هذه البروتينات الدهنية في اللمف المعوي Intestinal lymph (المعروف باسم chyle) والتي لاحقاً يتم نقلها عبر الأوعية اللمفاوية قبل ان يتم تصريفها في أوردة الجسم الكبيرة عبر القناة الصدرية ، بعد تناول وجبة دسمة يأخذ chyle الصافي مظهرًا حليبياً ، ان Chylomicrons يلتصق بمواقع الربط على السطح الداخلي (Endothelium) للشعيرات الدموية في العضلات

الهيكلية والأنسجة الدهنية ، وبغضون دقائق بعد الدخول الى مجرى الدم يتم تحلل الكليسيريدات الثلاثية (TG) في Chylomicrons عبر نشاط Lipoprotein lipase (LPL) وهو إنزيم خارج الخلية يتم تنشيطه بواسطة apoC-II ، بعد ذلك تمتص الأنسجة منتجات التحلل المائي الأحادي الأسيل الجلسرين والأحماض الدهنية ، لاحقاً ينكمش Chylomicrons بشكل تدريجي حتى يتم اختزاله إلى بقايا Chylomicron المخصب بالكوليسترول ، وعليه فان الأخير يدخل الدورة الدموية عن طريق الانفصال عن البطانة الشعرية ، واخيراً يتم نقلها الى الكبد ، لذلك يعمل مادة Chylomicrons على توصيل الكليسيريدات الثلاثية TG الغذائي إلى الأنسجة العضلية والدهنية وكذلك توصيل الكوليسترول الغذائي إلى الكبد (Voet & Voet, 2011).

2. البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً (VLDL) :-

عندما يحتوي النظام الغذائي على أحماض دهنية أكثر مما هو مطلوب فوراً يتم تحويلها إلى الكليسيريدات الثلاثية TG في الكبد وتعبئتها ببروتينات شحمية محددة إلى بروتين دهني منخفض الكثافة جداً VLDL ، وتعد وظيفة الاساسية للـ VLDL هي نقل الدهون الثلاثية (الدهون الثلاثية الداخلية) من الكبد إلى الأنسجة المحيطة حسب احتياجات الطاقة (Vasudevan et al., 2011).

ويمكن أيضاً تحويل الكربوهيدرات الزائدة في النظام الغذائي إلى ثلاثي الجلسرين في الكبد وتصديرها على شكل VLDLs ، فضلاً عن الكليسيريدات الثلاثية (TG) يحتوي VLDLs على بعض الكوليسترول و أسترات الكوليسترول وكذلك apoB-100 و apoC-I و apoC-II و apoC-III و apo-E ، وتنقل هذه البروتينات الدهنية في الدم من الكبد إلى العضلات والأنسجة الدهنية ، علاوة على ذلك ، تفرز خلايا الكبد VLDLs وتنقل في الدم إلى الأنسجة الدهنية حيث تتم إزالة TG وتخزينه في قطرات دهنية داخل الخلايا الشحمية Adipocytes . ان عمر النصف لـ VLDL في المصل من ساعة إلى ثلاث ساعات فقط ، و عندما يصل إلى الأنسجة المحيطة ينشط apo-C-II الذي يحرر الأحماض الدهنية التي تمتصها الأنسجة الدهنية والعضلات (Nelson et al ., 2017).

3. البروتين الدهني المتوسط الكثافة (IDL) :-

Intermediate-density lipoprotein (IDL)

ان فقدان الكليسيريدات الثلاثية TG يحول بعض VLDL إلى بقايا VLDL ويسمى أيضاً البروتين الدهني المتوسط الكثافة (IDL) [Intermediate-density lipoprotein] (IDL) (Nelson et al ., 2017) .

يتم تحديد المتبقي من VLDL على أنه IDL (بروتين دهني متوسط الكثافة) ويحتوي على كمية أقل من TAG والمزيد من الكوليسترول ، و يفقد الجزء الأكبر من IDL أيضًا الدهون الثلاثية TAG بحيث يتم تحويلها إلى LDL (بروتين دهني منخفض الكثافة) ، و يشار إلى هذا التحويل من VLDL إلى IDL ثم إلى LDL باسم مسار تنظيم البروتين الدهني [Lipoprotein cascade pathway] (Vasudevan et al., 2011)

4. البروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL) :-

Low-density lipoprotein (LDL)

ينتج عن ازالة المزيد لثلاثي الجليسيرول Triacylglycerol من IDL البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL ، حيث يكون LDL غني بأسترات الكوليسترول وكذلك الكوليسترول ، و يحتوي (IDL) على apoB-100 كبروتين رئيسي له ، و يحمل IDL الكوليسترول إلى الأنسجة خارج الكبد مثل العضلات والغدد الكظرية والأنسجة الدهنية حيث تحتوي هذه الأنسجة على مستقبلات LDL غشائية تتعرف على apoB-100 تسهم في امتصاص الكوليسترول وأسترات الكوليسترول ، و يؤدي ارتباط البروتين الدهني منخفض الكثافة بمستقبلات LDL إلى بدء عملية الاتهام الخلوي والتي تنقل LDL ومستقبلاته إلى الخلية داخل الاندوسوم Endosome ، وفي النهاية يندمج الاندوسوم مع اللايسوسوم والذي يحتوي بدوره على إنزيمات تحلل أسترات الكوليسترول وتطلق الكوليسترول والأحماض الدهنية في العصارة الخلوية (Nelson et al. , 2017) . ان خلايا الكبد تمتص الكثير من كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة حيث يتم استخدامه لإنتاج الأحماض الصفراوية ، وتصنع العديد من أنسجة الستيرويد هرمونات الستيرويد من الكوليسترول الذي توفره جزيئات LDL (Harvey & Ferrier, 2011) .

5. البروتين الدهني عالي الكثافة (HDL) :-

High density lipoprotein (HDL)

تعد البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDLs الأكثر كثافة وتشارك في نقل الكوليسترول من خلايا الجسم إلى الكبد (نقل الكوليسترول العكسي) (Crook , 2012). و يتم تصنيع HDL في الكبد والأمعاء ويتم إطلاقه كجزيئات كثيفة غنية بالبروتين في الدم. يحتوي HDL على apoA-1 المستخدم لاستعادة الكوليسترول من الخطوط الدهنية في الأوعية الدموية (Turco et al., 2016) .

معالجة الكوليسترول تتم بواسطة انزيم الليسيثين الكوليسترول أسيل ترانسفيراز Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) ، فضلاً عن ذلك تعزز نشاط البروتينات الدهنية عالية الكثافة (HDL) دوران chylomicrons والـ VLDL عبر تبادل الدهون والبروتينات فيما بينها (Koolman & Roehm, 2005) .

ان إحدى الوظائف الرئيسية لـ HDL تتمثل في العمل كمستودع لـ apo C و apo E المطلوبين في عملية التمثيل الغذائي للـ chylomicrons و VLDL .

ان HDL الناشئ يتكون من طبقات ثنائية الفسفوليبيد Phospholipid bilayers قرصية الشكل تحتوي على apo A والكوليسترول الحر (Nelson et al., 2017) .

يمكن للخلايا المعوية ان تصنع مكونات HDL وتطلقه في الدم ، ولاحقاً يصبح HDL الناشئ في البلازما قرصي الشكل ، و يتم امتصاص الكوليسترول الحر المشتق من خلايا الأنسجة المحيطة بواسطة HDL ، بينما ينشط كل من apo-A-1 الخاص بـ HDL انزيم الليسيثين كوليسترول أسيل ترانسفيراز (Lecithin cholesterol acyl transferase) LCAT الموجود في البلازما ، و بعدها يرتبط LCAT بقرص HDL ، و أخيراً يتم انتقال الكوليسترول من الخلية إلى HDL عن طريق بروتين منظم لتدفق الكوليسترول وهو بروتين ABC ، و يعد الليسيثين Lecithin أحد مكونات الطبقة الثنائية (الفسفوليبيد) للـ HDL ، حيث ترتبط ذرة الكربون الثانية من الليسيثين مع جزيء واحد من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة Polyunsaturated fatty acid (PUFA) ، وتنقل إلى مجموعة الهيدروكسيل الثالثة من الكوليسترول لتكوين أسترات الكوليسترول ، لاحقاً ينتقل الكوليسترول المؤستر والذي يكون كارهاً للماء بشكل كبير إلى داخل الـ HDL ، ويستمر هذا التفاعل حتى يصبح الـ HDL كروياً مع الاستمرار في تكوين المزيد من أسترات الكوليسترول ، ان كريات HDL الناضجة يتم تناولها بواسطة خلايا الكبد بواسطة آلية تتوسطها مستقبلات apo-A-1 . اللابيز الكبدية يحلل الدهون الفسفورية phospholipid للـ HDL و TG و أسترات الكوليسترول ويطلقها في الكبد (Vasudevan et al., 2011) .

1-1-5-3 امتصاص الكوليسترول المعوي

Absorption intestinal cholesterol

ان امتصاص الكوليسترول عملية متعددة الخطوات يتم تنظيمها بواسطة جينات متعددة على مستوى الخلايا المعوية وأن كفاءة امتصاص الكوليسترول يمكن تحديدها عبر التأثير الصافي لتدفق جزيئات الكوليسترول Intraluminal والتي تعبر غشاء الخلايا المعوية (Wang, 2007).

ويمتص الكوليسترول الغذائي بواسطة الزغابات المعوية المخاطية على شكل مادة غروية والتي تتكون من نشاط املاح الصفراء والكوليسترول والاحماض الدهنية ، و تحدث نقطة التلامس الأولية بين هذه المادة الغروية والخلايا المعوية التي تمتص الكوليسترول على سطح الزغابات المعوية في الأمعاء ، ويزال الكوليسترول بشكل خاص من المادة الغروية كجزء من عملية الامتصاص حيث يتم امتصاصه بشكل رئيسي في الاثنا عشر والصائم لكن الأحماض الصفراوية لا يتم امتصاصها بشكل كبير في هذه المواقع ، وبدلاً من ذلك فإن ناقلات الاحماض الصفراء الموجودة في الأمعاء تمتص الأحماض الصفراوية لاحقاً وتعيدها مجدداً إلى الكبد وعليه تنقله الى الدورة الدموية المعوية الكبدية (Ballantyne , 2015).

Cholesterol oxidation

1-1-5-4 أكسدة الكوليسترول

يمتلك الكوليسترول رابطة مزدوجة حلقة فضلاً عن سلاسل جانبية تحتوي على ذرات كربون ثالئية قابلة للأكسدة ، وعلى الرغم من أن أكاسيد الكوليسترول تنتج بشكل طبيعي من التمثيل الغذائي للكوليسترول الطبيعي إلا أنها تؤثر سلباً على صحة الإنسان عند مستوياته العالية وذلك عبر المشاركة في الإصابة بمرض تصلب الشرايين ، و تؤثر أكاسيد الكوليسترول ايضاً على خصائص غشاء الخلية مثل الثبات والنفذية والسيولة ، ان الأطعمة الطازجة تحتوي على الكوليسترول المؤكسد ومع ذلك فإن المنتجات الحيوانية المؤكسدة هي مصدر رئيسي لإكاسيد الكوليسترول ، و تشمل منتجات الأكسدة الأساسية على (7-OH- α -) , (7- β -OH) , (7-keto-cholesterol) , (α - & β -epoxides) , (trihydroxycholesterol) , (1-3.5,6-hydroxycholesterol-25) , (Gunstone & Harwood.,2007).

Hypercholesterolemia

2-1 فرط الكوليسترول

Types of hypercholesterolemia

1-2-1 أنواع فرط الكوليسترول

1-1-2-1 فرط الكوليسترول الاعتيادي (المكتسب)

Normal hypercholesterolemia

ان فرط الكوليسترول في الدم يسمى أيضاً باضطراب شحميات الدم وهو وجود مستويات عالية من الكوليسترول في الدم ، ويعد ارتفاع مستوى الدهون الثلاثية في البلازما مقترناً بفرط كوليسترول الدم أمراً شائعاً ويساهم في زيادة خطر الإصابة بأمراض القلب ، عادةً ما يكون لدى المرضى المصابين بفرط الكوليسترول مستويات مرتفعة من الكوليسترول LDL و VLDL وانخفاض مستويات الكوليسترول HDL في الدم (Sarwar et al., 2006) .

و يتراوح المعدل الطبيعي للكوليسترول الكلي في الدم عند البشر ما بين (140 إلى 200 مجم) لكل ديسيلتر (مجم / ديسيلتر) من الدم ، بينما يصنف ارتفاع الكوليسترول بأكثر من (240 مجم / ديسيلتر) على أنه مستوى مرتفع من الكوليسترول في الدم ، في حين أن المعدل الطبيعي للكوليسترول في الجردان يتراوح بين (40-130 مجم / ديسيلتر) وفي الفئران يختلف بين السلالات والجنس ويتراوح بين (100-30 مجم / ديسيلتر) (Gonder-Frederick et al ., 2008) .

ان المعدل الطبيعي للكوليسترول في ذكور الارانب يتراوح بين (مجم / ديسيلتر 10-100) (Fox, 2015) . بينما في اناث الارانب يتراوح بين (59-61 مجم / ديسيلتر) (Özkan& Pekkaya, 2019) .

و عادة ما يحدث فرط كوليسترول الدم بسبب مجموعة من العوامل الوراثية والبيئية ، اذ تعد السمنة وتناول الاطعمة من الأمثلة النموذجية على العوامل البيئية التي تسبب فرط كوليسترول الدم هناك العديد من الأسباب المختلفة لفرط كوليسترول الدم ، و قد تكون نتيجة لعوامل اخرى مثل: العوامل الوراثية (فرط كوليسترول الدم المألوف وفرط كوليسترول الدم متعدد الجينات) أو بسبب عوامل ثانوية مثل بعض الأمراض مثل (مرض السكري وقصور الغدة الدرقية) وكذلك النظام الغذائي أو حتى الآثار الجانبية لبعض الأدوية على سبيل المثال ادوية (العلاجات النفسية) (Fadeev, 2018) .

أن فرط كوليسترول الدم في حد ذاته ليس من الأعراض فإن الزيادة في كوليسترول الدم يمكن أن تسبب تصلب الشرايين حيث أظهرت عدد من التجارب السريرية استخدمت مثبتات اختزال HMG-CoA (الستاتينات) انخفاضاً كبيراً في المخاطر عبر خفض الكوليسترول الضار في مرضى القلب وذلك بشكل أساسي عن طريق زيادة نشاط مستقبلات LDL (Baigent *et al.*, 2011). وهو أيضاً عامل خطر يؤدي لحصول أمراض القلب والأوعية الدموية حيث يحدث تراكم كمية كبيرة من الكوليسترول في الأوعية الدموية مما يؤدي إلى تضيق الأوعية الدموية أو انسداد تدفق الدم ويسبب خللاً في الخلايا ، وتعد العادات السيئة مسببة لفرط كوليسترول الدم مثل اتباع نظام غذائي غني بالكربوهيدرات والدهون غير الصحية وزيادة تناول اللحوم الحمراء فضلاً عن قلة الحركة والنشاط (Huang & Freter, 2016).

و يُعتقد أن بعض العوامل الغذائية مثل تناول كميات كبيرة من الدهون المشبعة والكوليسترول لها علاقة مباشرة بفرط كوليسترول الدم وقابلية الإصابة بتصلب الشرايين ، و تُعد حيوانات التجارب لفرط كوليسترول الدم نماذج مفيدة للدراسات حول توازن الكوليسترول وتجارب الأدوية لفهم العلاقة بين الاضطرابات في استقلاب الكوليسترول وتصلب الشرايين فضلاً عن العلاجات الممكنة لتقليل مستويات الكوليسترول في الدورة الدموية ، و غالباً ما يتم إحداث فرط كوليسترول الدم في حيوانات التجربة عبر نظام غذائي غني بالدهون والكوليسترول ويتنوع مصدر الدهون من شحم الخنزير إلى الكانولا وجوز الهند وزيت النخيل ، كما تم استخدام حصص الإعاشة التجارية المكملة بالكوليسترول (الكوليسترول التجاري الجاهز) في هذه التجارب (Alshammary & Khaleel , 2018).

يمثل مستوى الكوليسترول الكلي في الدم مجموع مستوى كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL ومستوى كوليسترول البروتين الدهني مرتفع الكثافة HDL وخمس مستوى الدهون الثلاثية ، و يعد اضطرابات البروتين الدهني مهمة في فرط الكوليسترول بسبب الخلل الناتج عن عدم توازن مستوى الكوليسترول في الدم وعليه قد تؤدي إلى عدد من الاضطرابات بما في ذلك أمراض القلب والأمراض الجلدية والتهاب البنكرياس و (نادراً) التشوهات العصبية والعينية ، وكذلك فإن فرط الكوليسترول الدم قد يكون مسؤولاً عن زيادة الإصابة بأمراض القلب التاجية مع عوامل الخطر الأخرى (التدخين، الإجهاد ... إلخ) عبر دوره في مسببات تصلب الشرايين ، يبدو أن التأثير الرئيسي لتصلب الشرايين بسبب زيادة مستوى البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL ، و يزيد من لزوجة الدم فضلاً عن زيادة الالتصاق وتجمع

الخلايا الحمراء ، يعتقد أن 50-60% من مرضى القلب الإقفارية Ischemic heart diseases يعانون من فرط كوليسترول الدم (Obied-Yaseen, 2005) .

ونظراً لأن مستويات الكوليسترول الإجمالية المرتفعة تعد عامل خطر رئيسي مستقل لتطوير امراض الأوعية الدموية الطرفية Peripheral Vascular Disease (PVD) و امراض الشريان التاجي Coronary Artery Disease (CAD) ، فقد تم توجيه اهتمام كبير نحو تقييم تأثير وآليات علاجات خفض الكوليسترول ، ولقد ثبت أن الكوليسترول يتعارض ويغير تركيب ووظيفة الأوعية الدموية لأنه يتراكم داخل بطانة جدار الأوعية الدموية ويمكن أن يتداخل مع وظيفة البطانة مما يؤدي إلى التقرحات واللويحات plaques والانسدادات والتخثر إلى جانب انخفاض في معدل الشفاء والتعافي اثناء الإصابات الكبيرة ، وايضاً ثبت بوضوح أن تطور فرط كوليسترول الدم مرتبط بخلل في الخلايا البطانية (Stapleton et al., 2010) . تم إثبات علاقة فرط الكوليسترول في الدم بتطور امراض تصلب الشرايين Atherosclerosis في العديد من الدراسات السريرية والوبائية ، فضلاً عن الاضطرابات القلبية الوعائية Cardiovascular disease (CVD) ، و في العراق لا تتوفر سوى بعض البيانات المحدودة حول أمراض القلب والأوعية الدموية Cardiovascular disease (CVD) ، اذ تشير معظم هذه البيانات إلى ارتفاع مخاطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية بسبب زيادة مستوى الدهون في الدم على غرار البلدان العربية المجاورة ومع ذلك لا يزال حجم المخاطر بحاجة إلى المزيد من التقييم (AlShamary, 2011) .

2-1-2-1 فرط الكوليسترول العائلي

Familial Hypercholesterolemia (FH)

يعد فرط كوليسترول الدم العائلي (FH) خطأ وراثي سائد يؤدي إلى فقدان أو تلف مستقبلات البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDLR) مما يؤدي إلى ارتفاع مستويات كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة (LDLc) والكوليسترول الكلي (TC) في الدورة الدموية كما أنه يشكل خطورة في حدوث ورم الأوتار الأصفر وتصلب الشرايين المتسارع مما يؤدي إلى مشاكل قلبية ووعائية مبكرة وموت مبكر ، ان معظم أسباب FH (فقدان أو تلف مستقبلات LDL) عن وجود أشكال من الأضرار الجينية في الجين المشفر الموجود على الذراع القصيرة للكروموسوم 19 وعليه يقود إلى خلل في النقل أو التمثيل الغذائي

للبروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL) (Lye *et al.*, 2013 ; Al-Faisal , 2008 ; Alharbi *et al.*, 2015) .

و يعد فرط كوليسترول الدم العائلي أحد أكثر الاضطرابات الوراثية شيوعاً اذ يوجد حوالي 10 مليون شخص مصابين بفرط كوليسترول الدم فـي جميع أنحاء العالم معظمهم متغاير الزيجوت اذ يرتبط بزيادة مستويات LDL الكلي والكوليسترول (Rafiq & Qamar, 2011). و يوجد الـ (FH) بنسبة (1) لكل (500) شخص ضمن العائلة الواحدة ، ان الخلل الأيضي الوراثي يعزى الى نقص او طفرة وراثية في مستقبلات LDL ذات عيوب تؤدي الى خفض فعالية الارتباط مع LDL بنسبة 10 % والتي تمكن جسيمات LDL من الدخول الى داخل الخلية. (AL-Ani , 2012)

يمكن أن يقلل الاكتشاف المبكر للجين المصاب من خطر الإصابة بتصلب الشرايين واحتشاء عضلة القلب عبر استخدام الأساليب العلاجية المتاحة (Kulkarni *et al.*, 2011)، في العراق لم يتم دراسة الطيف الجيني لفرط كوليسترول الدم العائلي على نطاق واسع (Riehan & AlAmili, 2018) .

ان انخفاض مستويات الكوليسترول الداخلي يؤدي إلى ارتفاع نشاط الإنزيم الرئيسي المسؤول عن تخليق الكوليسترول الداخلي واختزال HMG-CoA وما يترتب على ذلك من تخليق مفرط للكوليسترول ، و يؤدي الارتفاع المتزايد لمستويات LDL في الدم في فرط كوليسترول الدم العائلي FH إلى ارتفاع مخاطر الإصابة بتصلب الشرايين في سن مبكرة بسبب الترسب على بطانات الشرايين التاجية ، و يمكن تصنيف الطفرات الجينية المختلفة لمستقبلات LDL التي تؤدي إلى فرط كوليسترول الدم العائلي FH إلى خمس مجموعات وفقاً للعيوب الوظيفية في المستقبل:

1. الألييلات الخالية التي لا تنتج بروتين مستقبلات LDL ويمكن اكتشافه.
2. المستقبلات الطافرة التي يتم حظرها أثناء المعالجة في الشبكة الإندوبلازمية أو جهاز كولجي وعليه لا تصل أبداً إلى غشاء البلازما.
3. المستقبلات الطافرة التي لا يمكنها ربط LDL.
4. المستقبلات الطافرة التي تربط LDL على سطح الخلية ولكن يتم حظرها في الالتهام الخلوي وعليه لا تستوعب LDL.
5. طفرات مستقبلات LDL التي تفشل في إطلاق LDL المرتبط ولا يتم إعادة تدويرها إلى سطح الخلية بعد الاستيعاب (Macdonald & Chaney, 2007) .

2-2-1 علاج فرط الكوليسترول Treatment of hypercholesterolemia

لقد تطورت المبادئ التوجيهية بشأن الكثافة المثلى لخفض الكوليسترول الضار LDL مع نتائج التجارب السريرية ، اذ حددت إرشادات البرنامج الوطني للتوعية باستخدام الكوليسترول في الولايات المتحدة الأمريكية National Cholesterol Education Program (NCEP) منذ عام 2001 المستوى المستهدف عند أقل من 2.6 مليمول / لتر (100 ملغم / ديسيلتر) للمرضى المعرضين لمخاطر عالية للإصابة بأمراض القلب التاجية (James, 2001) . وتم تحديث هذه الإرشادات في عام 2004 لتوفير هدف علاجي اختياري أقل من 1.8 مليمول / لتر (70 ملغم / ديسيلتر) للمرضى المعرضين لمخاطر عالية جداً ، أولئك الذين لديهم عوامل خطر إضافية مثل مرض السكري ، (Grundy et al., 2004) . وفي عام 2006 مجموعة من المرضى الذين تم تطبيق القيمة المنخفضة عليهم لتشمل جميع المرضى الذين يعانون من مرض تصلب الشرايين ، و علاوة على ذلك تمت التوصية بحد أدنى من 30-40 % تخفيض لنسبة LDL للمرضى المعرضين لخطر متوسط وعالي (Smith et al., 2006) .

يفضل أن يكون علاج فرط كوليسترول الدم بالتغذية مصحوباً بأنظمة طبيعية أخرى (Taher et al., 2015) . و يمكن للنظام الغذائي الصحي والتمارين الرياضية التحكم بنجاح في مستويات الكوليسترول في الدم ، ان موانع الكوليسترول الطبيعية لا تقلل من امتصاص الكوليسترول فحسب بل تزيد أيضاً من ايض الكوليسترول والقضاء عليه ، و يعد تعزيز مضادات الكوليسترول الطبيعية من أكثر الاستراتيجيات أماناً في الوقاية من فرط كوليسترول الدم وعلاجه ، لقد تم العثور على مضادات الكوليسترول الطبيعية في الحبوب ودقيق الشوفان والفواكه والخضروات والبقوليات (Turco et al., 2016) . لذلك يمكن اعتبار الأنظمة الغذائية الصحية الغنية بالبروتينات النباتية والقليلة من الكربوهيدرات والدهون والخالية من الدهون غير المشبعة (السمن والأطعمة الخفيفة والأطعمة المخبوزة المعبأة والوجبات السريعة المقلية) مع ممارسة التمارين الرياضية بانتظام الخيار الأفضل لعلاج فرط كوليسترول الدم (Harisa et al., 2016) .

و في الآونة الأخيرة ، اثبتت دراسة اجراها Sulaiman et al. (2015) انخفاض مستوى الكوليسترول بالدم باستعمال الجسيمات النانوية (جسيمات الفضة النانوية Silver nanoparticles (AgNPs) , جسيمات الذهب النانوية) . ان لجزيئات الفضة النانوية القدرة

على أكسدة الدهون في الجسم ، و لذلك كانت استعمال جسيمات الفضة النانوية فعالة في تقليل كمية الدهون الثلاثية في الدم ، تشير خصائص جسيمات الفضة النانوية أساساً إلى الارتفاع في مساحة السطح إلى نسبة الحجم والتي ربما تسببت في زيادة قدرة التفاعل (Al-Dujaili & Al-shemeri, 2016).

Nanoparticles

3-1 الجسيمات النانوية

تعد الجسيمات النانوية تحدياً عاماً لحاضر ومستقبل العلم ، حيث تغطي الجسيمات النانوية في الغالب جميع أنواع العلوم وتقنيات التصنيع ، و ترتقي خصائص هذه الجسيمات فوق الحواجز العلمية اليومية وقد تجاوزت حدود العلوم التقليدية وهو السبب وراء تقييم الجسيمات النانوية للاستخدام في العديد من المجالات ، تم إدراج قائمة طويلة من المجالات العلمية في قائمة المواجهة في المستقبل القريب ودراسة إمكانية تحويل الأدوار التقليدية للعلم لاستكشاف المجالات المتاحة لاستخدام الجسيمات النانوية (Hashim , 2012).

إن للمواد النانوية تاريخ طويل جداً ومع ذلك فقد حدثت تطورات كبيرة في علم النانو عبر العقدين الماضيين ، اذ تم تسليط الضوء على فكرة تقنية النانو لأول مرة من قبل الحائز على جائزة نوبل ريتشارد فاينمان Richard Feynman في محاضراته الشهيرة في معهد كاليفورنيا للتكنولوجيا 29 ديسمبر 1959 ، حيث أشار ريتشارد فاينمان في أحد مقالاته المنشورة في عام 1960 إلى أنه " إذا كان بايت واحد من البيانات يتطلب 100 ذرة فانه يمكن تخزين جميع الكتب المكتوبة على الإطلاق في مكعب بطول 0.02 بوصة " ، و في عام 1970 بينما حدد نوريو تانيجوتشي Norio Taniguchi لأول مرة مصطلح تقنية النانو بوصفه "تقنية النانو تتكون أساساً من معالجة المواد وفصلها وتشويهها وتوحيدها بواسطة ذرة واحدة أو بواسطة جزيء واحد" ، بينما في عزز تقني آخر يدعى K. Eric Drexler عام 1980 الأهمية التكنولوجية في مقياس النانو ، الامر الأكثر أهمية في البعد النانوي هو أن خصائص الجسيمات تختلف كثيراً عن خصائصها في مقياسها الحجمية (Ashe , 2011).

وتعد الجسيمات النانوية المعدنية وخاصة الفضة والذهب مساهمة في العديد من الأنشطة الحيوية (BarathManiKanth et al., 2010). أدت الخصائص المضادة للميكروبات للجسيمات النانوية الفضية إلى استعمالها على نطاق واسع في تقنيات مختلفة مثل [معالجة المياه ، ومعجون الأسنان ، والشامبو ، والشطف ، وحلقات زجاجات إرضاع الأطفال الرضع ، والأقمشة ، ومزيلات العرق ، والمرشحات، وأدوات المطبخ ، ولعب الأطفال ، والمرطبات]

(Maynard *et al.*, 2006). و في الآونة الأخيرة توسعت تطبيقات الجسيمات النانوية الذهبية في مختلف المجالات الطبية الحيوية [المستشعرات الحيوية، والمقاييسات المناعية، وعلوم الجينوم، والتحليل الحراري للخلايا السرطانية، واكتشاف الكائنات الحية الدقيقة والتحكم فيها، وتوصيل الأدوية (تحميل الأدوية على الجسيمات النانوية لتوصيلها الى الجزء المستهدف من الجسم بسهولة)، التصوير البصري، ومراقبة الخلايا والأنسجة البيولوجية (عن طريق استغلال تشتت الرنين)، أو في التقنيات الصوتية للتصوير في الجسم الحي] (Adeyemi & Sulaiman, 2012).

و على الرغم من الاستخدام الواسع للجسيمات النانوية إلا أن هناك نقصاً خطيراً في المعلومات المتعلقة بتأثيرها على صحة الإنسان والبيئة، إذ لا يُعرف سوى القليل جداً عن سمية الجسيمات ذات الحجم النانوية ومع ذلك يتم التعرف على الحجم ومساحة السطح كمحددات مهمة للسمية (Ji *et al.*, 2007).

Silver nanoparticles

1-3-1 جسيمات الفضة النانوية

وتكون المواد النانوية ذات خصائص فيزيائية وكيميائية تختلف عن المواد المنتجة منها ذات الحجم الأكبر Bulk size، إذ تتمثل الجسيمات النانوية بعناقيد (Clusters) من الذرات والتي يتراوح معدل حجمها ما بين (1 - 100) nm ويشير الـ nano إلى 1 بليون أو 10 وحدات (Abou El-Nour *et al.*, 2010). وتعد جسيمات الفضة النانوية من أكثر المواد النانوية المستعملة لأهميتها في التطبيقات الطبية و الحيوية لتميزها بخصائص مضادة للالتهاب، والفايروسات والفطريات (Zhong *et al.*, 2010).

لقد صنفت المواد النانوية تبعاً لنشؤها فمنها مواد نانوية طبيعية ومواد نانوية مهندسة فضلاً عن المواد النانوية الاصطناعية، و ينتج من التعرض لتراكيز عالية من مركبات الفضة المذابة تأثيرات سامة ومضرة في الكبد والكلية والعيون والجلد والقناة التنفسية والهضمية وتغيرات عديدة في خلايا الدم (Panyala *et al.*, 2008). و تستعمل جسيمات الفضة النانوية بوصفها مواد علاجية في علاج العديد من الأمراض كالسرطان والأمراض العصبية (Donner, 2010). والعدسات اللاصقة للعين (Tien *et al.*, 2008). وكذلك تستعمل بوصفها مضادات للجروح وأكثرها شيوعاً Acticoat التي تكون مغلفة ببلورات الفضة النانوية (Trop *et al.*, 2006). فضلاً عن استعمالها المفيدة فإنه توجد تأثيرات نسجية ضارة لجسيمات الفضة النانوية تصل إلى حدوث التهاب بكبد حيوانات التجربة مع توسع للجيبانيات (Sinusoid) وموت خلوي مبرمج (Apoptosis) و اظهرت جسيمات الفضة النانوية ايضاً تغيرات فسلجية اذ ادت الى نقصان في

مستوى هورمون التستستيرون (Testosterone) بمصل حيوانات التجربة البالغة والمجرعة مدة 28 يوماً وبتركيز مختلفة (Sardari *et al.*,2012 ; Azza , 2014) .

1-1-3-1 تصنيع جسيمات الفضة النانوية

Synthesis of silver nanoparticles

لقد تمت الإشارة إلى عدة طرق لتصنيع جسيمات الفضة النانوية (AgNPs) Silver nanoparticles ، ومنها طرق كيميائية وفيزيائية وكيميائية ضوئية وبيولوجية حيث ان لكل طريقة مزايا وعيوب مع بعض المشكلات الشائعة مثل: التكاليف وقابلية التوسع وأحجام الجسيمات وتوزيع الحجم ، فضلاً عن ذلك فقد استخدمت الطرق الكيميائية لإنتاج Ag-NPs على نطاق واسع لانها توفر الية لتشكيل Ag-NPs في المحاليل (VonWhite *et al.*,2012) .

1-1-1-3-1 التصنيع الفيزيائي لجسيمات الفضة النانوية

Physical synthesis of silver nanoparticles

يمكن تكوين الجسيمات النانوية باستخدام التبخر والتكثيف والذي يمكن أن يحدث باستخدام فرن انبوبي تحت الضغط الجوي ، ومع ذلك في حالة استخدام فرن انبوبي تحت الضغط الجوي فستكون هناك عيوب مختلفة مثل: المساحة الكبيرة للفرن الأنبوبي واستهلاك الطاقة الكبير بسبب رفع درجة حرارة حول المادة فضلاً عن القليل من الوقت لتحقيق الاستقرار الحراري ، وعليه يمكن العثور على طرق مختلفة لتكوين جزيئات الفضة النانوية بشكل مستقل عن النهج الفيزيائي الذي تم تطويره ، اذ تم تطوير طريقة التحلل الحراري لتركيب Ag-NPs في شكل مسحوق (Kumar *et al.*,2013) .

أشارت دراسة اجراها (Jyoti *et al.* (2016) إلى تطوير نهج غير تقليدي للتصنيع المادي لجسيمات الفضة النانوية بالطرق الفيزيائية ، اذ تم تجميع الجسيمات النانوية المعدنية البارزة عن طريق رش المعادن مباشرة في اوساط سائلة ، و توفر الطريقة التي تجمع بين الترسيب الفيزيائي للمعادن في البروبان -1 ، 2 ، 3- ثلاثي (الجلسرين) propane-1,2,3-triol (glycerol) حيث يوفر بديلاً لتقنيات التخليق الكيميائي القائمة على اساس الرطوبة والتي تستغرق وقتاً طويلاً.

2-1-1-3-1 التصنيع الكيميائي الضوئي لجسيمات الفضة النانوية

Photochemical synthesis of silver nanoparticles

هنالك طريقتين مختلفتين يمكن استخدامهما لتقسيم التصنيع الضوئي وهما: الفيزيائي الضوئي والكيميائي الضوئي ، و يمكن أن تحضر الجسيمات النانوية NPs عبر التقسيم الفرعي للمعادن السائبة ويولد الأخير من السلائف الأيونية ، و تتكون الجسيمات النانوية من الاختزال الضوئي المباشر لمصدر معدني أو اختزال أيونات المعادن باستعمال وسيطات متولدة بشكل كيميائي ضوئي مثل الجزيئات المثيجة والجذور الحرة وتدعى هذه العملية بـ Photosensitization التحسس الضوئي في تصنيع الجسيمات النانوية (Christy & Umadevi, 2012).

ان عملية الاختزال الضوئي المباشر لنترات الفضة $AgNO_3$ تجرى في وجود سترات الصوديوم بمصادر ضوء مختلفة (الأشعة فوق البنفسجية والأبيض والأزرق والسماوي والأخضر والبرتقالي) في درجة حرارة الغرفة (Johnson & Prabu, 2015).

3-1-1-3-1 التصنيع البايولوجي لجسيمات الفضة النانوية

Biosynthesis of silver nanoparticles

تصنع جسيمات الفضة النانوية AgNPs عن طريق التصنيع الكيميائي حيث يتم استخدام ثلاثة مكونات رئيسية: املاح الفضة (عادة $AgNO_3$) وعامل تخفيض (مثل Ethylene Glycol) ومثبت أو عامل تثبيت للتحكم في تكوين الجسيمات النانوية ومنعها من التراكم ، و في حالة التصنيع البايولوجي لجسيمات الفضة النانوية يتم استبدال عامل التخفيض والمثبت بجزيئات يتم إنشاؤها من البكتيريا والفطريات والخمائر والطحالب أو النباتات (Sintubin *et al.*, 2012). وكذلك يتم التخليق الحيوي بشكل سهل باستخدام بكتيريا *Shewanella oneidensis* المختزلة للمعادن والمعاملة بمحلول نترات الفضة (Suresh *et al.*, 2010).

2-1-3-1 التطبيقات الطبية الحيوية لجسيمات الفضة النانوية

Biomedical applications of silver nanoparticles

تم توجيه الاهتمام الكبير نحو التقييم المتعلق بالطب الحيوي لجسيمات الفضة النانوية والتي جذبت انتباه العالم باعتبارها عوامل غير تقليدية مضادة للميكروبات (Geraldo *et al.*, 2016). على الرغم من وجود معلومات محدودة بشأن السمية والسلوك البيولوجي في الجسم الحي لـ AgNPs فقد تم استخدام هذه الهياكل النانوية لمدة طويلة كعوامل مضادة للجراثيم في الاستخدامات الصحية ومستحضرات التجميل وتخزين الطعام والطلاءات وبعض التطبيقات البيئية (Burdus *et al.*, 2018).

و على الرغم من أن الآلية الدقيقة المضادة للأمراض لجزيئات الفضة النانوية لا تزال بحاجة إلى المزيد من التوضيح ، فمن المفترض أن الأنظمة القائمة على جسيمات الفضة النانوية تمارس آثارها المضادة للميكروبات عبر الظواهر الآتية:

- تلف الغشاء الميكروبي الناجم عن الارتباط الموجه فيزيائياً كيميائياً لجسيمات الفضة النانوية على سطح الخلية والتعديلات الهيكلية والوظيفية اللاحقة (مثل تكوين الفجوة Gap، عدم استقرار الغشاء ، وثقب الغشاء ، ارتشاح السيتوبلازم).
- تلف البنية الخلوية الميكروبية والناجمة عن إطلاق أيونات الفضة (Ag⁺) الحرة وتوليد أنواع الأكسجين التفاعلية اللاحقة (ROS) أو تعطيل الجزيء الضخم الأساسي (البروتينات والإنزيمات والنيوكليوتيدات) (Duran *et al.*, 2016 ; Akter *et al.*, 2018).

ومع ذلك فإن الآلية الأكثر وضوحاً للتأثيرات المضادة للميكروبات للـ AgNP يتمثل في التصاقها بالخلايا الميكروبية وتوليد الجذور الحرة وكذلك اختراق الجدار الميكروبي والاختراق داخل الخلايا ، وتعديل مسارات نقل الإشارات الميكروبية (Thomas *et al.*, 2015).

لقد تم تقييم فعالية المواد الحيوية القائمة على الفضة النانوية كعوامل واعدة مضادة للميكروبات تجريبياً ضد طيف واسع من الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض والعوالق ذات الصلة الطبية ، بما في ذلك البكتيريا والفيروسات والفطريات والخمائر، و يعد النشاط المذهل لمضادات الميكروبات لـ AgNPs نقطة انطلاق قوية لتصميم وتطوير وتنفيذ منتجات طبية حيوية جديدة

تعتمد على الفضة النانوية ومعززة بالأداء مثل: العوامل المضادة للسرطان ومنصات توصيل الأدوية ومواد وأجهزة تقويم العظام والضمادات وبخاخات مطهرة (Burdus *et al.*, 2018).

نتيجة للتطور المذهل لـ AgNPs في مجالات تكنولوجيا النانو والطب الحيوي والبيئة فكان هناك حاجة مستمرة لتطوير طرق فعالة من حيث التكلفة لتصنيع AgNPs ، ان تطوير تقنية الفضة النانوية في التطبيقات السريرية لا تتطلب تطوير طرق آمنة وبسيطة وصديقة للبيئة وفعالة من حيث التكلفة لتخليق AgNPs فحسب بل تتطلب أيضاً فهماً شاملاً للخصائص الفيزيائية والكيميائية ذات الصلة في التأثيرات المباشرة في الجسم الحي والتوزيع الحيوي وآليات مراقبة السلامة والحركية الدوائية والديناميكا الدوائية لـ AgNPs (Wei *et al.*, 2015 ; Singh *et al.*, 2015).

3-1-3-1 تأثير جسيمات الفضة النانوية في خفض الكوليسترول في الدم

The effect of silver nanoparticles on lowering blood

Cholesterol

ان جسيمات الفضة النانوية قادرة على أكسدة الدهون في الجسم (Ahmadi *et al.*, 2013). لذلك كانت إدارة جسيمات الفضة النانوية فعالة في تقليل كمية الدهون الثلاثية في الدم (Al-Dujaili & Al-shemeri, 2016).

لقد اثبتت دراسة ان تناول AgNP عن طريق الفم تسبب أكسدة الدهون وعليه يجب أن يكون للتسريب المحيطي للجسيمات النانوية تأثير بيولوجي مكثف على حالة التأكسد والتي تزيد من زيادة توليد انواع الاوكسيجين التفاعلية (Reactive oxygen species (ROS) وبالتالي التأثير على صورة الدهون في الدم (Lotfi *et al.*, 2017).

و يمكن أن يؤدي التعرض لـ AgNP إلى تغيير نسبة الدهون في الدم حيث ان التغذية بـ AgNP لها تأثير في نقص دهون الدم مع انخفاض مستوى الدهون الثلاثية في الدم ولكن في دراسة أجريت بواسطة Sulaiman *et al.* (2015) اقترحت ان تناول Ag-NP عن طريق الفم تسبب زيادة مستويات الكوليسترول الكلي والدهون الثلاثية في الدم.

ومن جانب اخر تستخدم شجرة المورينغا Moringa في خفض مستوى الدهون في الدم، و المورينغا شجرة صغيرة أو متوسطة الحجم تزرع على نطاق واسع وفاكهة هذه الشجرة صالحة للأكل وتشكل أحد أطباق الخضار الشائعة بعض البلدان و تمت دراسة أجزاء مختلفة من هذه شجرة للعديد من الإجراءات الدوائية ، اذ استخدم مستخلص الأوراق للمورينغا لتثبيط بعض انواع البكتريا، بينما يمتلك مستخلص اللحاء نشاطاً مضاداً للفطريات ، وتستخدم العديد من تركيباتها في علاج تصلب الشرايين تم استخدام أوراق المورينغا من قبل بعض البلدان الاسيوية في طبهم العشبي كعامل خافض لكوليسترول الدم لدى المرضى الذين يعانون من السمنة المفرطة (Mehta et al., 2003) .

Moringa

4-1 المورينغا

Characteristics of Moringa

1-4-1 خصائص المورينغا

المورينغا اشجار سريعة النمو من النباتات مغطاة البذور اسمها العلمي *Moringa oleifera Lam.* والاسم المرادف لها *Moringa pterygosperma Gaertn* ويطلق عليها اسم شجرة اليسر او البان الزيتوني او الشجرة المعجزة وفي اللغة الانكليزية يطلق عليها اسم شجرة عصا الطبل (Drumstick tree) وذلك لطول قرناتها ويطلق عليها ايضاً شجرة فجل الحصان (Horseradish tree) سبب ذلك يعود الى طعم جذورها الذي يشبه طعم جذور الفجل ، في حين يطلق عليها في الهند اسم Sohanjana او Munaga او Shigru (Patel et al.,2010 ; Sanjay & Dwivedi , 2015) .

وتتمو شجرة المورينغا في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية ، ويرجع اصلها الى الهند وتزرع في جميع انحاء العالم في المناطق التي يكون معدل سقوط امطار فيها 750- 2400 ملم سنويا ، وبدرجة حرارة 16 الى 42 درجة مئوية ، ودرجة الحموضة pH بين (5.3-8) ، بينما في الوقت الحاضر انتشرت زراعتها في الشرق الاوسط وكذلك في افريقيا والدول الاسيوية ، ومازالت منتشرة في مناطق كثيرة من العالم (Leone et al.,2015).

يصل ارتفاع شجرة المورينغا حوالي 3-12م ، وقطرها حوالي 20-40 سم، اذ تعد من الاشجار الصغيرة ومتوسطة الحجم ذات ساق قائم وهش ، في حين قلف شجرة المورينغا يكون ابيض ناعم يميل الى الرمادي، وهي من الاشجار المعمرة وتحتوي على افرع متدلية ، اما أوراق

نبات المورينغا فهي متبادلة من نوع ورقة مركبة مضاعفة حيث تحتوي على محور رئيسي طويل (75-25سم) وفرع مشترك ، و سويقاتها طويلة مع 6-10 أزواج من الوريقات (Karthika et al., 2013 ; Qureshi & Solanki , 2015).

ان ازهار نبات المورينغا تكون صغيرة بيضاء اللون ثنائية الجنس Bisexual تضم خمسة اوراق كاسية وخمس اوراق تويجية تُحَف بخمس اسدية stamens وخمس staminodes (Chaudhary & Chaurasia , 2017 ; Kalappurayil & Joseph , 2017)

اما ثمار نبات المورينغا تكون على هيئة كبسولات ، وعادة ما يشار اليها كقرنات، في حين الثمرة غير الناضجة تظهر خضراء اللون وعند النضج تتحول الى اللون البني وتكون متدلّية ومضلعة وتتضمن ثلاثة زوايا تحتوي على 10-20 بذرة ، و اما البذور فتكون بشكل بيضوي تحتوي على ثلاث زوايا و ثلاث اجنحة تمتد من الاعلى الى الأسفل (Taher et al, 2017)

المجموع الجذري وصفة (Sulaiman et al., 2019) حيث ذكر ان لشجرة المورينغا جذر رئيسي متدرن مما يساعدها على تحمل ظروف الجفاف والمياه القليلة ، وبين (Gopalakrishnan et al., 2016) ان هذا النبات ربما لا يكون له نظام جذري جيد وعميق و لهذا فانه يميل إلى أن يكون حساس للرياح.

The importance of Moringa

1-4-2 اهمية المورينغا

لقبت المورينغا بالشجرة المعجزة Miracle Tree يعود ذلك لأهميتها الغذائية والطبية والصناعية وكذلك اهميتها البيئية (S.Hegd & V.Hegd, 2013 ; Koul & Chase , 2015 ; Saini et al., 2016).

ان اوراق نبات المورينغا هي الجزء الاكثر استخداما في النبات وذلك يعود لاحتوائها على نسب عالية من المعادن والكربوهيدرات فضلا عن البروتينات كما تتضمن مركبات نشطة بيولوجيا كالفيتامينات vitamins الكاروتينات carotenoids ، ومتعدد فينول polyphenol والقلويدات alkaloids والتانينات tannins وايضا الصابونينات saponins (Oladeji et al., 2017). فضلا عن الكلايكوسيدات glycosides الفلافونويدات flavonoids والستيرولات النباتية Phytosterols (Yadav et al., 2017).

3-4-1 استعمالات المورينغا الغذائية Moringa nutritional uses

تعد المورينغا من الأشجار ذات القيمة الغذائية المهمة و تتضح اهميتها عند مقارنتها بغيرها من المحاصيل والمواد الغذائية ، فلها محتوى عالي من الكربوهيدرات (Burham, 2017). وغنية بالبروتين فضلا عن المعادن الضرورية التي يحتاجها الجسم مثل الكالسيوم والمغنيسيوم والبوتاسيوم والحديد والزنك والفسفور (Sodamade et al., 2017) . وتحتوي على مجموعة جيدة من الفيتامينات فيتامين C وفيتامين E وفيتامين A ومجموعة فيتامين B (B1, B2, B3) ومصدر للأحماض الامينية ، اذ تمتلك قيمة غذائية جيدة وبذلك يمكن ان تكون مصدراً للمكملات الغذائية بالمستقبل حيث تؤدي الى تغذية متوازنة (Pawaskar & Sasangan , 2017).

4-4-1 استعمالات المورينغا العلاجية Moringa medicinal uses

بين كل من (Charoensin , 2014) و Karim et al.(2016) ان المورينغا تعمل على منع انتشار الخلايا السرطانية بالإنسان وذلك يعود الى ارتفاع النشاط المضاد للاكسدة في هذا النبات. وبين (Fombang & Saa , 2016) في دراستهما ان تناول الانسان لشاي نبات المورينغا بمقدار 200 مل خفض مستوى السكر بالدم 36.57% بعد اكثر من 90 دقيقة واطهر الباحثان ان سبب ذلك يعود لاحتواء اوراق نبات المورينغا على الفلافونويدات فضلا عن العديد من مضادات الاكسدة مثل α -tocopherol وهذا ادى الى زيادة افراز الانسولين مما ادى الى انخفاض مستوى السكر بالدم. واثبت (Omolaso et al.(2016) عند تناول الانسان اوراق نبات المورينغا الطازجة يؤدي الى خفض ضغط الدم Hypotensive يعود ذلك لاحتوائها على كليكوسيدات Mustard oil glycosides و Thiocarbamate glycosides .

وفضلا عن احتوائها على العديد من المركبات النشطة المهمة مثل الكاروتين وفيتامين C وفيتامين A وفيتامين E وهذه تعد من مضادات الاكسدة التي تعمل على منع نشاط الجذور الحرة في الجلد المسببة ضرر للأنسجة والشيخوخة ، حيث تساعد المورينغا على العناية بالجلد وتقليل اعراض الشيخوخة (Ali et al.,2013 ; Singh et al.,2017) . ووضح كل من (Paula et al.,(2017) و Omodanisi et al.,(2017) ان التغذية على اوراق نبات المورينغا تؤدي الى انخفاض بنسبة السكر في الدم وايضا البروتينات الدهنية في الجردان المصابة بداء السكر المستحث تجريبيا. كما ان أوراق نبات المورينغا يعد مصدر جيد لمضادات الاكسدة ومضادات الالتهابات (Kambizi et al.,2017). واوراقها مهمه في مكافحة

الربو والالتهاب الرئوي والتهاب الشعب الهوائية وداء الاسقربوط فضلا عن امراض العين (Sujatha & Patel , 2017 ; David *et al.*,2017) .

1-4-5 أهمية المورينغا في علاج فرط الكوليسترول

The importance of moringa in treating hypercholesterolemia

ان للمورينغا استخدامات غذائية وعلاجية اذ تستعمل في علاج ارتفاع الكوليسترول وارتفاع السكر في الدم ، و كمثل غذائي يمكن وصفها كملحق غذائي لمرضى مرض الشريان التاجي جنبا إلى جنب مع الأدوية العادية ، و اشارت دراسة اجراها (El-Rabey *et al.*,2018) ان الجرعات المنخفضة من مسحوق بذور المورينغا (50 و 100 ملغم / كغم من وزن الجسم) نشطة ضد ارتفاع السكر في الدم وفرط كوليسترول الدم .

ان نبات المورينغا يؤدي إلى خفض مستوى الكوليسترول بالدم وذلك لأنها غنية بالستيرولات النباتية Phytosterols ، و السيترول النباتي يمتلك خصائصاً كيميائية مشابهة الى درجة كبيره للكوليسترول والتي تمكنه من منع امتصاص الكوليسترول عن طريق التنشيط التنافسي ويعمل السيترول النباتي على تقليل مستوى الالتهابات والام الى حد كبير كما يعمل في الحد من التهاب البروستات prostatitis ومعالجة الصدفية Psoriasis (Talreja & Goswami , 2013 ; Mannock *et al.*,2015) .

وفي دراسة اجريت بواسطة (Masih *et al.*,2019) على الحيوانات والبشر، اوضحوا أن المورينغا قد يكون لها تأثيرات مهمة لخفض مستوى الكوليسترول في الدم.

و تتميز أوراق نبات المورينغا وهي الجزء الأكثر استخداماً في النبات بوجود عدد كبير من المركبات النشطة بيولوجياً بما في ذلك الفيتامينات والكاروتينات ومتعدد الفينول (الأحماض الفينولية والفلافونويد) لهذا السبب ، وتم استخدام أوراق المورينغا لعلاج عدد من الحالات بما في ذلك مقاومة الأنسولين وأمراض القلب والأوعية الدموية والتكس الدهني الكبدي والسرطان وغيرها لقد ثبت أيضاً أن المورينغا لها نشاط كبدى حيث تقلل من دهون البلازما للفئران التي تتغذى على نظام غذائي غني بالدهون ، فضلاً عن ذلك وجد أن المورينغا لها دور في حماية القلب من احتشاء عضلة القلب الناجم عن الأيزوبروتيرينول عبر التأثير على أنشطة العديد من الإنزيمات المرتبطة بالأكسدة (Almatrafi *et al.*,2017) . و اشارت دراسة اجريت من قبل (Mehta *et al.*,2003) أن مركبات الفلافونويد Flavonoids والصابونين saponins الموجودة

في المورينغا تزيد من كوليسترول HDL وتخفض كوليسترول LDL والكوليسترول منخفض الكثافة جداً (VLDL) في الجردان المصابة بفرط كوليسترول الدم . ويبدو أن مركبات الفلافونويد Flavonoids والصابونين Saponins تخفض امتصاص الكوليسترول عن طريق تثبيط قابلية ذوبان الكوليسترول (Chávez-Santoscoy *et al.*,2013) .

لقد تم استخدام أوراق المورينغا من قبل الهنود في الطب العشبي كعامل خافض للكوليسترول في الدم في مرضى السمنة ، وأجريت دراسة من قبل (Ghasi *et al.*,2000) لفحص الأساس العلمي لاستخدامها في علاج فرط كوليسترول الدم ، حيث تم اختبار المستخلص الخام لأوراق المورينغا وأظهر أنها تمتلك نشاط خافض للكوليسترول في الدم ، وقاد ذلك إلى استنتاج أن هناك أساساً دوائياً صالحاً للاستخدام لهذا الغرض.

وأشار (Aborhyem *et al.*,2016) ان استعمال المورينغا كان دوره مشابهاً لأدوية نقص شحميات الدم مثل أتورفاستاتين (Atorvastatin) في تحسين المظهر الدهني للفئران التي تتغذى على نظام غذائي تصلب الشرايين ، يعد تناول المورينغا أكثر فعالية في الوقاية من علاج فرط شحميات الدم ، لذلك ، يجب زيادة وعي الناس بالأثر النافع لهذه الشجرة المعجزة .

5-1 الكيمياء النسيجية المناعية : Immunohistochemistry (IHC)

الكيمياء النسيجية المناعية ، تقنية مستخدمة للكشف عن مستضدات معينة في الأنسجة كالبروتينات او السيتوكينات وغيرها وصبغها باضداد موسومة بالاعتماد على مبدأ الارتباط بين الاجسام المضادة بالمستضدات في الأنسجة وتظهر هذه التقنية ثلاث مستويات للتعبير عن الارتباط (منخفض +1 و متوسط +2 و مرتفع +3) في التشخيص (Magaki *et al.* , 2019).

و تعد الكيمياء النسيجية المناعية تقنية مهمة لتحديد المكونات الخلوية أو الأنسجة عن طريق تفاعلات الجسم المضاد مع مولد الضد Antigen-antibody interactions ، ويتم تحديد موقع ارتباط الجسم المضاد عن طريق وضع العلامات المباشرة على الجسم المضاد ، أو باستخدام طريقة الوسم الثانوية ، حيث تسمح الطريقة الكلاسيكية المستخدمة في تقنية الكيمياء النسيجية المناعية (IHC) بتصوير مستضدات معينة في الأنسجة أو الخلايا بناءً على التعرف على الأجسام المضادة والمستضد ، باستخدام الفحص المجهرى الساطع Brightfield أو الفلوريسنت ، ويعود تاريخ IHC إلى أوائل الأربعينيات ، عندما اكتشف كونز Coons وزملاؤه مستضدات في مقاطع الأنسجة المجمدة عبر تطوير تقنية التآلق المناعي Immunofluorescence (Coons *et al.*,1941) .

ان الطريقة المعتمدة على الأجسام المضادة و التي تحمل محدد البيروكسيداز Peroxidase فتحت الباب أمام تطوير مناهج أكثر تقدماً ، مما أتاح استخدام IHC في مقاطع الأنسجة التي تتم معالجتها بشكل روتيني ، مثل البارافين المثبت بالفورمالين- الأنسجة (FFPE) ، ومع ذلك ، فقد استغرق الأمر حتى أوائل التسعينيات حتى تصبح الطريقة مقبولة بشكل عام في علم الأمراض التشخيصي (Nakane,1968) .

و على الرغم من أن التحليل النسيجي لمقاطع الأنسجة المصبوغة بالهيماتوكسيلين والأبوسين ، فقد أصبحت الكيمياء النسيجية المناعية أداة قوية في علم الأمراض ، اذ يتم اختيار الأجسام المضادة للاختبار IHC على أساس خصوصية الورم واحتمالية تفاعلها مع الورم . وتعد الكيمياء النسيجية المناعية IHC هي تقنية مساعدة لتسهيل تشخيص الاصابات المعدية والأورام في الحيوانات (Kabiraj et al ,. 2015) .

ان الكيمياء النسيجية المناعية (IHC) طريقة مساعدة مهمة لعلماء الأمراض في العمل التشخيصي الروتيني وكذلك في الأبحاث الأساسية والسريرية بما في ذلك استكشاف المؤشرات الحيوية ، حيث تسمح IHC بتأكيد تعبيرات الجزيئات المستهدفة ، وتعد أيضاً طريقة مساعدة مهمة لأخصائيي علم الأمراض لأنها تصور على وجه التحديد توزيع وكمية جزيء معين في الأنسجة باستخدام تفاعل معين للأجسام المضادة ، ومؤخراً تم توسيع نطاق تطبيقات (IHC) بشكل كبير حيث تم اكتشاف المزيد من الجزيئات المشاركة في التسبب في الأمراض وتشخيصها وعلاجها ، ان الميزة الفريدة التي تميز IHC بين العديد من الاختبارات المعملية الأخرى هي أنه يتم إجراؤها دون تدمير البنية النسيجية ، وعليه فإن تقييم نمط التعبير عن الجزيء ممكن في سياق البيئة المكروية (Schacht & Kern , 2015 ; Kim et al ., 2016) .

من المحتمل أن يتم إجراء التحليل المشترك لكل من الجزيء المستهدف ، (وتحت الخلوية Subcellular ، والخلوية Cellular ، وداخل الخلايا Intracellular) بشكل أفضل من قبل علماء الأمراض ، ويتم التعرف بشكل متزايد على أهمية هذا التحليل المشترك في مجال البحوث الطبية الحيوية مثل تطوير الأدوية الجديدة والعلامات الحيوية (O’Hurley et al ., 2014) .

يعد استخدام IHC شائع من قبل الأطباء للكشف عن الخلايا غير الطبيعية الموجودة في حالات مرضية مثل السرطان وتشخيصها ، وتتميز المؤشرات الحيوية الخاصة بحالة المرض بأحداث معينة مثل موت الخلايا أو موت الخلايا المبرمج أو التكاثر ، والتي تؤدي إلى حدوث خلل.

يمكن أيضاً استخدام IHC ، كمؤشر للعلاج والتشخيص والنتيجة ، على سبيل المثال بعض أنواع سرطان الثدي وليس كلها. وفي الدراسات البحثية ، لتقييم موقع البروتينات داخل الخلية ، على سبيل المثال في النواة أو السيتوبلازم أو الغشاء (Ramos-Vara, 2011) .

يتم اختيار الأجسام المضادة للاختبار الكيميائي المناعي على أساس خصوصية الورم واحتمالية تفاعلها مع الورم قيد التقييم ، فبعد تحضين مقاطع الأنسجة بالأجسام المضادة المحتملة، يتم تحديد التفاعلات الإيجابية (مستضد الورم - ارتباط الجسم المضاد) عبر تطبيق أحد أنظمة الكشف العديدة ، ان الأشخاص الذين لديهم حساسية أكبر يستخدمون الجسم المضاد الثانوي ، المتفاعل ضد الجسم المضاد الأولي ، المرتبط بالإنزيم المعلم Enzyme marker ، اذ يميل هذا النظام إلى أن يكون شديد الحساسية لأنه يسمح بربط عدد كبير نسبياً من جزيئات الإنزيم ، مثل البيروكسيد في موقع المستضد. ، و يتم تحديد لون التفاعل عبر اختيار الكروموجين المترسب، وعادة ما يكون ثنائي امين بنزيدين Diaminobenzidine (بني) أو أمينو إيثيل كاربازول Aminoethylcarbazole (أحمر) ، والذي يتفاعل معه الإنزيم (Jordan et al., 2002) .

1-5-1 المستضدات والأجسام المضادة والـ Epitopes

Antigens, antibodies and epitopes

يُطلق على موقع ربط المستضد Ag مع الضد Ab اسم Paratope ، بينما تعد الـ Epitopes مناطق Ag والتي ترتبط بـ Abs ، و تتكون الـ Epitopes عادة من 5-21 حمضاً أمينياً طويلاً ، أحد أهم معايير ربط Ab هو البنية الثلاثية للحلقة ، أو الطريقة التي يتم بها طي سلاسل الببتيد للبروتين معاً أو التفاعل مع الببتيدات المجاورة ، حيث يتفاعل Paratope مع البنية الثلاثية Epitopes عبر سلسلة من تفاعلات الارتباط غير التساهمي ، وكلما زادت تفاعلات الارتباط زاد التقارب والشغف Affinity and Avidity (يُعرّف على أنه قوة الربط الإجمالية بين Ag و Ab) لـ Ab ، إن Abs ثنائي التكافؤ (له ذراعان متطابقان يستخدمان في التعرف على Ag) ، و هذه ميزة أساسية ضرورية لاستخدامها كطرق كيميائية مناعية متعددة الطبقات (Ramos-Vara , 2005) .

2-5-1 استعادة Epitope (المستضد) Retrieval epitope (Antigen)

بعد التثبيت ، قد تكون Epitopes متشابكة ومغطاة مما يجعل من الصعب ربط الجسم المضاد ، و عبر المعالجة المسبقة بكواشف أو إجراءات استرجاع المستضد ، يمكن للباحثين إعادة

فتح الحلقات المتشابكة بحيث يمكن للأجسام المضادة الارتباط بسهولة بالمستضدات المستهدفة ، تم نشر العديد من الطرق لاسترجاع المستضد على نطاق واسع ، بما في ذلك الاسترجاع بالحرارة اوبالإنزيم ، ان الكواشف المتاحة تجارياً متوفرة أيضاً من مصادر متعددة (Lin *et al.*, 2005).

3-5-1 التعامل مع الأنسجة مباشرة بعد اخذ العينات والتثبيت والمعالجة

Tissue handling immediately after surgery, fixation and processing

يشير مصطلح نقص التروية "Ischemia" إلى الوقت الذي يبدأ فيه فصل الأنسجة أو العضو عن إمداد الأكسجين عبر إزالة عينة من الجسم عن طريق الجراحة ، وحتى تثبيت العينة ، و يؤدي نقص Ischemia إلى تحطم البروتين و RNA و DNA ، فضلاً عن تنشيط إنزيمات الأنسجة والتحلل الذاتي ، وعليه يمكن أن يكون عاملاً رئيساً يؤثر على نتائج IHC (Kumar *et al.*, 2005).

ان التثبيت خطوة حاسمة أخرى في عملية IHC للحفاظ على مورفولوجيا الأنسجة والاحتفاظ باستضاد الجزيئات المستهدفة واستخدامها شائع على نوعين من المثبتات في التشريح المرضي :

1. مثبتات غير متخثرة (الفورمالديهايد Formaldehyde ، الكلوتارالدهيد Glutaraldehyde ، تيروكسيد الأوزميوم Osmium tetroxide ، ثاني كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate وحمض الخليك Acetic acid) .
2. مثبتات التخثر (الكحول Alcohol ، أملاح الزنك Zinc salts ، كلوريد الزئبق Mercuric chloride ، ثالث أكسيد الكروم Chromium trioxide وحمض البيكريك Picric acid).

المثبت الأكثر شيوعاً المستخدم في علم أمراض الأنسجة هو 10 ٪ من الفورمالين Neutral-buffered formalin ، و يتكون هذا من 4٪ محلول Paraformaldehyde الذي يتم تخزينه إلى درجة حموضة متعادلة ، ان الفورمالين يربط الببتيدات عن طريق تكوين مجموعات هيدروكسي ميثيل Hydroxymethyl groups على سلاسل جانبية من الأحماض الأمينية التفاعلية ، مما يوفر حماية ممتازة لبنية الأنسجة ، ومع ذلك ، فإن تثبيت الفورمالين يمكن أن يحجب Epitopes وينتج عنه انخفاض في توليد Ag ، وهناك عدة عوامل تؤثر على طريقة تثبيت الفورمالين ، مثل درجة الحرارة ، والوقت ، ومعدل الاختراق ، وبعدها العينة ، ونسبة الحجم ،

ودرجة الحموضة في المحلول الملحي المؤقت Osmolality ، ولكن لسوء الحظ ، هناك نقص في الإرشادات المتاحة لإنشاء ممارسة معيارية في مختبرات علم الأمراض (O'Hurley et al., 2014).

4-5-1 التخزين المناسب والتعامل مع مقاطع الأنسجة

Appropriate storage and handling of tissue sections

ان العامل الآخر الذي قد يؤثر في نتيجة IHC هو تخزين مقاطع الأنسجة المحضرة (Williams et al., 1997 ; Wester et al., 2000) ، و تم اقتراح أن تخزين مقاطع الأنسجة لمدة تزيد عن شهرين يؤدي إلى فقدان تفاعل مستضد p53 (Prioleau & Schnitt, 1995). الآليات الكامنة وراء فقدان Ag في أنسجة FFPE غير واضحة ، و تم الافتراض بأن الأكسدة قد تكون المساهم الرئيسي في فقد Ag (Sauter & Mirlacher, 2002 ; Blind et al., 2008).

بما أن تحلل البروتين يعتمد على درجة الحرارة ، فقد تمت الدعوة إلى مجموعة كبيرة ومتنوعة من ظروف التخزين للمقاطع المقطوعة مثل التخزين البارد أو طلاء البارافين أو المجففات محكمة الغلق ، ومع ذلك ، فقد تم اقتراحه مؤخرًا من قبل Xie et al. (2011) أن وجود الماء على حد سواء داخليًا وخارجيًا يلعب دورًا رئيسيًا في فقدان Ag ، لذلك ، فإن ظروف تخزين الشرائح المحمية من الأكسدة عن طريق تخزين الفراغ أو شمع البارافين لا تحمي تمامًا الشرائح من فقدان Ag إذا كانت المياه المتبقية من معالجة الأنسجة غير الكافية موجودة على الأنسجة ، وعليه ، لم يتم بعد تحديد التخزين الأمثل للمقاطع غير الملوثة ، مما يجعل المقاطع أو المقاطع المقطوعة حديثًا المخزنة لمدة تقل عن شهرين مثالية. للتخزين طويل الأجل ، يوصى غالبًا باستخدام حاويات مفرغة من الهواء أو تخزينها في ظروف أكثر برودة (+4 / -18) (Xie et al., 2011).

5-5-1 استرجاع الـ Epitope المناسبة والفعالة

Appropriate and efficient epitope retrieval

الخطوة الرئيسية التي يجب مراعاتها بعناية عند إجراء اختبارات IHC هي استرجاع المستضد (AR) Antigen Retrieval . وهناك طريقتان لاسترجاع المستضد هما :

1. استرجاع Epitope المستحث بالحرارة (HIER) Heat-induced epitope retrieval .
2. استرجاع Epitope المستحث بالانزيمات المحللة للبروتينات Proteolytic enzyme-induced epitope retrieval (PIER)

من بين الطريقتين المشار اليهما سابقاً ، يتم استخدام HIER بشكل شائع ، لقد تم وصف التقنية لأول مرة من قبل (Shi *et al.*, 1991) وتم تطويرها بواسطة عدد من الباحثين (Cattoretti *et al.*, 1993; Greenwell *et al.*, 1993) لاستخدامها الروتيني في المختبرات في جميع أنحاء العالم ، ومع ذلك ، فإن آليات الواقع المعزز ليست مفهومة بالكامل.

من المتوقع أن يعمل كل من HIER و PIER على كسر جسور الميثيلين التي تم إنشاؤها أثناء التثبيت ، مما يؤدي إلى كشف مواقع المستضد من أجل السماح للأجسام المضادة بالارتباط (Fowler *et al.*, 2011).

هناك العديد من متغيرات AR المختلفة التي يمكن أن تؤثر على نتائج تصبغ IHC مثل التسخين واختيار محلول AR ودرجة الحموضة والمولارية وتأثير أيونات المعادن (Emoto *et al.*, 2005 ; D'Amico *et al.*, 2009) ، و يمكن لطريقة AR التي يتم التحكم فيها بشكل مناسب استعادة مولد الضد Ag في أنسجة المثبتة بالفورمالين المظمورة بالبارافين (FFPE) لتشبه مستضدات الأنسجة المجمدة ، ان بروتوكول AR المناسب يعتمد على كل من الجسم المضاد والبروتين المستهدف ، ويحتاج إلى تحسين كل جسم مضاد. (D'Amico *et al.*, 2009)

1-5-6 الاختيار المناسب للأجسام المضادة (أحادية النسيلة مقابل متعددة النسيلة)

Appropriate choice of antibody (monoclonal vs polyclonal)

النقاط الأساسية الثلاثة التي يجب أخذها في الاعتبار عند شراء الأجسام المضادة الأولية

التجارية لـ IHC هي كما يلي:

1. استخدام شركات موثوقة وموصى بها .
2. الحصول على معلومات كاملة عن الجسم المضاد للتأكد من أنه قابل للتطبيق أو موصى به لـ IHC .
3. وصف خصوصية الجسم المضاد.

لا يتم تحليل عدد كبير من الأجسام المضادة التجارية بدقة للربط خارج الهدف
(Nilsson et al., 2005) .

فضلاً عن ذلك ، لا تقدم العديد من الشركات تسلسل المستضد الذي تم رفع الجسم المضاد
ضده ، وعليه ، فإن التحقق من صحة الجسم المضاد هو خطوة إلزامية قبل متابعة IHC
(Saper, 2009) .

يؤدي اختيار استعمال الأجسام المضادة الأولية أحادية النسيلة أو متعددة النسيلة لـ IHC
إلى تعقيد مسألة خصوصية Epitope وتحديد أي جسم مضاد سيكون أكثر ملاءمة
لـ IHC (Bordeaux et al., 2010) .

ان الأجسام المضادة متعددة النسيلة هي مجموعة من الأجسام المضادة تستهدف Epitope
متعددة لمستضد معين ، و بشكل عام ، عندما يتم حقن حيوان بمستضد معين ، يقوم الجهاز المناعي
بإصدار استجابة مناعية أولية عن طريق إنتاج عدة نسخ من الخلايا البائية ضد المستضد ، و بعد
التطعيم اللاحق بنفس المستضد ، تتمايز هذه الخلايا البائية B cells إلى خلايا بلازما Plasma
cells تنتج وتفرز الأجسام المضادة الموجودة في المصل ، و يمكن تنقية المصل الذي يحتوي على
أجسام مضادة متعددة النسيلة باستخدام المستضد Ag على شكل Ligand ، والذي يقضي على
99% من الأجسام المضادة التي تتعرف على أهداف أخرى غير المستضد Ag ، ينتج عن هذا
الإجراء أجسام مضادة ذات نوعية أعلى من الأجسام المضادة التقليدية متعددة النسيلة ، مع الاحتفاظ
بالقدرة على التعرف على Epitopes مختلفة على نفس المستضد (Lindskog et al., 2005) .

و يتم إنشاء الجسم المضاد أحادي النسيلة عن طريق اختيار خلية B واحدة من الطحال أو
نخاع العظم للحيوان المطعم ويتم دمج الخلية مع خلايا نخاع الشوكي Myeloma cells لإنتاج
خلايا هجينة Hybridoma cells ، و على هذا النحو ، يحتوي الوسط الطافي على نوع واحد فقط
من الأجسام المضادة الخاصة بحلقة واحدة من الببتيد المناعي (Björling & Uhlén ,2008) .



الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods



Materials and Methods

2 المواد وطرائق العمل

1-2 المواد والأجهزة المستخدمة

Equipment and instruments

1-1-2 الادوات والمعدات

الادوات والمعدات المستخدمة في الدراسة الحالية :

جدول 1.2 الادوات والمعدات والشركات المصنعة لها

الشركة المصنعة	المنشأ	المعدات	ت
Hettich	Germany	Micropipette tips (1 ml)	1 أطراف الماصة الدقيقة (1 مل)
BioBasic Inc.	Belgium	Eppendorf tubes	2 انابيب ابندروف
BioBasic Inc.	Belgium	Serum separation gel tube	3 أنبوب جل لفصل المصل
Heidolph	Germany	Soxhlet extractor	4 جهاز سوكسيليت
Hettich	Germany	Centrifuge	5 جهاز طرد مركزي
Histo-Line	Italy	Microtome	6 جهاز مايكروتوم
Tafesa	Germany	Water bath	7 حمام مائي
LabTech	Korea	Hot plate	8 سخان حراري
Mheco	China	Glass slide	9 سلايدات زجاجية
Nawal	Turkey	Electric grinder	10 طاحونة كهربائية
MMC	China	Anatomy equipment	11 عدة تشريح
	Iraq	Sample storage boxes	12 علب حفظ العينات
Nawal	Turkey	Electric oven	13 فرن كهربائي
	Iraq	Medical Cotton	14 قطن طبي
تم تصنيعها	Local	Fixing plate	15 لوحة تثبيت الحيوانات
Slamed	Germany	Micropipettes (1 ml)	16 الماصة الدقيقة (1 مل)
Concord	Lebanon	Freezer	17 مجمدة
Motic	Germany	Light Microscope	19 مجهر ضوئي
Genex	USA	Binocular light microscope	18 مجهر فحص المقاطع المناعية

JiangSu JiChun	China	Medical needles (5 ml)	محاقن طبية (5 مل)	20
Tomy	USA	Magnetic stirrer	محرك مغناطيسي	21
GAMMA	China	Medical scalpels	مشارط طبية	22
Sartorius	Germany	Sensitive balance	ميزان حساس	23
Ingeco	China	Weighing scale	ميزان وزن	24
	Local	Cellulose Thimble	وعاء سيليلوز	25

Chemicals and solutions

2-1-2 المواد الكيميائية

المواد الكيميائية والمحاليل المستخدمة في هذه الدراسة في جدول (2-2)

جدول 2-2 المواد الكيميائية و المحاليل والشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة	المنشأ	اسم المادة الكيميائية	ت
TBS (Dako Cytomation)	England	Mounting media	1
PathnSitu	USA	Primary antibody	2
PathnSitu	USA	Secondary detection system	3
PathnSitu	USA	Target retrieval solution	4
Gainland Chem. Comp.	England	Ethanol absolute	5
Gainland Chem. Comp.	England	Xylen	6
BDH Chemical	England	Paraffin wax paraplast wax.55-60c milting point	7
BDH Chemical	England	Eosin Stain	8
BDH Chemical	England	Hematoxylin stain	9
Spinreact comp.	Spain	HDL kit	11
Spinreact comp.	Spain	عدة تحليل الكليسيريدات الثلاثية Triglyceride kit	12
Spinreact comp.	Spain	Cholesterol kit	13
Biosolve	USA	Formalin	10
BDH Chemical	England	Chloroform	14

Direvo Industrial Biotechnology GmbH	Germany	كوليسترول باودر	15
		Distilled water ماء مقطر	16
TBS (Dako Cytomation)	England	Rinse buffer محلول شطف	17

Method

2-2 طرائق العمل

Experiment Animals

1-2-2 حيوانات التجربة

تم الحصول على 30 أرنب من ذكور الارانب البيضاء ذات العيون الحمراء, من بعض مربى الارانب في محافظة بغداد والقادسية, يتراوح وزنها (1,086 – 1,860) غم. تم إيواء الحيوانات في البيت الحيواني لكلية الطب البيطري / جامعة كربلاء تحت ظروف درجة حرارة مضبوطة (25 ± 5 درجة مئوية) ودورات ضوء وظلام. بدأت الدراسة في كانون الثاني من عام 2020 واستمرت لمدة 4 اشهر، حيث تأقلمت الارانب لمدة أسبوعين وتمكنت من الحصول على مياه الشرب واتباع نظام غذائي غني بالكوليسترول، ثم قسمت إلى خمسة مجاميع رئيسية، إضافة إلى مجموعة سادسة عدت مجموعة سيطرة سالبة سمح لها بتناول غذاء خالي من الكوليسترول طيلة فترة التجربة وجميعها كانت في أقفاص كبيرة مجهزة بمعالف خاصة.

Animal grouping

1-1-2-2 تقسيم حيوانات التجربة

قسمت الحيوانات عشوائياً إلى ستة مجاميع ووضعت في أقفاص من الألمنيوم بأبعاد (50×40×50 cm) للطول والعرض والارتفاع على التوالي وبشكل منفرد (قفص واحد لكل مجموعة). عدت مجموعة واحدة من المجاميع الستة بوصفها مجموعة قياسية (سيطرة سالبة) Control group، ومجموعة معاملة بغذاء عالي الكوليسترول بدون علاج (سيطرة موجبة) بينما عدت المجاميع الأربعة الأخرى من الحيوانات بوصفها مجموعة معاملة تجريبية Experimental treated group عوملت بمادة جسيمات الفضة النانوية AgNPs كل مجموعة من المجاميع الثلاثة للحيوانات عوملت بتركيز معين من جسيمات الفضة النانوية (AgNPs). أما المجموعة الأخيرة فهي أيضاً مجموعة معاملة تجريبياً بمستخلص أوراق نبات المورينغا شكل (1-2).

تم تحضير محلول جسيمات الفضة AgNPs ومستخلص اوراق نبات المورينغا مباشرة قبل عملية تجريع الحيوانات .

تم تقسيم الحيوانات كان كالآتي :-

اولاً : مجاميع السيطرة : -

1. مجموعة السيطرة السالبة : في هذه المجموعة استمر الحيوان بتناول نظام غذائي عادي (غير معاملة بمادة الكوليسترول) طيلة مدة التجربة .

2. مجموعة السيطرة الموجبة : في هذه المجموعة تم تغذية الحيوانات بنظام غذائي عالي الكوليسترول غني بمادة الكوليسترول باودر وبنسبة 2.5% طيلة مدة التجربة .

ثانياً : مجاميع المعاملة :-

في هذه المجاميع تم تغذية الحيوانات بنظام غذائي عالي الكوليسترول غني بمادة الكوليسترول باودر وبنسبة 2.5% لمدة ثلاثة أشهر ومن ثم تم تجريعها بتركيز مختلفة من جسيمات الفضة النانوية ومستخلص اوراق نبات المورينغا مع الاستمرار بالنظام الغذائي الغني بالكوليسترول :

3. مجموعة (A) تم تجريع كل ارنب في هذه المجموعة بمادة جسيمات الفضة النانوية بنسبة 5 ملغم / لكل كيلو غرام من وزن الجسم لمدة (21) يوماً .

4. مجموعة (B) تم تجريع كل ارنب في هذه المجموعة بمادة جسيمات الفضة النانوية بنسبة 10 ملغم / لكل كيلو غرام من وزن الجسم لمدة (21) يوماً .

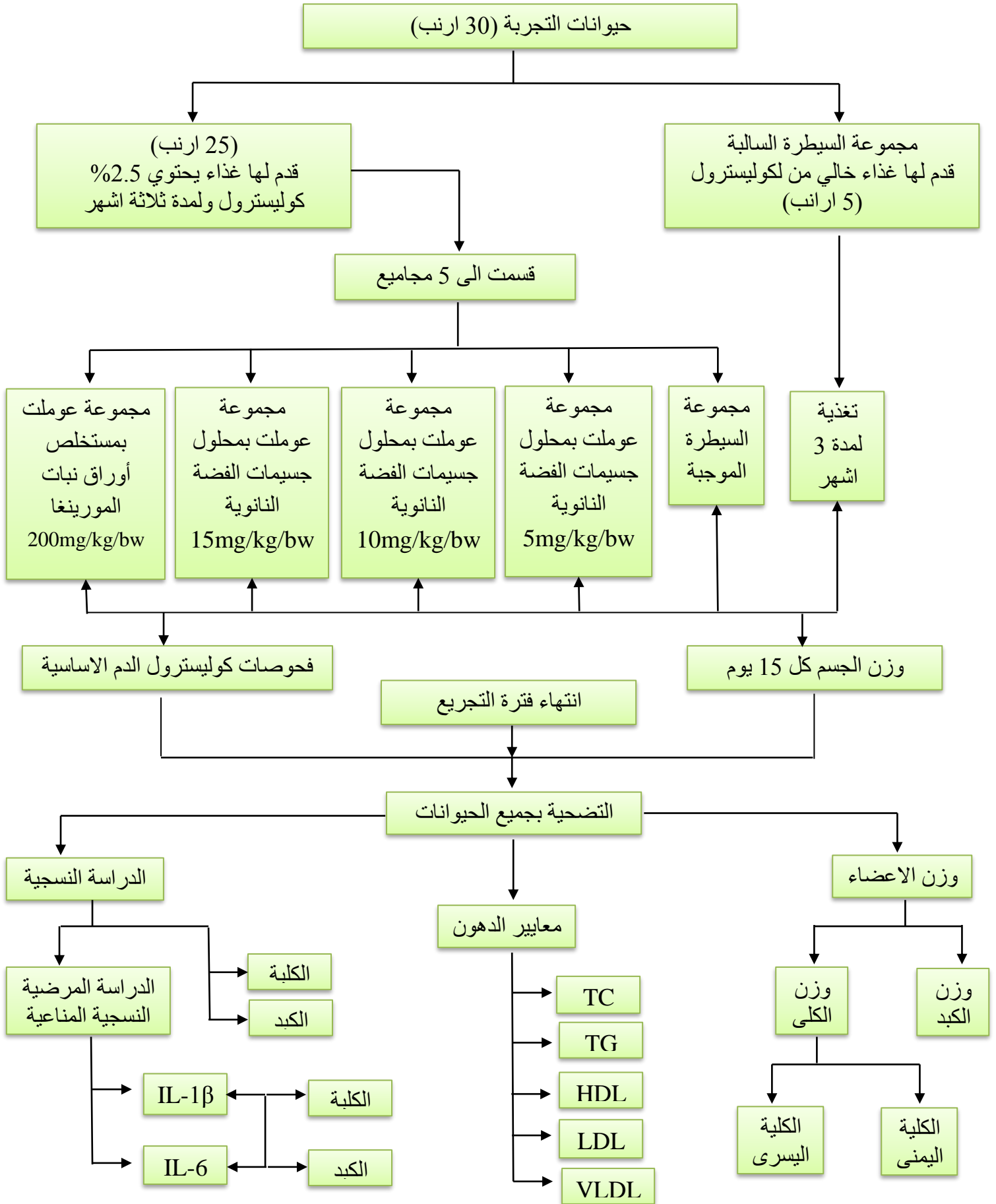
5. مجموعة (C) تم تجريع كل ارنب في هذه المجموعة بمادة جسيمات الفضة النانوية بنسبة 15 ملغم / لكل كيلو غرام من وزن الجسم لمدة (21) يوماً .

6. مجموعة المورينغا (M): تم تجريع كل ارنب في هذه المجموعة من مستخلص نبات المورينغا بـ 200 ملغم / لكل كيلو غرام من وزن الجسم لمدة (21) يوماً .

2-1-2-2 وزن حيوانات التجربة Weights of experiment animals

تم استخدام ميزان اعتيادي لغرض وزن الحيوانات فضلاً عن استخدام حاوية بلاستيك اثناء الوزن ، ووزنت حيوانات التجربة قبل البدء بالتجربة وتم الاستمرار بوزن الحيوانات كل 15 يوماً طيلة مدة التجربة ، و بعد الانتهاء من مدة التجريع ولمدة ثلاثة أسابيع تم وزن الحيوانات قبل التشريح ووزن الأعضاء بعد استئصالها من الحيوانات .

الشكل (2 - 1) مخطط التجربة



Preparation

2-2-2 التحضيرات

1-2-2-2 تحضير العليقة الحاوية على مادة الكوليسترول

Preparing the cholesterol-containing feed

تم استخدام علف الدواجن (البلت) المرحلة الثانية من معمل الواحة في محافظة كربلاء المقدسة لصنع عليقة الكوليسترول . حيث تم طحن البلت بطاحونة كهربائية ومن ثم تم خلط مسحوق الكوليسترول مع مسحوق العلف وتم أيضاً إضافة مادة الكوليك اسيد الى الخليط النهائي بالنسب الآتية :

97.5 غرام من مسحوق البلت + 2.5 غم من الكوليسترول

1 غم من مسحوق الكوليك اسيد لكل 1 كيلو غرام من خليط البلت والكوليسترول

لاحقاً تم عجن المكونات بصورة جيدة والاستمرار في العجن لضمان توزيع الكوليسترول و الكوليك اسيد في كل مكونات العجينة وللحصول على عجينة متجانسة . ثم تمت إعادة تشكيل العجينة بواسطة ماكينة خاصة ، واخيراً تم تجفيف العليقة بالفرن الكهربائي (Al-Moraie et al., 2013)

2-2-2-2 تحضير جسيمات الفضة النانوية

Preparation of silver nanoparticles

تم تحضير ثلاثة تراكيز من محلول جسيمات الفضة النانوية (5 % ، و 10 % و 15 %) حيث تمت اذابة 15 ملغرام من مسحوق الفضة النانوي في 100 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 15% من المحلول وكذلك بالنسبة للتركيز 10 % والـ 5% تمت اذابة 10 ملغم و 5 ملغم من مسحوق الفضة النانوي على التوالي في 100 مل من الماء المقطر. (AL-Waealy & Al-Dujaili , 2018)

3-2-2-2 تحضير المستخلص الكحولي لاوراق نبات المورينغا

Preparation of alcoholic extract of Moringa leaves

تم سحق وطحن اوراق المورينغا الجافة وتنقيتها من الشوائب بشكل جيد ثم ملئ Thimble من السليلوز بـ 50 غم من أوراق المورينغا المطحونة بشكل جيد ووضعها في جهاز السوكسليت

Soxhlet extractor , حيث استخدم كحول الايثيل المطلق في استخلاص أوراق المورينغا عن طريق تسخين الكحول بواسطة جهاز تسخين كهربائي , وبعد 3 – 4 ساعات من تشغيل الجهاز تم جمع المستخلص ، المستخلص حاوي على كحول الايثيل، ثم وضع المستخلص في الحمام المائي وتثبيت درجة الحرارة على 78 درجة مئوية للتخلص من الكحول . اخيراً تم الحصول على الراسب من المستخلص وكان الوزن يتراوح بين 3-4 غم . وزن 200 ملغم من المستخلص واذابته في الماء المقطر للحصول على محلول لاستخدامه في عملية التجريع لاحقاً . (Ghasi et al.,2000)

4-2-2-2 تحضير محلول Harris's haematoxylin:

تم التخضير بإذابة 1 غم من الهيماتوكسيلين في 10 مل من الكحول الإيثيلي . 20 غم من شب البوتاسيوم مذاب في 200 مل من الماء المقطر ويغلى . ثم يضاف الهيماتوكسيلين ويغلي المحلول لمدة نصف دقيقة. تمت إضافة 0.5 غرام من أكسيد الزئبق mercuric oxide . يبرد المحلول بسرعة ويضاف بضع قطرات من حمض الأسيتيك acetic ؛ إنه اختياري ولكن إدراجه يعطي تصبيغاً أكثر دقة وانتقائية للنواة . (Bancroft , 2013)

5-2-2-2 تحضير محلول Eosin:

تم تحضيره بخلط 1 غم من Eosin في 99 مل من الإيثانول. ثم يضاف القليل من حمض الأسيتيك acetic (0.5 مل إلى 1000 مل من البقعة) لجعل التصبيغ أكثر وضوحاً . (Bancroft , 2013)

Biochemical assays

3-2-2 الفحوصات الكيموحيوية

تم قياس نسبة الكوليسترول الكلي والدهون في الدم (TC ، TG ، HDL ، LDL ، VLDL) لتحديد القيم الأساسية والتحقق من استحداث فرط الكوليسترول عبر مدة الدراسة ، تم فصل المصل بالطرد المركزي في أجهزة الطرد المركزي الدقيقة عند 4000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق.

1-3-2-2 قياس مستوى الكوليسترول الكلي في الدم :

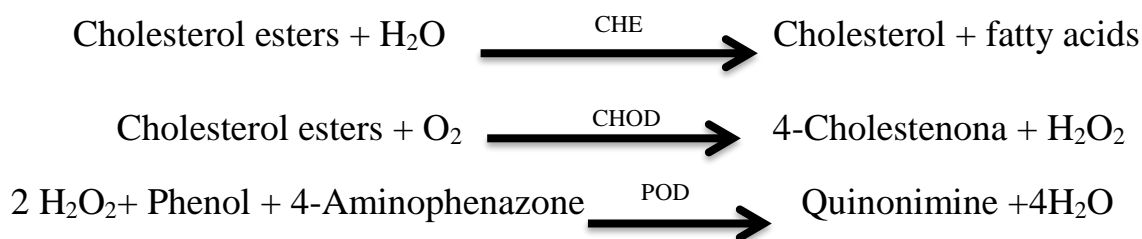
Measurement of serum cholesterol (TC)

1- مكونات الكاشف : Reagent composition

R 1 Buffer	PIPES pH 6,9	90 mmol/L
	Phenol	26 mmol/L
R 2 Enzymes	Cholesterol esterase (CHE)	300 U/L
	Cholesterol oxidase (CHOD)	300 U/L
	Peroxidase (POD)	1250 U/L
	4 – Aminophenazone (4-AP)	0,4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Cholesterol aqueous primary standard 200 mg/dL. Contains Triton X-114 10-15%.	

2- مبدأ العمل : Principle of the method

ينتج الكوليسترول الموجود في العينة مركبًا ملونًا ، وفقًا للتفاعل التالي:



كثافة اللون المتكون تتناسب مع تركيز الكوليسترول في العينة (Allain *et al.*, 1974).

3- طريقة العمل : Procedure

أ. ظروف الفحص: Assay conditions

- الطول الموجي: 505 نانومتر (500-550)
- الكوفيت Cuvette: مسار ضوء 1 سم
- درجة الحرارة: 37 درجة مئوية / 15-25 درجة مئوية

ب. ضبط الجهاز إلى الصفر بالماء المقطر.

ج. الماصة في الكوفيت :

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1,0	1,0	1,0
Standard (μL)	--	10	--
Sample (μL)	--	--	10

د. خلط واحتضان لمدة 5 دقائق. عند 37 درجة مئوية أو 10 دقائق. في درجة حرارة الغرفة.

هـ. تقرأ الامتصاصية (A) للعينات والمعيار مقابل الفراغ. اللون مستقر لمدة 60 دقيقة على الأقل.

4- الحسابات : Calculations

$$\frac{(A)Sample-(A)Blank}{(A)Standard-(A)Blank} \times 200 \text{ (Standard conc.)} = \text{mg/dL Cholesterol in the sample}$$

$$\text{Conversion factor : mg / dL} \times 0.0258 = \text{mmol / L}$$

تم تقدير مستوى الكوليسترول بطريقة (Allain *et al.*, 1974)

2-2-3-2 قياس مستوى الكليسيريدات الثلاثية في الدم :

Measurement of serum triglycerides (TG)

1- مكونات الكاشف : Reagent composition

R 1 Buffer	GOOD pH 7.5	50 mmol/L
	p-Chlorophenol	2 mmol/L
R 2 Enzymes	Lipoprotein lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycerolkinase (GK)	500 U/L
	Glycerol-3-oxidasa (GPO)	2500 U/L
	Peroxidase (POD)	440 U/L
	4 – Aminophenazone (4-AP)	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol/L
Triglycerides Cal	Triglycerides aqueous primary standard 200 mg/dL	

2- مبدأ العمل : Principle of the method

ينتج الكليسيريدات الثلاثية الموجود في العينة مركبًا ملونًا ، وفقًا للتفاعل التالي :



تناسب شدة اللون المتكون مع مستوى الكليسيريدات الثلاثية في العينة (Fassati & Principe 1982).

3- طريقة العمل : Procedure

أ. ظروف الفحص: Assay conditions

▪ الطول الموجي: 505 نانومتر (490-550)

▪ الكوفيت Cuvette: مسار ضوء 1 سم

▪ درجة الحرارة: 37 درجة مئوية / 15-25 درجة مئوية

ب. ضبط الجهاز إلى الصفر بالماء المقطر.

ج. الماصة في الكوفيت :

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1,0	1,0	1,0
Standard (µL)	--	10	--
Sample (µL)	--	--	10

د. خلط واحتضان لمدة 5 دقائق. عند 37 درجة مئوية أو 10 دقائق. في درجة حرارة الغرفة.

هـ. تقرأ الامتصاصية (A) للعينات والمعيار مقابل الفراغ. اللون مستقر لمدة 30 دقيقة

على الأقل.

4- الحسابات : Calculations

$$\frac{(A)Sample - (A)Blank}{(A)Standard - (A)Blank} \times 200 (\text{Standard conc.}) = \text{mg/dL T.G in the sample}$$

$$\text{Conversion factor : mg / dL} \times 0.0258 = \text{mmol / L}$$

2-2-3-3 قياس مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة HDL في الدم :

Measurement of serum high density lipoprotein-cholesterol (HDL)

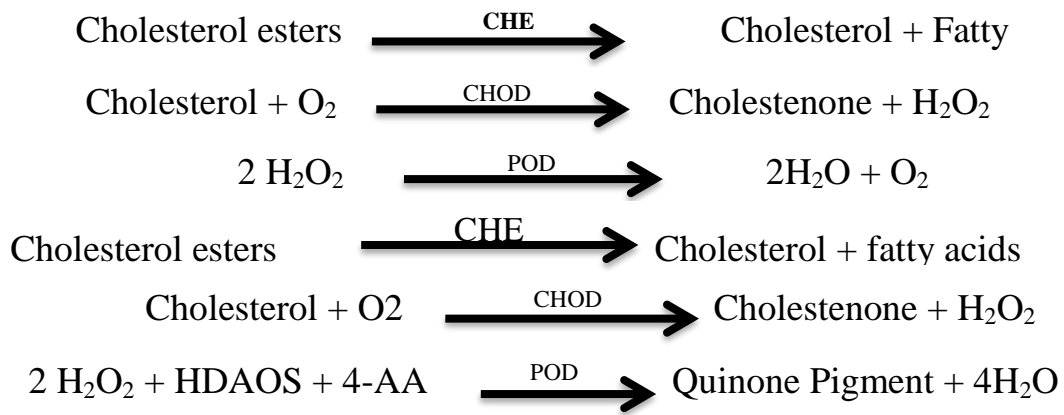
1- مكونات الكاشف : Reagent composition

R1	-N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2 aminoethanesulphonic acid pH 6,6	100 mM
	-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5 dimethoxyaniline (HDAOS)	0,7 mM
	Cholesterol Esterase	≥ 800 U/L
	Cholesterol oxidase	≥ 500 U/L

	Catalase	≥ 300 U/L
	Ascorbic oxidase	≥ 3000 U/L
R2	-N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2 aminoethanesulphonic acid pH 7,0	1,1 mmol/L
	4 – Aminoantipyrine (4-AA)	100 mM
	Peroxidase	≥ 3500 U/L

2- مبدأ العمل : Principle of the method

يتم اجراء الفحص على خطوتين :



كثافة اللون المتكون تتناسب مع تركيز HDL-C في العينة.

(Lopes-Virella *et al.* , تم التقدير بطريقة , HDL في العينة. 1977)

3- طريقة العمل : Procedure

أ. ظروف الفحص: Assay conditions

- الطول الموجي: 600 - 700 نانومتر
- الكوفيت Cuvette: مسار ضوء 1 سم

ب. درجة الحرارة: 37 درجة مئوية

ج. ضبط الجهاز إلى الصفر بالماء المقطر.

د. الماصة في الكوفيت :

	Blank	Standard	Sample
R1 (μL)	300	300	300

standard (μL)	--	3	--
Sample (μL)	--	--	3

- ه. خلط واحتضان لمدة 5 دقائق. عند 37 درجة مئوية .
 و. تقرأ الامتصاصية (A1) للعينات والمحلل القياسي .
 ز. اضافة :

R2	Blank	Standard	Sample
	100	100	100

- ح. امزج واحتضان لمدة 5 دقائق. عند 37 درجة مئوية.
 ط. تقرأ الامتصاصية (A2) للعينات والمحلل القياسي مقابل الفراغ.
 ي. احسب زيادة الامتصاصية $\Delta A = A2 - A1$.

4- الحسابات : Calculations

يتم حساب مستوى الكوليسترول HDL في العينة باستخدام الصيغة العامة الآتية :

$$\frac{\Delta A \text{ Sample}}{\Delta A \text{ Standard}} \times \text{Standard conc.} = \text{mg/dL of HDL in the sample}$$

$$\text{Conversion factor: mg/dL} \times 0.0259 = \text{mmol/L}$$

4-3-2-2 قياس نسبة البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL و البروتين الدهني منخفض الكثافة جداً VLDL في الدم :

Measurement of serum low density lipoprotein-Cholesterol (LDL-C) and very low density lipoprotein (VLDL):

تم حساب مستويات LDL و VLDL من معادلة فريدوال د Friedewald :
 (Friedewald *et al.*, 1972)

$$\text{LDL -C} = \text{Total cholesterol (TC)} - (\text{HDL-C} + \text{VLDL-C})$$

$$\text{LDL} = \text{TC} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{VLDL-C} = \text{Triglycerides} / 5, \text{VLDL} = \text{TG} / 5$$

4-2-2 عينات الدم

Blood sampling

تم اخذ عينات الدم في بداية كل مرحلة من مراحل التجربة اذ تم سحب 1 مل من الوريد الحافي للاذن للأرنب Marginal vien of ear قبل البدء بالتغذية بالغذاء عالي الكوليسترول وقبل البدء بالتجريب بتراكيز مختلفة من جسيمات الفضة النانوية ومستخلص اوراق نبات المورينغا وكذلك عند انتهاء فترة التجريب والتضحية بالحيوانات .

ووضعت العينات في انابيب جل لفصل المصل Serum separation gel tube وأجريت فحوصات صورة الدهون والتي شملت الكوليسترول الكلي ، والكليسيريدات الثلاثية ، البروتين الدهنية منخفضة الكثافة جداً VLDL ، البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL ، البروتين الدهني عالي الكثافة HDL .

5-2-2 تشريح الحيوانات

Dissection of animal

بعد انتهاء فترة التجربة تم تشريح الحيوانات بعد صيام الحيوانات لمدة 24 ساعة وسمح لها بشرب الماء ، إذ تم تخدير الحيوانات باستخدام الكلوروفورم Chloroform . وتم سحب (10 مل) من الدم مباشرة بوساطة طعنة القلب Cardiac puncture للحصول على أكبر كمية ممكنة من الدم. ووضعت عينات الدم بداخل أنبوب جل لفصل المصل ، وتركت لمدة لا تقل عن نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة . ثم نقلت الأنابيب الى جهاز النبذ المركزي الخاص بأنابيب الجل لفصل المصل ، ونبذت بسرعة 4000 دورة / دقيقة ، ولمدة 10 دقائق. ثم فصل المصل باستخدام ماصة دقيقة Micropipettes ووضعت في انابيب ايندروف Eppendorf tubes وارسلت الى المختبر لأجراء فحوصات صورة الدهون بينما حفظ بعضها بدرجة حرارة -20 درجة مئوية للاستخدام لاحقاً.

بعد الحصول على عينات الدم تم استئصال (الكبد والكلية) وذلك بعمل شق طولي بطني باستخدام العدة الخاصة بالتشريح ، وقيست أوزان الأعضاء (الكلية اليمنى ، الكلية اليسرى والكبد) باستخدام ميزان حساس ثم نقلت الى علب حفظ العينات تحتوي على الفورمالين 10% لغرض حفظها وعمل المقاطع النسجية.

1-5-2-2 تحضير المقاطع النسجية

Preparation of histological sections

تم تحضير المقاطع النسجية و حسب طريقة (Suvarna *et al.*, 2018) كما يأتي:

تم اخذ نماذج الكبد والكلى المثبتة بـ Formaldehyde solution وتمت إزالة المثبت من النماذج عبر غسلها بماء الحنفية لعدة مرات ولمدة نصف ساعة ثم تم حفظ الأعضاء بالكحول الايثيلي بتركيز 50 % لحين اجراء العمليات الخاصة بتحضير المقاطع النسجية وحسب الخطوات الآتية :

1. الإنكاز Dehydration :

تم نقل العينات بعد غسلها بالماء الى سلسلة من التراكيز التصاعدية للكحول الايثيلي وكما يلي:

- أ. كحول ايثيلي بتركيز 70% لمدة ساعتين.
- ب. كحول ايثيلي بتركيز 80% لمدة ساعتين .
- ج. كحول ايثيلي بتركيز 90% لمدة ساعتين .
- د. كحول ايثيلي بتركيز 95% لمدة ساعتين.
- هـ. كحول ايثيلي بتركيز 100% لمدة ساعتين.
- و. كحول ايثيلي بتركيز 100% لمدة ساعتين.

والغرض من هذه العملية هو سحب الماء من داخل العينة .

2. الترويق Clearing :

وضعت العينات في الزايلين Xylene لمدة ساعة واحدة لغرض ترويقها وجعلها شفافة وسهلة الارتشاح مع الشمع .

3. الارتشاح Infiltration :

بعد الإنتهاء من الترويق نقلت العينات الى قناني حاوية على شمع البارافين Paraffin wax ذي درجة انصهار 55 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة في فرن كهربائي درجة حرارته 59 – 60 درجة مئوية وذلك لإبقاء الشمع منصهراً، ولضمان تشريب العينات بشكل كامل، بعدها نقلت الى قناني أخرى حاوية أيضاً على شمع البارافين المنصهر داخل الفرن لمدة ساعة، إذ يدخل شمع البارافين بين خلايا النسيج لإكسابه التقوية للعملية اللاحقة، وهي الطمر.

4. الطمر Embedding:

تم بهذه الخطوة تهيئة النسيج لعملية التقطيع، إذ تم طمر العينات بنوع الشمع المستعمل في عملية الارتشاح نفسه. إذ سكب الشمع المنصهر في قالب خاص، ثم نقلت العينات الى القالب Block لغرض تقطيعها الى مقاطع نسيجية رقيقة. وثبتت العينات بواسطة ابرة ساخنة Hot needle لمنع حدث فقاعات ويكون سطح القطع بشكل موازي لقاعدة القالب. وروعي بأنه عند سكب الشمع داخل القالب يسكب مرة واحدة بدون تردد لمنع تكون طبقتين من الشمع او تكون فقاعات هوائية داخل الشمع، بعد ذلك بُرد القالب بسرعة بواسطة الماء البارد.

5. التشذيب Trimming :

شدبت وجوه القالب الحاوي على العينة بشكل يتلاءم مع حجم العينة لغرض التحضير لعملية التقطيع .

6. التقطيع Sectioning:

تم تثبيت القالب في جهاز المشرّاح Microtome ، إذ قطعت العينات بسمك (5) مايكرومتر وعلى شكل شريط Ribbon من المقاطع المتسلسلة .

7. التحميل Mounting :

وتم تحضير شرائح زجاجية نظيفة وضعت عليها مادة لاصقة Mayers albumin، وقد حملت أشرطة المقاطع على هذه الشرائح بعد أن وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 56 درجة مئوية لغرض فرش النسيج ولمدة دقيقتين ، بعد ذلك تركت الشرائح لتجف على صفيحة ساخنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.

8. التصبغ Staining :

وضعت الشرائح الزجاجية في محلول التولوين Toluene لمدة نصف ساعة لإزالة شمع البارافين من العينات ، وقد مررت الشرائح في سلسلة تنازلية من الكحول الأثيلي وبتراكيز 70 % ، 80 % ، 90 % و 100 % ، لمدة 10 دقائق في كل تركيز لغرض استعادة الماء الى داخل النسيج Hydration. بعدها مررت في الماء المقطر لمدة 5 دقائق ثم وضعت في محلول صبغة الهيماتوكسلين Haematoxylin لمدة 5-10 دقائق بعد ذلك غطست بالماء المقطر أربع مرات ومن ثم بالكحول الحامضي مرتين. بعدها غسلت بماء الحنفية الجاري ولمدة 5 دقائق ووضعت في صبغة الأيوسين Eosin لمدة 15-30 ثانية ثم غطست بماء الحنفية 5 – 7 مرات ، مررت الشرائح بعد ذلك بسلسلة تصاعديّة من الكحول

الأثيلي وبتراكيز 70 % ، 80 % ، 90 % و 100 % ثم وضعت في محلول الزايلين لغرض الترويق.

2-2-6 فحص وتصوير المقاطع النسجية :

Examining and photoimaging of histological sections

فحصت المقاطع النسجية بواسطة المجهر الضوئي المركب Light microscope بقوى تكبير مختلفة , وكان المجهر مزود بكاميرا تصوير من نوع كانون Digital camera والموصولة بجهاز الكمبيوتر, تم التصوير في مختبر التقطيع النسجي الخاص بكلية التربية للعلوم الصرفة – قسم علوم الحياة

2-2-7 طريقة تصبغ IHC :

Protocol Immunohistochemical staining

طريقة التصبغ المناعي المستخدمة في الدراسة الحالية كانت على ثلاث مراحل من نظام تحديد البوليمر (Buchwalow & Böcker , 2010) وتتضمن الخطوات الآتية :

1. قطع 5 مايكرون من الانسجة المثبتة بالفورمالين والمطمورة بالشمع ووضعها على سلايد.
2. إزالة الشمع ويمكن تنفيذ ذلك عن طريق حضان المقاطع النسيجية في الفرن بدرجة حرارة 60 م° لمدة ساعة متبوعا بتراكيز من الزايلين متغيرة لمدة 5 دقائق لكل تركيز ثم يعاد تجفيف المقاطع عن طريق استخدام سلسلة متناقصة من كحول الايثانول (50% و 70 % و 100%) وايضاً لمدة 5 دقائق لكل تركيز .
3. تخضع المقاطع النسيجية للتقنية Heat epitope retrieval باستخدام محلول استرجاع مناسب ويحفظ بدرجة حرارة 95 م° لمدة 30 دقيقة في حمام مائي .
4. الغسل بـ 3 متغيرات من محلول بفر لغسل IHC كل 5 دقائق .
5. وضع السلايد في Polydetector peroxidase blocker لمدة 5 دقائق .
6. الغسل بمتغيرين من محلول بفر لغسل IHC لكل 5 دقائق .
7. تغطي الانسجة بـ Primary Antibody (p53) ويحضان لمدة 45 دقيقة .
8. الغسل بمتغيرين من محلول بفر لغسل IHC لكل 5 دقائق .
9. يغطي النسيج بـ Polydetector HRP label ويحضان لمدة 5 دقائق .
10. الغسل بمتغيرين من محلول بفر لغسل IHC لكل 5 دقائق .
11. يغطي النسيج بـ Polydetector HRP label ويحضان لمدة 5 دقائق .
12. الغسل بمتغيرين من محلول بفر لغسل IHC لكل 5 دقائق .

13. تحضير DAB عن طريق إضافة قطرة من Polydetector DAB chromogen لكل مول من Polydetector DAB buffer وتخلط جيداً .
14. يغطي النسيج بمحلول مخضر من DBA substrate – chromogen ويحضن لمدة 10 دقائق .
15. الغسل بثلاث متغيرات من محلول بفر لغسل IHC لكل 5 دقائق .
16. التصبيغ بـ Mayer's hematoxylin لمدة دقيقتان ومن ثم تجفف .
17. تغطية السلايد

2-2-6-1 تحضير المقاطع النسجية المناعية الكيميائية (IHC) :

Preparation of immunohistochemical histological sections (IHC)

1. تثبيت الأنسجة : Tissue fixation :

معظم البروتينات المثبتة كيميائياً اما تتشابك مع البروتينات او تقلل من قابلية ذوبان البروتين ، والتي يمكن أن تحجب المستضدات المستهدفة أثناء عملية التثبيت . لذلك، يجب تحسين طريقة التثبيت بشكل صحيح بناءً المستضد المستهدف و المراد تصبيغه . المثبت الأكثر شيوعاً هو الفورمالديهايد (الفورمالين). على الرغم من أن الفورمالديهايد هو المثبت الأكثر استخداماً ، يمكن أيضاً استخدام العديد من المثبتات الأخرى (مثل الأستون والميثانول). بشكل عام ، يعتمد استخدام هذه المثبتات البديلة على كيفية تفاعل المستضدات المستهدفة مع التثبيت في المقام الأول. (Ramos-Vara, 2011)

2. طمر الأنسجة : Tissue embedding :

عادةً ما يتم طمر عينات الأنسجة المثبتة بالفورمالين في شمع البارافين للحفاظ على شكلها الطبيعي وبنية الأنسجة أثناء التخزين طويل الأجل ولتسهيل التقطيع قبل عملية IHC.

يمكن تغليف العينات التي تكون حساسة للغاية للتثبيت الكيميائي أو المذيبات المستخدمة لإزالة البارافين في مادة دمج مبردة ثم تجميدها في النيتروجين السائل. يتم التقطيع الى شرائح رقيقة من عينات الأنسجة المجمدة على ناظم البرد cryostat (مشرح التجميد Freezing microtome) ، ثم نقلها إلى شرائح ، ومن ثم تجفيفها للحفاظ على شكلها . يشار إلى هذه المقاطع باسم التجميد Frozen أو المقاطع المجمدة Cryosections (Ramos-Vara, 2011) .

3. التقطيع والتركيب : Sectioning and mounting

شمع البارافين هو أكثر وسائط الطمر شيوعاً للتطبيقات النسجية الروتينية ، وتنتج مقاطع المثبتة في الفورمالين المطمورة في شمع البارافين نتائج مرضية للكشف عن معظم مستضدات الأنسجة باستخدام تقنيات استرجاع المستضد القياسية. ومع ذلك ، يتم تدمير بعض المستضدات أثناء التثبيت الروتيني والطرر في شمع البارافين - وفي هذه الحالة ، يصبح تقطيع الأنسجة المجمدة هو الطريقة المفضلة.

تشمل عيوب التقسيم المجمد ، على سبيل المثال لا الحصر ، هذه القيود:

أ. سوء التشكل Poor morphology .

ب. دقة منخفضة عند التكبيرات العالية.

ج. احتياجات التخزين الخاصة.

عادة ما يتم قطع الأنسجة المطمورة في شمع البارافين إلى أقسام رقيقة (4 إلى 5 ميكرومتر) مع جهاز المشراح (Microtome). يتم بعد ذلك تثبيت هذه المقاطع على شرائح زجاجية مطلية بمادة لاصقة منديل. يُضاف هذا اللاصق عادةً عن طريق شرائح زجاجية ومعالجة السطح باستخدام 3-أمينوبروبيل ترايثوكسيسيلان poly-L-lysine (APTS) 3-aminopropyltriethoxysilane أو بولي-إل-إيسين ، كلاهما يترك مجموعات أمينية على سطح الزجاج الذي تلتصق به الأنسجة. بعد التركيب ، تُجفف المقاطع في فرن أو في المايكرويف استعداداً لإزالة البارافين .

يتم قطع المقاطع المجمدة باستخدام ناظم البرد pre-cooled cryostat المبرد مسبقاً ويتم تثبيتها على شرائح زجاجية مغلقة باللاصق. يتم تجفيف هذه الأقسام طوال الليل في درجة حرارة الغرفة و يتم تثبيتها لاحقاً عن طريق الغمر في أسيتون مبرد مسبقاً (-20 درجة مئوية) أو بارافورمالدهيد Paraformaldehyde , أو فورمالديهايد / فورمالين في درجة حرارة الغرفة. يتم تجاوز خطوة التجفيف أحياناً اعتماداً على المستضدات المستهدفة والأنسجة المستخدمة.

إزالة البارافين الموجود في المقاطع المطمورة في شمع البارافين تماماً قبل التصبيغ IHC. (إذا لم يكتمل نزع البارافين ، فسيتم حجب المستضدات المستهدفة ولن تتمكن الأجسام المضادة من التفاعل معها). البارافين كاره للماء و يطرد المحاليل المائية التي تحتوي على كواشف تصبيغ IHC. يستخدم الزايلين Xylene (المذيب العضوي القابل للاشتعال والسام والمتطاير) بشكل تقليدي لإزالة البارافين المقاطع .

يولد تثبيت الفورمالديهايد جسور الميثيلين التي تشابك بروتينات في عينات الأنسجة. يمكن أن تخفي هذه الجسور إمكانية الوصول إلى المستضد و / أو Epitope وتمنع أو تثبط ارتباط الجسم المضاد. نتيجة لذلك ، تتطلب المقاطع النسجية معالجة مصممة

لكشف أو استرداد Epitope المستضد قبل التصبيغ. وهذا ما يسمى Epitope أو استرجاع المستضد. (Ramos-Vara, 2011)

4- استرجاع المستضد : Antigen retrieval

أ. يتم إجراء استرجاع Epitope / المستضد عن طريق تسخين أو غلي المقاطع منزوعة البارافين في محاليل منظمة مختلفة عند قيم pH مختلفة، وهو ما يسمى استرجاع Epitope الناتجة عن الحرارة.

ب. يمكن أيضاً استرجاع المستضدات عن طريق هضم مقاطع الأنسجة باستخدام إنزيم محلل للبروتين مثل البيبسين Pepsin أو التربسين Trypsin أو البروتيناز K Proteinase. من الضروري أيضاً الإشارة إلى أنه على الرغم من أن إزالة البارافين الشامل مطلوب دائماً قبل التصبيغ بـ IHC ، إلا أن استرجاع المستضد أو Epitope غير مطلوب. (Ramos-Vara, 2011)

5- تعطيل او حجز المواقع غير المتخصصة : Blocking nonspecific sites

على الرغم من أن الأجسام المضادة تُظهر شغفاً تفضيلياً وتقارباً مع Epitopes معينة ، فقد ترتبط الأجسام المضادة ارتباطاً (جزئي أو ضعيف) بشكل غير متخصص بمواقع على البروتينات غير المستضدية التي تحاكي مواقع الارتباط الصحيحة على المستضد المستهدف. في سياق اكتشاف المستضد بواسطة الجسم المضاد ، يتسبب الارتباط غير المحدد في تصبيغ الخلفية وعليه يمكن أن يغطي على تحديد المستضد المستهدف. لتقليل تصبيغ الخلفية في IHC ، قبل التلوين ، يتم تحضين العينات في محلول منظم مؤقت يحجب المواقع غير المحددة التي قد ترتبط بها الأجسام المضادة الأولية أو الثانوية. تشمل محاليل منظمة الحجب الشائعة نسبة مئوية من المصل الطبيعي ، والحليب الجاف الخالي من الدسم ، و ألبومين مصل البقر ، والجيلاتين ، وواحد أو أكثر من المواد الخافضة للتوتر السطحي اللطيفة للمساعدة في التبليل (Ramos-Vara, 2011) .

6- الكشف المناعي : Immunodetection

يعد اكتشاف المستضد المستهدف باستخدام الأجسام المضادة عملية متعددة الخطوات تتطلب التحسين على كل مستوى لتضخيم اكتشاف الإشارة. يتم تخفيف كل من الأجسام المضادة الأولية والثانوية في محلول منظم للمساعدة في استقرار الجسم المضاد ، وتعزيز انتشاره المنتظم والكامل في العينة ، وتثبيط الارتباط غير متخصص . بينما قد تعمل مادة مخففة واحدة مع جسم مضاد واحد ، قد لا تعمل المادة المخففة نفسها مع جسم مضاد آخر ، مما يدل على الحاجة إلى تحسين كل منها.

يعد شطف العينة بين تطبيقات الجسم المضاد أمرًا بالغ الأهمية لإزالة الأجسام المضادة غير المرتبطة وأيضا لإزالة الأجسام المضادة التي ترتبط ارتباطًا ضعيفًا بمواقع غير متخصص .

تم فصل طرق الكشف عن المستضد بواسطة الجسم المضاد إلى طرق مباشرة وغير مباشرة. تستعمل كلتا الطريقتين الأجسام المضادة لاكتشاف المستضد المستهدف ، ولكن اختيار أفضل طريقة للاستخدام يعتمد على مستوى التعبير عن مولد الضد المستهدف، وإمكانية الوصول إليه ، ونوع القراءة المطلوبة. تستخدم معظم الطرق غير المباشرة ألفة الارتباط المتأصلة في الستربتافيدين Streptavidin والبروتينات ذات الصلة للبيوتين Biotin لاكتشاف الجسم المضاد المعالج بالبيوتين المرتبط بالمستضد المستهدف. يتم بعد ذلك توطين الجسم المضاد المرتبط بمولد الضد عن طريق إضافة اتحاد Streptavidin المترافق بالإنزيم والذي يولد إشارة مضخمة عند إضافة مواد مناسبة. يتم الكشف عن مستضدات الهدف IHC مباشرة عبر وسائل الكروموجينيك Chromogenic أو الفلورسنت Fluorescent ، ونوع القراءة يعتمد على التصميم التجريبي يعتمد الاكتشاف الكروموجيني على الأجسام المضادة المرتبطة بالإنزيمات. تكون الإنزيمات المستخدمة هي Horseradish peroxidase (HRP) أو Alkaline phosphatase (AP) ، والتي ترتبط بالأجسام المضادة الأولية أو الثانوية. عندما يتم تحضينها باستخدام مواد أولية مناسبة، يؤدي نشاط الإنزيم إلى ترسيب راسب ملونة غير قابلة للذوبان في موقع توطين المستضد. (Ramos-Vara, 2011)

7- ختم العينة المصبغة : Sealing the stained sample

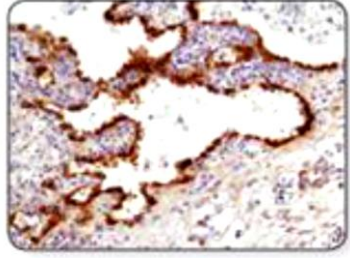
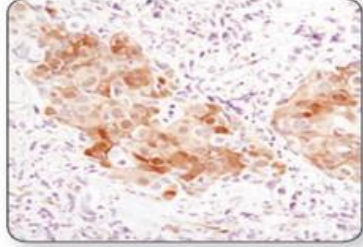
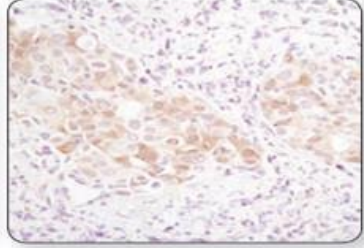
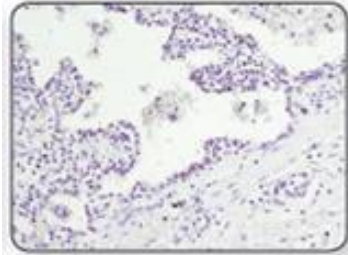
بعد اكتمال كل التصبيغ ، يجب حفظ العينة لأغراض الأرشفة ولمنع إذابة المنتج الأنزيمي أو التبييض الضوئي بالفلور. تختم العينة بتركيب غطاء مع تركيب مناسب يثبت مقاطع الأنسجة والتصبيغ. يجب أيضًا تضمين كاشف مضاد للتلاشي (تضائل) إذا تم استخدام كشف الفلورسنت وذلك لإطالة إثارة التألق. يمكن بعد ذلك إغلاق الغطاء باستخدام طلاء أظافر شفاف أو مادة مانعة للتسرب تجارية . (Ramos-Vara, 2011)

Reading result

8- تفسير النتائج

يمكن تفسير نتائج IHC بطريقتين الكمية والنوعية ، وتعد طرق القياس النوعية المباشرة الأكثر استعمالاً في قراءة مقاطع الانسجة المصبغة مناعياً . ويمكن قراءة النتائج بثلاث مستويات كما في الجدول (1 - 4) (Saleh-Alkarim & Alrefai 2015) .

جدول (1-4) تفسير نتائج المقاطع النسجية بثلاث مستويات

Score	مستوى التعبير	النموذج
+++	تعبير عالي للجسم المضاد High expression	
++	تعبير متوسط للجسم المضاد Medium expression	
+	تعبير منخفض للجسم المضاد Low expression	
-	لا يوجد تعبير للجسم المضاد Non- expression	

Statistical analysis

7-2-2 التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج احصائياً باستخدام برنامج Social Package Statistical System (SPSS) ، واختبرت الفروقات بين متوسطات القيم بطريقة تحليل التباين أحادي الاتجاه (One way ANOVA) ، وتم التعبير عن جميع البيانات على أنها متوسط \pm الخطأ القياسي (SE \pm Mean) (Kirkpatrick , 2015) ، وتم اعتبار $P < 0.05$ فرقاً معنوياً (Almundarij *et al.*, 2020) .



الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and

Discussion



Results and Discussion

3 - النتائج والمناقشة

Body weight change

3-1 التغيرات الوزنية

Change in body weight

3-1-1 التغير في وزن الجسم

ادت التغذية بالعليقة الحاوية على 2.5% كوليسترول الى حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في متوسط اوزان الحيوانات لمجموعة السيطرة الموجبة بالمقارنة مع متوسط اوزانها قبل التغذية اذ بلغ متوسط اوزانها قبل التغذية (190 ± 1480.33) غم بينما اصبح متوسط اوزانها بعد ثلاثة اشهر من التغذية (103.9 ± 1787.3) غم واستمر الارتفاع في متوسط اوزان الحيوانات مع الاستمرار بتغذية الحيوانات بالعليقة وعدم معاملتها بالعلاج وبلغ متوسط اوزانها في نهاية التجربة (147.6 ± 1881.3) غم ، الشكل (3 - 1) .

و لوحظ وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في اوزان الحيوانات بعد تغذية الحيوانات بالعليقة الحاوية على الكوليسترول قبل تجريعها بجسيمات الفضة 5 ملغم / كغم من وزن الجسم اذ بلغ متوسط اوزانها وقبل التغذية (112.09 ± 1580.00) غم ، بينما اصبح متوسط اوزانها بعد ثلاثة اشهر من التغذية بالعليقة الحاوية على 2.5% كوليسترول (99.42 ± 1872.25) غم ، ولوحظ انخفاض طفيف متوسط اوزانها بعد تجريع الحيوانات بمحلول AgNPs حيث بلغ (96.6 ± 1852.50) غم.

ولوحظ وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في اوزان الحيوانات بعد تغذية الحيوانات بالعليقة الحاوية على الكوليسترول قبل تجريعها بجسيمات الفضة 10% اذ بلغ متوسط اوزانها قبل التغذية (107.59 ± 1351.50) غم ، بينما كان متوسط اوزانها بعد ثلاثة اشهر من التغذية بالعليقة الحاوية على 2.5% كوليسترول (70.04 ± 1681.00) غم ، ولوحظ انخفاض متوسط اوزانها بعد تجريع الحيوانات بمحلول AgNPs اذ بلغ (100.70 ± 155.50) غم .

وبينت نتائج التحليل الاحصائي حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في متوسط اوزان الحيوانات بعد تغذية الحيوانات بالعليقة الحاوية على الكوليسترول قبل تجريعها بجسيمات الفضة 15% اذ بلغ متوسط اوزانها قبل التغذية (38.60 ± 1486.75) غم ، بينما اصبح متوسط اوزانها بعد ثلاثة اشهر من التغذية بالعليقة الحاوية على 2.5% كوليسترول (31.50 ± 1789.50) غم

ولوحظ عدم وجود فرق في متوسط اوزانها بعد تجريع الحيوانات بمحلول AgNPs حيث بلغ (50.50 ± 1781.50) غم .

ولوحظ وجود ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط اوزان الحيوانات بعد تغذية الحيوانات بالعليفة الحاوية على الكوليسترول قبل تجريعها بمستخلص نبات المورينغا اذ بلغ متوسط اوزانها قبل التجريع (60.445 ± 168.25) غم ، واصبح متوسط اوزانها بعد ثلاثة اشهر من التغذية بالعليفة الحاوية على 2.5% كوليسترول (13.31 ± 1870.00) غم ، ولوحظ عدم وجود فرق معنوي في متوسط اوزانها بعد تجريع الحيوانات بمستخلص نبات المورينغا حيث بلغ (1844.33 ± 13.38) غم .

جدول رقم (1-3) متوسط اوزان جسم الارانب قبل التغذية قبل التجريع وبعد التجريع

مجموعة التجريع	مجموعة التجريع	مجموعة التجريع	مجموعة التجريع	مجموعة السيطرة الموجبة	مجموعة السيطرة السالبة	المجاميع الفترات
بمستخلص أوراق نبات المورينغا 200 ملغم / كغم من وزن الجسم	بجسيمات الفضة النانوية 15 ملغم / كغم من وزن الجسم	بجسيمات الفضة النانوية 10 ملغم / كغم من وزن الجسم	بجسيمات الفضة النانوية 5 ملغم / كغم من وزن الجسم			
± 1683.25 b 60.44	± 1486.75 b 38.6	± 1351.5 c 107.59	± 1580 b 112.09	± 1480.33 c 190.6	± 1321.33 a 21.4	الوزن بداية التجربة
± 1870 a 13.31	± 1789.5 a 31.5	± 1681 a 70.04	± 1872.25 a 99.42	± 1787.3 b 103.9	± 1347.33 a 23.39	الوزن بعد ثلاثة اشهر
± 1844.33 a 13.38	± 1781.5 a 50.5	± 1557.5 b 100.7	± 1852.5 a 96.6	± 1881.3 a 147.6	± 1366.53 a 24.5	الوزن عند نهاية التجربة

القيم تمثل المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي (عدد حيوانات التجربة 5 في كل مجموعة) .

الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات.

مستوى المعنوية ($P < 0.05$) .

أوضحت نتائج هذه الدراسة وجود تغيرات وزنية، اذ لوحظ حدوث ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط اوزان الارانب بعد مرور 90 يوماً من التغذية بعليقة تحتوي على 2.5% من كوليسترول باودر النقي قياساً بمعدل اوزان مجموعة السيطرة كما في الجدول (1-3) وجاء هذا متوافقاً مع ما وجدته (Cheong et al ., 2010 ; Yu et al ., 2020)

في الدراسة الحالية كان هناك زيادة معنوية في الوزن في مجموعة السيطرة الموجبة التي تغذت على غذاء عالي الكوليسترول لمدة 90 يوماً مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة . تسبب النظام الغذائي المكمل بالكوليسترول في الارتفاع في مجموعة السيطرة الموجبة في زيادة معنوية في وزن الجسم النهائي وزيادة وزن الجسم مقارنة بالأرانب لمجموعة السيطرة السالبة.

اتفقت الدراسة الحالية مع دراسة اجراها (Sumbul & Ahmed (2012) اذ اشارت دراستهما الى أن النظام الغذائي عالي الكوليسترول يتسبب في زيادة كبيرة في زيادة وزن الجسم ، وأشارا إلى هذه الزيادة هي بسبب الزيادة العالية في الدهون المضمنة في الأعضاء الحشوية. واتفقت ايضاً مع دراسة اخرى من قبل (Parasuraman *et al* (2010) بينت أن النظام الغذائي عالي الكوليسترول أظهر زيادة كبيرة في وزن الجسم مقارنة بالحيوانات التي تتغذى على النظام الغذائي العادي ، وكذلك جاءت الدراسة الحالية متفقة مع دراستين اجريتا من قبل (Manish *et al.* (2011) و (Kolawole *et al.* (2012) ، اذ اشارت الدراستان الى أن الفئران التي تغذت على نظام غذائي غني بالدهون لمدة 90 يوماً نجحت في احداث السمنة مع زيادة ملحوظة في وزن الجسم والأعضاء الحشوية ، وتسبب النظام الغذائي الغني بالدهون في زيادة مستويات الكوليسترول لدى الأشخاص المعرضين للإصابة بفرط الكوليسترول، مما يؤدي إلى السمنة . ان الزيادة الوزنية في مجاميع الحيوانات ذات النظام الغذائي عالي الكوليسترول أعلى بكثير من حيوانات السيطرة مما يعكس تأثير النظام الغذائي الذي يحتوي على نسبة عالية من الكوليسترول (Sethupathy *et al.* , 2002) .

وجد أن الحيوانات التي تتغذى على الكوليسترول لفترة طويلة تسبب في زيادة وزن الجسم وقد تكون السمنة بسبب زيادة كتلة الدهون داخل البطن ، ويمكن أن تعزى هذه الزيادة إلى زيادة تناول الطعام وكذلك زيادة الدهون تحت الجلد ، والحشوية ، والبطن (مثل الأنسجة الدهنية البطنية ، والحيوية، والبربخية ، والأنسجة الدهنية البيضاء خلف الصفاق) . وكذلك لاحظت العديد من الدراسات التي أجريت في الجسم الحي أن اتباع نظام غذائي غني بالدهون وغني بالكوليسترول أو الأحماض الدهنية المشبعة أدى إلى زيادة كبيرة في الأنسجة الدهنية والحيوية مقارنة بالنظام الغذائي منخفض الدهون (Amin & Nagy,2009 ; Akbay *et al.* , 2004) . في دراسة اجريت من قبل (Takahashi & Ide, (2000 اثبتا عبرها ان تناول الكوليسترول على المدى الطويل في الفئران ادى إلى ارتفاع نسبة الكوليسترول في الدم وتسبب في تراكم الدهون في الأنسجة، من المحتمل أن تكون الزيادة في وزن جسم هذه الفئران ناتجة عن ترسب الدهون الزائدة التي لم تخضع للتمثيل الغذائي في الجسم .

ان العامل الأكبر الذي يؤدي إلى زيادة الوزن وتطور السمنة هو الإفراط في التغذية ، و يؤدي تناول الدهون الذي يتجاوز متطلبات التمثيل الغذائي إلى تخزين الدهون داخل الأنسجة الدهنية البيضاء ، الذي يعد موقع التخزين الأساسي للدهون داخل الجسم ، ان الاستهلاك المفرط للدهون الغذائية قد يؤدي إلى زيادة الوزن بسرعة نسبياً نظراً لأن الدهون الغذائية يتم ايضاً إلى أحماض دهنية حرة ، والتي تعد الركيزة الأساسية للدهون الثلاثية (TG) وعليه تكوين المزيد الدهون ، وبشكل عام ، يؤدي تناول المفرط للدهون الغذائية إلى ارتفاع مستوى الدهون في الدورة الدموية وعليه يزيد من تراكمه في الأنسجة الدهنية وكذلك ترسب الدهون في الكبد والكلى ، مما يساهم في السمنة (Botchlett & Wu, 2018 ; Chen *et al.*,2019) .

يمكن أن يعزى سبب ذلك إلى أن استهلاك الغذاء الغني بالدهون يؤدي الى السمنة وزيادة الوزن لأنه يسهل تطوير توازن الطاقة الايجابي مؤدية إلى زيادة تراكم الدهون الحشوية وحدوث السمنة وبشكل خاص في منطقة البطن (Amin & Nagy,2009)

و أظهرت دراسة اخرى وجود علاقة بين الإجهاد التأكسدي والسمنة ، والتي تكون بسبب التراكم المفرط للدهون ، والمستويات العالية من أنواع الأكسجين التفاعلية (Manna & Jain, 2015).

يوضح الجدول رقم (3 - 1) ان متوسط اوزان الارانب المجرعة بـ (10 ملغم / كغم) جسيمات الفضة النانوية تسببت انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في متوسط أوزان الارانب مقارنة مجموعة السيطرة السالبة . اتفقت هذه الدراسة مع (Sulaiman *et al.* , 2015) والتي بحثت تأثير الإعطاء الفموي لجسيمات الفضة والذهب النانوية على المعايير البيوكيميائية والتأثيرات النسجية للفئران المعاملة بغذاء عالي الكوليسترول ، وتوصلت هذه الدراسة الى حصول ارتفاع في اوزان الفئران بعد تناول الغذاء عالي الكوليسترول .

بينما لم يكن هنالك انخفاض ملحوظ في متوسط اوزان الحيوانات في مجاميع المعاملة (5 ملغم / كغم و 15 ملغم / كغم) واتفقت هذه النتائج مع (Attia , 2014) الذي اشار الى عدم حصول فروقات ذات دلالة احصائية في وزن الجسم للفئران المعاملة بتركيز مختلفة من AgNPs.

و أوضح (Garcia *et al.* , 2014) وجد أن الجرعة المنخفضة (1 ملغم / كغم / من وزن الجسم) من AgNPs التي تم حقنها في ذكور الارانب على مدى 12 يوماً ، لم تؤدي إلى أي تغييرات في أوزان الجسم .

ان التجريع اليومي لجسيمات الفضة النانوية بجرعات مختلفة للأرانب لمدة 21 يوما تسبب في انخفاض كبير في متوسط الأوزان مقارنة بمجموعة السيطرة . قد يكون هذا من الأعراض المبكرة للأحداث السامة الناتجة عن التعرض للجسيمات النانوية حيث ربطت الدراسات السابقة التغيرات في وزن الجسم بسمية الأدوية أو المواد الكيميائية (Adeyemi & Sulaiman , 2014 ; Orisakwe *et al* ., 2004) .

Organ weigh change

2-1-3 التغيير في وزن الاعضاء

يتضح من الجدول رقم (2-2) حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكبد في مجموعة السيطرة الموجبة مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ، و سجل متوسط اوزان الكلى ارتفاع معنوي ($P<0.05$) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة .

و أظهرت نتائج التحليل الإحصائي انخفاض معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن اكباد مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5) ملغم / كغم من وزن الجسم مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة بينما لوحظ وجود فرق معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكلى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .

و يبين الجدول رقم (2-2) أيضا حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكبد لمجموعة المعاملة بـ (10) ملغم / كغم من وزن الجسم جسيمات الفضة النانوية مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة ، بينما سجل حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكلى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .

ولوحظ حصول حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكبد لمجموعة المعاملة بـ (15) ملغم / كغم من وزن الجسم جسيمات الفضة النانوية مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة ، بينما سجل حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكلية اليسرى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة ، بينما سجل عدم حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكلية اليمنى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .

كما واطهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فرق معنوي في متوسط وزن اكباد مجموعة المعاملة بمستخلص نبات أوراق المورينغا 200 ملغم / كغم من وزن الجسم مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة ، ولوحظ حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في متوسط وزن الكلية اليسرى

بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة ، بينما لوحظ عدم وجود فرق معنوي ($P < 0.05$) في متوسط وزن الكلية اليمنى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة .

جدول رقم (2-3) الفرق في متوسط اوزان الأعضاء بالمقارنة مع مجموعة السيطرة

مجموعة التجريب بمستخلص أوراق نبات المورينغا 200 ملغم / كغم من وزن الجسم	مجموعة التجريب بجسيمات الفضة النانوية 15 ملغم / كغم من وزن الجسم	مجموعة التجريب بجسيمات الفضة النانوية 10 ملغم / كغم من وزن الجسم	مجموعة التجريب بجسيمات الفضة النانوية 5 ملغم / كغم من وزن الجسم	مجموعة السيطرة الموجبة	مجموعة السيطرة السالبة	المجاميع العضو
7.49 ± 54.68^a	0.11 ± 41.68^b	0.78 ± 42.85^b	3.90 ± 42.17^b	7.01 ± 53.78^a	6.42 ± 52.90^a	الكبد
0.18 ± 4.64^b	0.49 ± 4.96^b	0.73 ± 4.84^b	0.21 ± 4.96^b	2.06 ± 5.67^b	7.49 ± 4.68^b	الكلية اليسرى
0.28 ± 5.22^a	0.38 ± 5.09^a	0.69 ± 4.27^b	0.18 ± 4.88^b	0.26 ± 5.19^a	0.46 ± 4.78^b	الكلية اليمنى

القيم تمثل المتوسط الحسابي \pm الخطأ القياسي (عدد حيوانات التجربة 5 في كل مجموعة) .
الحروف المختلفة ضمن الصف الواحد تشير إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات.
مستوى ($P < 0.05$).

أدى اتباع نظام غذائي عالي الكوليسترول إلى ارتفاع مستوى الدهون في الكلى ، و كانت هذه النتائج متوافقة مع التي تم الاشارة اليها من قبل (Chtourou et al., 2016) الذي حدد أن اتباع نظام غذائي غني بالكوليسترول لمدة ثلاثة أشهر أدى إلى زيادة ملحوظة في متوسط وزن الكلى .

انخفضت أوزان أعضاء الارانب بعد المعالجة بجسيمات النانوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. وبالمثل ، انخفض متوسط وزن الكبد والكلية إلى متوسط وزن الجسم الارانب للحيوانات التي تم تجريعها بجسيمات الفضة النانوية لمدة 21 يوماً مقارنةً بمجموعة السيطرة .

وعند أعلى جرعة (15 ملغم / كغم) تسببت الجسيمات النانوية في تقليل متوسط أوزان أعضاء الكبد مقارنةً بحيوانات الموجبة ، و بطريقة مماثلة ، انخفض متوسط وزن الكلى مقارنةً بمجموعة السيطرة الموجبة . توافقت هذه النتائج مع (Sulaiman et al., 2015) (Kim et al., 2008 ;

2-3 التغيير في مستوى الدهون Change in levels of lipid profiles

1-2-3 التغيير في مستوى تركيز الكوليسترول الكلي Total cholesterol T.C.

في مصل الدم :

يتضح من الجدول (3 - 3) حصول فرق معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى الكوليسترول الكلي TC في مصل الارانب لمجموعة السيطرة الموجبة حيث ان متوسط مستوى TC قبل البدء بالتغذية (81.33 ± 4.37) ملغم/ديسي لتر ، و يلاحظ ايضاً الارتفاع في متوسط مستوى بعد التغذية (قبل التجريع) اذ بلغ (285.67 ± 3.93) ملغم/ديسي لتر وكذلك استمر الارتفاع اذ بلغ في نهاية التجربة (363.67 ± 76.74) ملغم/ديسي لتر.

و لوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى الكوليسترول الكلي T.C في مصل دم الارانب بعد التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5%) كوليسترول في المجموعات المعاملة بجسيمات الفضة (5 , 10 و 15 ملغم / كغم / وزن) الجسم وكذلك المجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) مقارنة بمستوياتها قبل التغذية. ويبين الجدول (3 - 3) حصول انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مستوى الكوليسترول الكلي بعد فترة التجريع لمجموعات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (5 و 10 ملغم / كغم من وزن الجسم) ، بينما لوحظ وجود انخفاض غير معنوي ($P > 0.05$) في مستوى الكوليسترول بعد فترة التجريع لمجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (15 ملغم / كغم من وزن الجسم) وكذلك مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

2-2-3 التغيير في مستوى تركيز الكليسيريدات الثلاثية الكلي T.G في مصل الدم

يتضح من الجدول (3 - 3) حصول فرق معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى الكليسيريدات الثلاثية الكلي في مصل الارانب لمجموعة السيطرة الموجبة حيث ان متوسط التركيز قبل البدء بالتغذية (114.33 ± 9.82) ملغم/ديسي لتر و يلاحظ ايضاً الارتفاع في متوسط مستوى بعد التغذية اذ بلغ (301.33 ± 6.83) ملغم/ديسي لتر وكذلك استمر الارتفاع اذ بلغ في نهاية التجربة (383.33 ± 73.83) ملغم/ديسي لتر .

لوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى الكليسيريدات الثلاثية الكلي T.G في مصل دم الارانب بعد مدة التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5%) الكوليسترول في المجموعات المعاملة بجسيمات الفضة (5 , 10 و 15 ملغم / كغم / وزن الجسم) وكذلك المجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

وبين الجدول (3 - 3) أيضا عدم وجود فرق معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى الكليسيريدات الثلاثية الكلي T.G في مصل دم الارانب بعد مدة التجريب للمجموعات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5, 10 و 15 ملغم / كغم / وزن الجسم) بينما لوحظ وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في المجموعة المعاملة بمستخلص المجموعات المعاملة أوراق نبات المورينغا.

3-2-3 التغير في مستوى تركيز البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL في مصل

الدم

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL في مصل الارانب لمجموعة السيطرة الموجبة بعد التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5%) الكوليسترول ، وسجلت مستويات HDL انخفاضا عند نهاية التجربة بينما لوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط تركيز البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL في مصل دم الارانب بعد التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5%) الكوليسترول في المجموعات المعاملة بجسيمات الفضة (5 و 10 و 15 ملغم / كغم / وزن الجسم) وكذلك المجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

و اوضحت نتائج الدراسة حصول انخفاض غير معنوي ($P > 0.05$) في مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة (HDL) لمجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (5 ملغم / كغم من وزن الجسم) .

بينما لوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) لمجموعة العاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 و 15 ملغم / كغم من وزن الجسم) وكذلك مجموعة المعاملة بمستخلص اوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم من وزن الجسم) لمدة 21 يوماً .

3-2-4 التغير في مستوى تركيز البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL في

مصل الدم

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL في مصل دم الارانب بعد التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5%) الكوليسترول لمجموعة السيطرة الموجبة اذ بلغ (41.00 ± 10.69) ملغم/ديسي لتر وبعد مدة التغذية بلغ (186.67 ± 8.253) ملغم/ديسي لتر و بلغ عند نهاية التجربة (265.67 ± 64.45) ملغم/ديسي لتر.

ولوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط تركيز البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL في مصل دم الارانب بعد مدة التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5%) الكوليسترول

في المجموعات المعاملة بجسيمات الفضة (5, 10 و 15 ملغم / كغم / وزن الجسم) وكذلك المجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

ويبين الجدول (3 - 3) أيضا وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في متوسط تركيز البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL في مصل دم الارانب قبل التجريع و بعد مدة التجريع للمجموعات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5, 10 و 15 ملغم / كغم / وزن الجسم) و مجموعة المعاملة بمستخلص المجموعات المعاملة أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

3-2-5 التغيير في مستوى تركيز البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة VLDL في

مصل الدم

بينت النتائج حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة VLDL في مصل الارانب لمجموعة (فرط الكوليسترول) مع الاستمرار بتناول الغذاء عالي الكوليسترول حتى انتهاء مدة التجربة جدول (3 - 3) .

أظهرت نتائج التحليل الاحصائي حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في متوسط مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة VLDL في مصل دم الارانب بعد مدة التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5%) الكوليسترول في المجموعات المعاملة بجسيمات الفضة (5, 10 و 15 ملغم / كغم / وزن الجسم) وكذلك المجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم / وزن الجسم) .

و اوضحت نتائج الدراسة عدم وجود فرق معنوي ($P > 0.05$) في مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً (VLDL) لمجاميع المعاملة بجسيمات الفضة النانوية AgNPs بتركيز (5 و 15 ملغم / كغم من وزن الجسم) لمدة 21 يوماً بينما لوحظ حصول انخفاض معنوي ($P < 0.05$) لمجموعة العاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم من وزن الجسم) و مجموعة العاملة بمستخلص اوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم من وزن الجسم) .

جدول رقم (3-3) الفرق في مستوى معايير الدهون في في مختلف مجاميع حيوانات التجربة قبل التغذية وقبل التجريع وبعد التجريع

المجموعات	مراحل التجربة	الكوليسترول الكلي T.C	الكليسيريدات الثلاثية T.G	البروتين الدهني عالي الكثافة HDL	البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL	البروتين الدهني منخفض الكثافة جداً VLDL
مجموعة السيطرة السالبة	بداية التجربة	^a 1.683 ± 62.00	^a 5.186 ± 95.75	^a 1.287 ± 19.70	^a 1.300 ± 25.30	^a 0.981 ± 17.45
	نهاية التجربة	^a 4.272 ± 52.34	^a 6.318 ± 77.01	^a 1.302 ± 11.67	^a 1.719 ± 21.27	^a 1.644 ± 14.40
مجموعة السيطرة الموجبة	بداية التجربة	^c 4.372 ± 81.33	^c 9.821 ± 114.33	^a 6.936 ± 17.67	^c 10.693 ± 41.00	^c 1.964 ± 22.87
	بعد ثلاثة اشهر	^b 3.930 ± 285.67	^b 6.839 ± 301.33	^a 5.774 ± 39.00	^b 8.253 ± 186.67	^b 1.368 ± 60.27
	نهاية التجربة	^a 76.74 ± 363.67	^a 73.838 ± 383.33	^c 3.319 ± 21.33	^a 64.452 ± 265.67	^a 14.768 ± 76.67
مجموعة التجريع بجسيمات الفضة النانوية 5 ملغم / كغم من وزن الجسم	بداية التجربة	^b 20.27 ± 87	^b 17.68 ± 113.75	^b 0.500 ± 15.50	^c 16.656 ± 48.50	^b 3.537 ± 22.75
	بعد ثلاثة اشهر	^a 17.76 ± 307.50	^a 20.267 ± 325.50	^a 10.476 ± 49.50	^a 7.599 ± 195.50	^a 4.053 ± 65.10
	نهاية التجربة	^a 22.87 ± 279.25	^a 28.551 ± 301.00	^a 11.394 ± 44.30	^b 6.343 ± 174.75	^a 5.710 ± 60.20

^c 2.024 ± 20.50	^c 12.016 ± 37.25	^c 2.869 ± 18.75	^b 10.12 ± 102.50	^c 13.53 ± 76.25	بداية التجربة	مجموعة التجريب بجسيمات الفضة النانوية 10 ملغم / كغم من وزن الجسم
^a 0.500 ± 63.30	^a 6.551 ± 193.50	^a 3.902 ± 48.25	^a 2.500 ± 316.50	^a 4.922 ± 304.75	بعد ثلاثة اشهر	
^b 0.486 ± 51.25	^b 6.738 ± 167.75	^b 5.379 ± 53.75	^a 2.428 ± 306.25	^b 3.065 ± 282.75	نهاية التجربة	
^b 3.200 ± 21.40	^c 14.00 ± 26.00	^b 2.500 ± 17.50	^b 16.00 ± 107.00	^b 8.2 ± 65.1	بداية التجربة	مجموعة التجريب بجسيمات الفضة النانوية 15 ملغم / كغم من وزن الجسم
^a 0.400 ± 59.00	^a 4.000 ± 172.00	^a 5.000 ± 46.00	^a 2.000 ± 295.00	^a 0.500 ± 276.50	بعد ثلاثة اشهر	
^a 2.200 ± 56.80	^b 8.000 ± 149.00	^a 6.300 ± 55.70	^a 11.00 ± 284.00	^a 0.500 ± 261.50	نهاية التجربة	
^c 2.904 ± 16.07	^c 8.452 ± 35.33	^b 2.333 ± 7.33	^c 14.518 ± 80.33	^b 11.14 ± 58.67	بداية التجربة	مجموعة التجريب بمستخلص أوراق نبات المورينغا 200 ملغم / كغم من وزن الجسم
^a 0.833 ± 62.60	^a 4.702 ± 187.33	^a 6.119 ± 46.67	^a 4.163 ± 313.00	^a 3.844 ± 296.33	بعد ثلاثة اشهر	
^b 0.467 ± 53.47	^b 4.726 ± 163.00	^a 5.312 ± 49.87	^b 2.333 ± 287.33	^a 4.055 ± 270.33	نهاية التجربة	

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي (عدد حيوانات التجربة 5 في كل مجموعة) .

الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات.

مستوى المعنوية (P<0.05).

أدى استحداث فرط الكوليسترول في الدم عن طريق التغذية بالعليقة الحاوية على (2.5٪ كوليسترول باودر) لمدة ثلاثة أشهر إلى العديد من التغييرات في مستويات الدهون (TC و TG و LDL و VLDL و HDL) في الدم و كما هو موضح في الدراسة الحالية أن الكوليسترول الغذائي يسبب زيادة في مستوى الكوليسترول في الدم . و كشفت الدراسة الحالية عن ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في كوليسترول الدم ، Triglyceride ، LDL ، HDL ، VLDL في ذكور الارانب التي كانت تتغذى على عليقة حاوية على 2.5% كوليسترول لمدة (90) يوماً مقارنة مع مستوى كوليسترول الدم في مجموعة السيطرة السالبة كما هو موضح في الجدول (3 - 3). هذه النتائج تتفق مع ما جاء به (Prasad , 2007 ; Nigris et al ., 2008 ; Jenner et al ., 2007).

و اتفقت نتائج الدراسة الحالية أيضاً مع ما جاء به (Rahman et al ., 2018) ، الذين وجدوا أن تناول نظام غذائي غني بالدهون أدى إلى زيادة كبيرة في مستويات الدهون في الدم .

وقد يعزى السبب في ارتفاع الكوليسترول في النظام الغذائي للخلل في تنظيم مستقبلات البروتين الدهني منخفض الكثافة LDL (Mustad et al ., 1997) . وان التوزيع النشط للدهون والتمثيل الغذائي مرتبط بشكل أساسي بتوزيع مستوى البروتينات الدهنية في الدم وبالتالي يؤدي الى مستويات مرتفعة للكوليسترول في الدم (Kishida et al ., 2002) .

وبينت دراسة ارتفاع مستوى HDL بعد تناول نظام غذائي عالي الكوليسترول وارجعت هذه الدراسات أن هذا الارتفاع يرجع إلى زيادة إنتاج HDL بشكل رئيسي في الكبد وبشكل جزئي في الأمعاء الدقيقة ، للتقليل من ارتفاع الكوليسترول ، اذ يُطلق على HDL اسم "الكوليسترول الجيد" ، ان المستويات المرتفعة من (HDL) تمثل ارتفاعاً في نقل الكوليسترول من الأنسجة الدهنية إلى الكبد حيث يتم تعديله (Lewis & Rader, 2005 ; Jiang et al ., 2006) . وفي الدراسة الحالية حصل انخفاض في مستوى HDL بشكل عكسي مع استمرار ارتفاع قيمة LDL بعد الإصابة بفرط الكوليسترول بينما يلاحظ ارتفاع طفيف بعد التجريع بجسيمات الفضة النانوية.

وقد يعزى السبب في انخفاض مستوى HDL في الدم وزيادة مستوى LDL و TG مع الاستمرار في فرط الكوليسترول في مصل الحيوانات التي تتناول نظام غذائي عالي الدهون الى نقص نشاط إنزيم Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) الذي يسهم في تكوين جزيئات HDL ، ونضج HDL ، وايضا المشاركة في أسترة الكوليسترول إلى إستر الكوليسترول Cholesteryl Ester (CE) ، وان زيادة نشاط بروتين نقل الكوليسترول استر Cholesteryl ester transfer protein (CETP) الذي يتم تصنيعه بواسطة بعض

أنسجة الجسم ، وبشكل رئيسي في الأنسجة الدهنية ، بالإضافة الى ان تناول نظام غذائي غني بالدهون يؤدي إلى تخزين الطاقة الزائدة على شكل دهون ثلاثية في خلايا الأنسجة الدهنية ، وعليه فان الوجبات الغذائية التي تحتوي على كمية عالية من الدهون تؤدي إلى زيادة نشاط وتصنيع وإفراز CETP (Salerno *et al.* , 2009) . يعمل CETP في المصل على نقل الكوليسترول استر من HDL إلى VLDL و LDL، مما يؤدي إلى انخفاض في مستويات HDL وزيادة LDL و TG (Mabuchi *et al.* , 2014) .

ان الدراسات الفسلجية لفرط الكوليسترول تمكن من قياس معايير فرط كيميائيات الدم حيث يؤدي الخلل في ايض الدهون إلى زيادة دهون الدم وفرط كيميائيات الدم الناجم عن خلل في نشاط لايبيل البروتين الدهني Lipoprotein lipase (LPL) . (Gotto Jr & Moon , 2010) . ويعد انخفاض نشاط LPL الذي يتسبب أيضا في زيادة تصنيع الـ VLDL بواسطة الكبد مما يؤدي في النهاية إلى فرط كوليسترول الدم ، وعلاوة على ذلك ، ان الانخفاض في نشاط LPL يقلل من ايض الكوليسترول في الكبد إلى الأحماض الصفراوية (Papadakis *et al.* , 2013).

قد يؤدي الخلل في انزيمات LPL و LCAT الى زيادة دهون الدم اذ تشارك هذه الانزيمات في عملية ايض البروتينات الدهنية و استرة الكوليسترول والتي تعتبر من المسارات الرئيسية في المحافظة على توازن الكوليسترول في الدم ، وعليه فان تناول غذاء عالي الدهون يؤدي الى تراكم كميات كبيرة من الكوليسترول في الدم قد يفوق قدرة الاليات الطبيعية على الحفاظ على توازن الكوليسترول ضمن المعدل الطبيعي (Harvey & Ferrier, 2011) .

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة، وجود انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مستوى كوليسترول الدم لذكور الارانب التي تغذت على نظام غذائي عالي الكوليسترول بعد تجريعها بجسيمات الفضة النانوية ، وتوافق هذا مع (Rigotti *et al.* , 2003) .

أشارت دراسة إلى أن الجسيمات النانوية الفضية تحسن مظهر الدهون وتعويض الطاقة والإجهاد التأكسدي ونسبة السكر في الدم (Pourkhalili *et al.* , 2011) . وكما أشار أيضاً إلى أن إعطاء جسيمات الفضة النانوية كان فعالاً في تقليل كمية الدهون الثلاثية في الدم لدى الفئران وتوافق أيضاً مع (Yildirimer *et al.* , 2011) . قد تترافق هذه التأثيرات مع الإجهاد التأكسدي الذي تسبب في أكسدة الدهون وتحرير الجذور الحرة في الجسم (Ahmadi & Branch, 2012) . أيضاً أظهرت نتائج (Yildirimer *et al.* , 2011) أن الفضة النانوية تؤثر على بيروكسيد الدهون

وهيكل أغشية الخلايا ، بحيث تتكسر الدهون الهيكلية للأغشية وهذا يؤدي إلى تغيرات في مستوى دهون البلازما وتوافق مع ما جاء به (Hosseini & Bahrami , 2013) .

في الدراسة الحالية حصل ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) بمستويات LDL في الدم بعد التغذية لمدة (90) يوماً بعليقة حاوية على 2.5 % كوليسترول بالمقارنة مع مجموعة السيطرة . و بعد تجريع الحيوانات بجسيمات الفضة النانوية لوحظ انخفاض في مستويات LDL في مجموعات التجريع وبنسب متفاوتة حسب المجموعة .

في الدراسة الحالية ، كان فرط الدهون ناتجاً عن اتباع نظام غذائي غني بالدهون، والذي يرتبط مع ارتفاع مستويات LDL في الدم . وقد يعزى ذلك الى تثبيط امتصاص LDL المعتمد على المستقبلات في الكبد (Sacks *et al.* , 2017) . تتأكسد الكميات الزائدة من LDL في الدم، وتحدث عندما تتفاعل جزيئات الكوليسترول LDL في الجسم مع الجذور الحرة [وهي الجزيئات غير المستقرة الناتجة عن التمثيل الغذائي الطبيعي] ، والتي تؤدي إلى تكوين LDL المؤكسد، ان عملية اكسدة LDL تقود إلى زيادة في الكوليسترول المؤسّر (Parthasarathy *et al.*,2010 ; DiPiro *et al.* , 2017).

Histopathological study

3-3 الدراسة النسجية

Histological changes in Liver

3-3-1- التغيرات في نسيج الكبد

كشف الفحص المجهرى لمقاطع الكبد عن تغيرات مختلفة بين مجاميع الدراسة مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة . تُظهر مقاطع الكبد لمجموعة السيطرة السالبة الفصيص الكبدي بشكل طبيعي والخلايا الكبدية مرتبة على شكل شعاعي وتبدو كحبال تمتد من الوريد المركزي Central vein . ولوحظ أيضاً القناة الصفراوية Bile duct والخلايا البطانية Endothelial cells و خلايا كوبفر Kupffer cells . تم تشخيص خلايا الكبد الطبيعية ذات النوى المستديرة المركزية والسيتوبلازم المتجانس والخلايا البطانية المسطحة حول الوريد المركزي في مجموعات السيطرة السالبة كما هو موضح في الشكل (1-3)

أظهرت التغيرات في مقاطع الكبد للأرانب في مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول) والتي تتغذى على نظام غذائي عالي الكوليسترول (2.5 % كوليسترول) ، ترسب قطرات دهنية ، تراكم الدهون مما يكون تتكس دهني حويصلي ذات احجام مختلفة (Macro Ballooning cell & Micro vesicular steatosis) بينما كانت الخلايا الكبدية تبدو منتفخة Ballooning cell و ذات انوية متموتة Pyknotic nuclei ، مع حصول ارتشاح للخلايا اللمفاوية

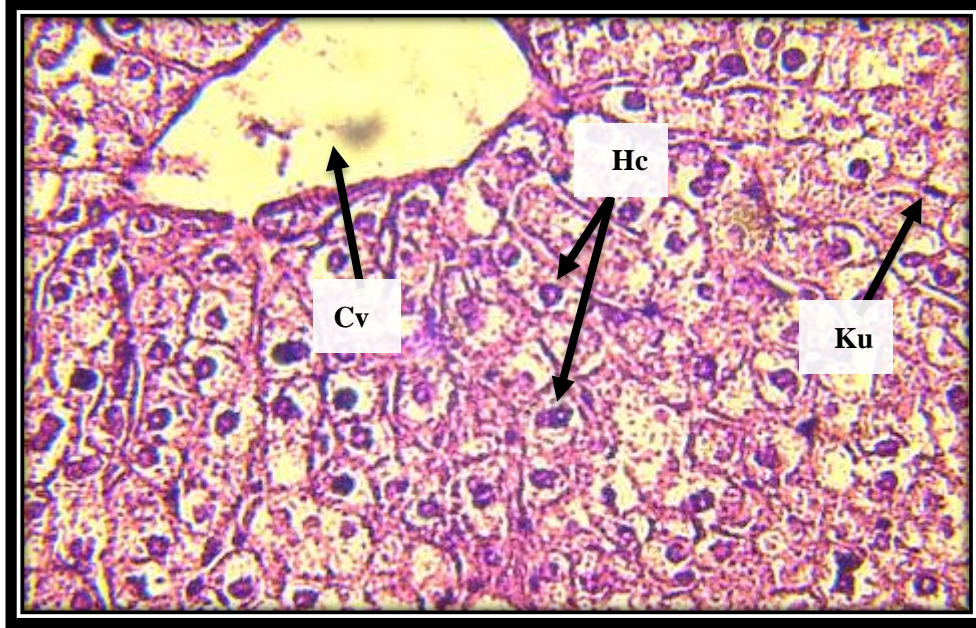
Lymphocytes Infiltration ، وتنخر Necrosis . كما أظهرت مقاطع الكبد تخريب المظهر الشعاعي المميز لانتظام الخلايا الكبدية حول الوريد المركزي في الفصيص الكبدي . وكانت هذه التغيرات أكثر وضوحاً في مقاطع كبد حيوانات السيطرة الموجبة والتي تستهلك نظام غذائي عالي الكوليسترول مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة ، الشكل (3-2).

أظهرت المقاطع النسجية لكبد الارانب الخاصة بمجموعة المعاملة بـ (5 ملغم / كغم وزن الجسم) جسيمات الفضة النانوية عودة انتظام الخلايا الكبدية بشكل شعاعي حول الوريد المركزي للفصيص الكبدي، مع وجود القطرات الدهنية الصغيرة والكبيرة موجودة ، و بعض الخلايا ذات الانوية المتموتة ، مع وجود تنخرو بعض الخلايا الكبدية المنتفخة الشكل (3-3)

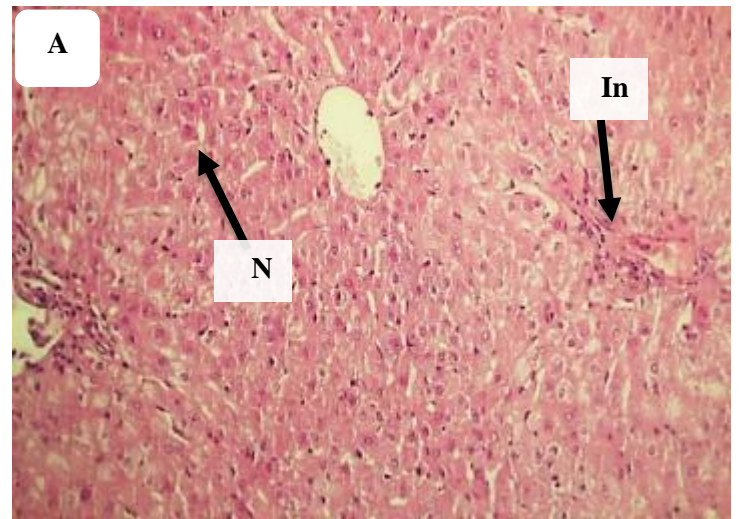
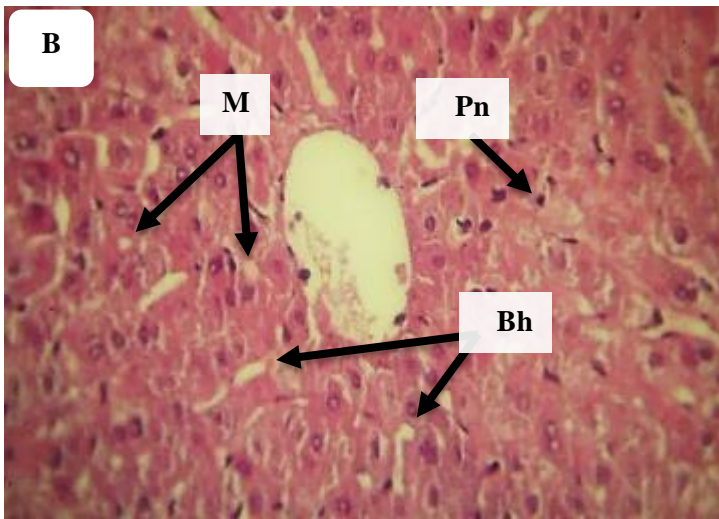
أظهرت المقاطع النسجية لكبد الارانب المعاملة بـ (10 ملغم / كغم وزن الجسم) جسيمات الفضة النانوية عودة المظهر الطبيعي للفصيص الكبدي ، الخلايا تبدو بشكل مرتب حول الوريد المركزي مع وجود اعداد قليلة من القطرات الدهنية المترسبة واعداد قليلة من الخلايا ذات الانوية المتموتة Pyknotic nuclei ، ويعد التركيز الافضل من جسيمات الفضة النانوية الذي ادى الى تحسن مظهر النسيج والظهور بشكله الطبيعي نسبياً مع وجود تأثيرات اقل بالمقارنة مع التراكيز الاخرى لجسيمات الفضة النانوية ، الشكل (3-4) .

المقاطع النسجية لكبد مجموعة الارانب المعاملة بـ (15 ملغم / كغم وزن الجسم) جسيمات الفضة النانوية عودة المظهر الشعاعي لمعظم الخلايا الكبدية وانتظامها بشكل شعاعي حول الوريد المركزي ، المظهر يبدو سليم مع وجود القليل من القطرات الدهنية وبعض الخلايا ذات الانوية المتموتة Pyknotic nuclei وعدم وجود نزف ، وجود نخر ، بعض الخلايا المنتفخة ، الشكل (3-5) .

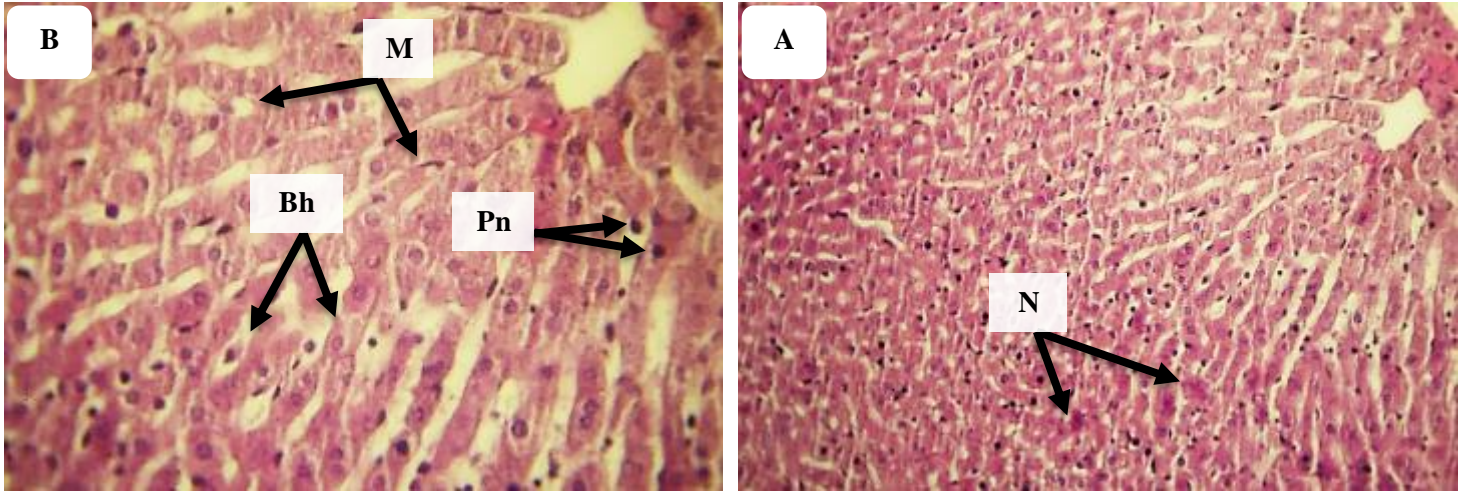
تُظهر مقاطع الكبد لمجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا عودة المظهر الشعاعي لمعظم الخلايا الكبدية وانتظامها بشكل شعاعي حول الوريد المركزي. كانت بعض الخلايا الكبدية تبدو منتفخة Ballooning cell و ذات انوية متموتة Pyknotic nuclei ، و لوحظ ارتشاح قليل للخلايا اللمفاوية Lymphocytes infiltration ، مع وجود القطرات الدهنية الصغيرة والكبيرة، الشكل (3-6)



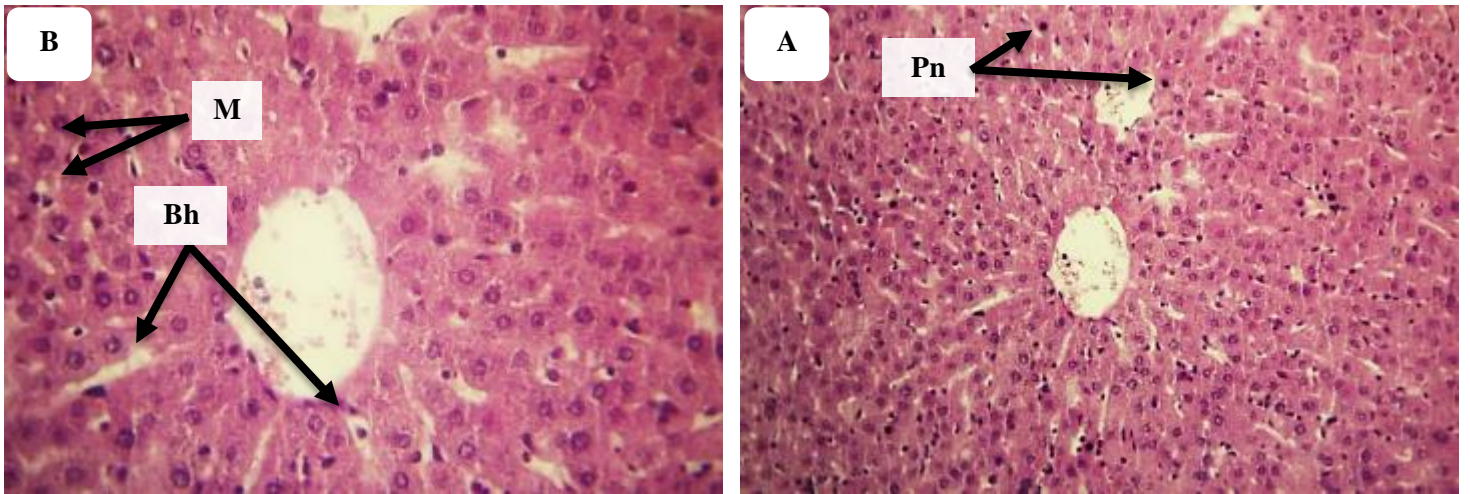
شكل رقم (3 - 1) : مقطع مستعرض في كبد احد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة ، يظهر التركيب النسيجي الطبيعي للكبد ، يبدو فيه الفصيصة الكبدي بصورة طبيعية ، يظهر الخلية الكبدية (Hc) ، الوريد المركزي (Cv) ، خلية كوبفر (Ku) ، Hepatocyte ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.) ، بقوة تكبير (400X) .



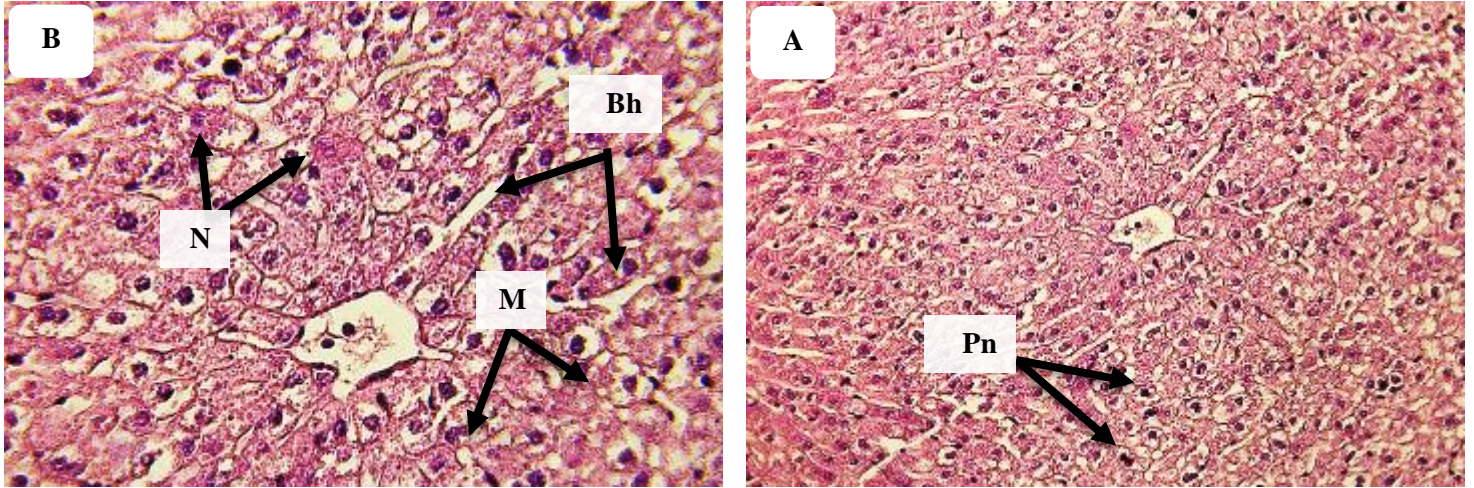
شكل رقم (3 - 2) : مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول)، يوضح : (A) تخريب المظهر الشعاعي للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي ، ارتشاح الخلايا اللمفاوية Infiltration lymphocytes (In) ، نخر (N) ، انوية متقاربة ، بقوة تكبير (200X) . (B) الخلايا الكبدية منتفخة Ballooned hepatocyte (Bh) ، خلايا ذات انوية متموتة (Pn) Macro & micro vascular steatosis (M) ، قطرات دهنية كبيرة وصغيرة ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.) ، بقوة تكبير (400X) ،



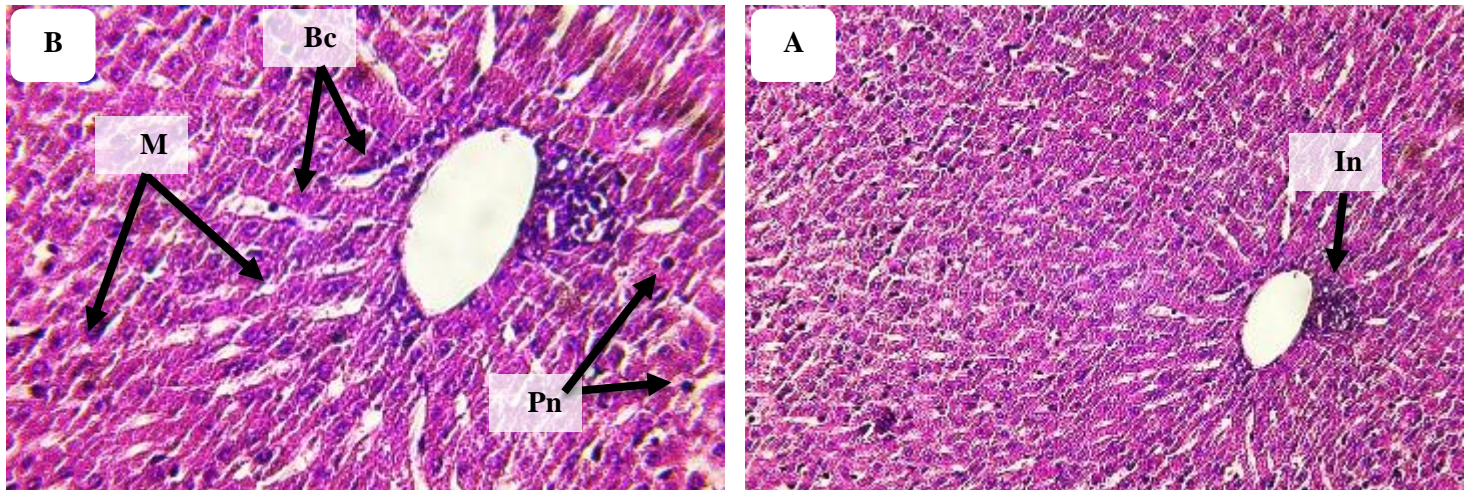
شكل رقم (3 - 3) : مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (5 ملغم / كغم) ، يوضح (A) عودة المظهر الشعاعي للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي ، تنخر (N) ، بقوة تكبير (200X) (B) قلة الخلايا الكبدية المنتفخة (Ballooned (Bh) hepatocyte ، قلة الخلايا ذات الانوية المتموتة (Pyknotic nuclei (Pn) ، قلة القطرات الدهنية الكبيرة والصغيرة (Macro & micro vascular Steatosis (M) ، بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.)



شكل رقم (3 - 4) : مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (10 ملغم / كغم) ، يوضح (A) عودة المظهر الشعاعي للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي ، قلة الخلايا ذات الانوية المتموتة (Pyknotic nuclei (Pn) ، بقوة تكبير (200X) . (B) قلة الخلايا الكبدية المنتفخة (Ballooned hepatocyte (Bh) ، قلة القطرات الدهنية الكبيرة والصغيرة اقل (Macro & micro vascular steatosis (M) ، بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.)



شكل رقم (3 - 5) : مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (15 ملغم / كغم) ، يوضح: (A) عودة المظهر الشعاعي للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي ، قلة الخلايا ذات الانوية متموتة (Pn) Pyknotic nuclei ، بقوة تكبير (200X) (B) قلة الخلايا الكبدية المنتفخة (Bh) Ballooned hepatocyte ، نخر (N) Necrosis ، قلة القطرات الدهنية الكبيرة والصغيرة (M) Macro & micro vascular steatosis ، بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.)



شكل رقم (3 - 6) : مقطع مستعرض لكبد احد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم) ، يوضح: (A) عودة المظهر الشعاعي للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي, ارتشاح الخلايا اللمفاوية (In) Infiltration lymphocytes ، بقوة تكبير (200X) (B) . قلة الخلايا الكبدية المنتفخة (Bh) Ballooned hepatocyte ، قلة الخلايا ذات الانوية المتموتة (Pn) Pyknotic nuclei ، قلة القطرات الدهنية الكبيرة والصغيرة (M) Macro & micro vascular steatosis ، بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.)

في الدراسة الحالية ادى تناول كميات منتظمة من العليقة الحاوية على 2.5% كوليسترول الى التسبب في تغيرات نسيجية في الكبد حيث يظهر تراكم للقطرات الدهنية بأحجام مختلفة ، ويلاحظ عدم انتظام الخلايا الكبدية بشكل شعاعي حول الوريد المركزي وحصول ارتشاح للخلايا للمفاوية ، فضلاً عن حصول انتفاخ في بعض الخلايا مع وجود بعض الانوية الممتوتة .

تتوافق هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة التي اشارت إلى أن الخطوات المتعددة المتضمنة تراكم الدهون والالتهابات في الكبد حدثت بسرعة أكبر استجابةً لنظام عالي الكوليسترول (Chun et al ., 2010 ; Yang et al ., 2012 ; Henriksen et al ., 2013) .

و كشفت دراسة أن اكباد الفئران التي تتغذى على نظام عالي الكوليسترول يحتوي على كميات من الدهون أعلى بكثير من كبد الفئران التي تتغذى على نظام غذائي اعتيادي (Ragab et al ., 2015) .

ان تراكم الدهون في الكبد عملية غير مفهومة بشكل دقيق، ولكن اقترح أنه عندما يتجاوز كمية الأحماض الدهنية الكبدية القدرة على التخلص منها ، يتم تخزينها على شكل TG في الكبد (Babin & Gibbons , 2009).

هناك العديد من الآليات التي يمكن أن تبدأ عبرها الدهون في التراكم في الكبد ، بما في ذلك زيادة توصيل الأحماض الدهنية إلى الكبد من تحلل الدهون في الأنسجة الدهنية وزيادة انتقال الأحماض الدهنية الغذائية إلى الكبد. (Lavoie & Gauthier, 2006 ; Dowman et al .,) (2010) .

وتعد السمنة الناتجة عن تناول نظام غذائي غني بالدهون سبباً في تراكم الدهون في الكبد وحدث مرض الكبد الدهني غير الكحولي Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) وتتطور بشكل أكبر من التتسكس الدهني البسيط Simple steatosis إلى التهاب الكبد الدهني غير الكحولي Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) الذي يؤدي إلى التهاب الكبد الدهني والتليف المتقدم وتليف الكبد Advanced fibrosis and cirrhosis ، تؤدي الزيادة في إجمالي الكوليسترول في الدم إلى ضعف التمثيل الغذائي للدهون الثلاثية مما يؤدي إلى ترسب/ تراكم الأحماض الدهنية الحرة في الكبد ، مما يؤدي إلى حالة تعرف باسم الكبد الدهني Fatty liver ، ينتج عن تجمع الأحماض الدهنية في الكبد هذا زيادة في Peroxisomal β -oxidation والميتوكوندريا مما يؤدي إلى تكوين أنواع الأوكسجين التفاعلية ، و قد يؤدي هذا إلى تطور إصابة الكبد بالالتهابات الموضعية ، و مع الإفراط في التغذية الغنية بالدهون وعدم ممارسة الرياضة ،

يخزن الكبد والأنسجة الأخرى الطاقة الزائدة مثل الكليسيريدات الثلاثية (TG) (Schwimmer *et al.*, 2008 ; Nagle *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010).

وفي الظروف العادية ، يعالج الكبد كميات كبيرة من الأحماض الدهنية على أساس يومي ولكن يخزن فقط كميات قليلة في شكل TG ، بمحتوى TG ثابت أقل من 5٪. هذا لأن مستويات اكتساب الاحماض الدهنية عن طريق امتصاص البلازما وإنتاجها مجدداً داخل الكبد بشكل متوازن عبر أكسدة الاحماض الدهنية ومستويات إفراز البلازما كبروتين دهني منخفض الكثافة للغاية Very low-density lipoprotein غني بـ TG ، ان الكميات الصغيرة نسبياً من TG و المخزنة في الكبد تقع في قطرات الدهون السيتوبلازمية (Sardari *et al.*, 2012 ; Alves-Bezerra & Cohen, 2017)

في الدراسة الحالية ، حاولنا تحديد الآثار العلاجية لجسيمات الفضة النانوية بتركيز منخفضة على مستوى الكوليسترول في الدم وكذلك التأثيرات النسجية .

لوحظ حصول تغيرات نسجية في كبد الارانب المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (5 ملغم / كغم) ، الشكل (3-3) ، حيث يلاحظ عودة المظهر الشعاعي المنتظم للخلايا الكبدية حول الوريد الكبدي مع بقاء بعض التأثيرات النسجية كوجود بعض القطرات الدهنية باحجام مختلفة وبعض الانوية المتموتة .

واظهرت مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (10 ملغم / كغم) تغيرات نسجية في كبد الارانب ، الشكل (3-4) ، اظهر عودة المظهر الشعاعي المنتظم للخلايا الكبدية حول الوريد الكبدي مع تحسن واضح في مظهر النسيج .

بينما حصلت تغيرات نسجية في كبد الارانب لمجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتركيز (15 ملغم / كغم) ، الشكل (3-5) ، واظهر عودة المظهر الشعاعي المنتظم للخلايا الكبدية حول الوريد الكبدي مع وجود بعض الانوية المتموتة وبعض الخلايا المنتفخة وكذلك وجود نخر .

اما مجموعة المعاملة بمستخلص اوراق نبات المورينغا النانوية بتركيز (15 ملغم / كغم) اظهرت تغيرات نسيجية في كبد الارانب , الشكل (3-6) , تحسن مظهر النسيج مع وجود ارتشاح للخلايا اللمفاوية .

اشارت دراسة اجريت من قبل (Sardari et al ., 2012) حصول تغيرات مورفولوجية في كبد وكلى مجموعات الفئران التجريبية التي عولجت بجسيمات الفضة النانوية عند مقارنتها بمجموعة السيطرة ، وقد يعزى تحسن مظهر النسيج الى قدرة الفضة النانوية على اكسدة الدهون والتقليل من مستوياته المرتفعة في الانسجة ودعم الاليات الطبيعية في التخلص من الكوليسترول وبالتالي التخلص من الاثار المصاحبة لفرط الكوليسترول في النسيج .

ان الجسيمات النانوية تُظهر اتجاهًا واضحًا يعتمد على الجرعة ، أي أن الجرعة العالية من الجسيمات النانوية أظهرت أضراراً في أنسجة الكبد وأنسجة الكلى في الفئران المعاملة تجريبياً، هناك طرق مختلفة لدخول الجسيمات النانوية إلى الجسم ، مثل الجهاز التنفسي والفم والحقن الوريدي (Nel et al ., 2006 ; Edwards-Jones, 2009) . وكذلك اشار Choi et al ., (2010) الى ان تراكم الدهون في الأنسجة يعتمد على مقدار الجرعة .

و تسبب جسيمات الفضة النانوية أيضاً تغيرات نسيجية مرضية في الكبد والكلى مما يشير إلى ميل أيونات الفضة لربط مجموعات الثيول Thiol groups في الكبد ، مما يتسبب في تفاعلات اختزال ، ونقل الجلوتاثيون Glutathione إلى المثانة الصفراوية وتقليل تركيز الجلوتاثيون المتاح لتفاعلات الاختزال الكيميائي الحيوي و تجدر الإشارة إلى أن تقليل الجلوتاثيون ضروري لإزالة البيروكسيدات Peroxides . (Kasiske et al ., 1990 ; Hendi , 2011)

3-5-1- التغيرات في نسيج الكلية Histological changes in kidney

اظهر الفحص المجهرى لمقاطع الكلى عن تغيرات مختلفة بين مجموعات الدراسة مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة . مقاطع الكلى لمجموعة السيطرة السلبية تبدو فيها الكبيبات الكلوية ،

ومحفظة بومان ، وعروة هنلي ، والنبيب الكلوي القريب والبعيد والخلايا المبطننة للنبيبات الكلوية .
الشكل (3- 7) يظهر الشكل الطبيعي للنسيج .

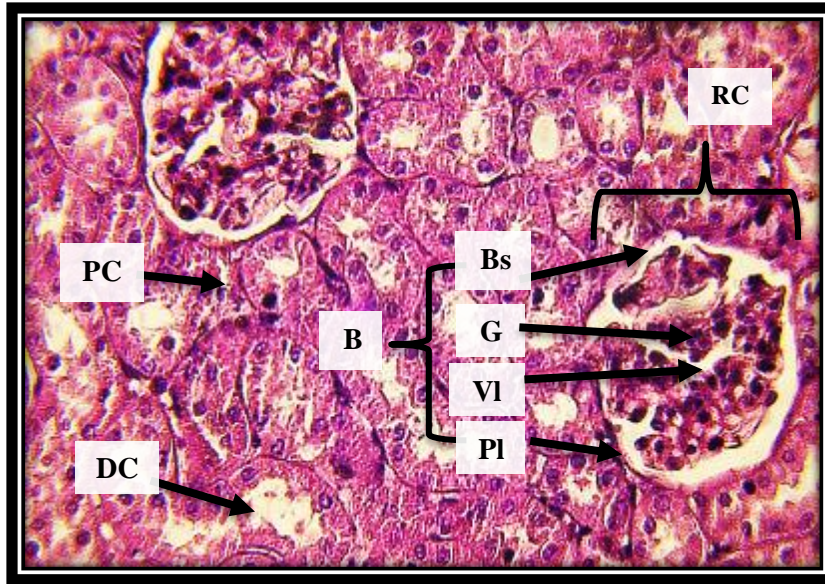
أظهرت مقاطع الكلى للأرانب في مجموعة السيطرة الموجبة والتي تتغذى على نظام غذائي عالي الكوليسترول (2.5% كوليسترول) و المصبغة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين، تغيرات طفيفة ، مثل وجود نزف دموي داخل الكبيبات الكلوية ، الكبيبات سليمة ، تراكم المواد البروتينية داخل النيببات البولية (hyaline cast) ، توسع بعض النيببات الكلوية ، و ارتشاح الخلايا اللمفاوية حول النبيب الحاوي على المواد البروتينية (hyaline cast) . الشكل (3- 8)

المقاطع النسجية لكلى مجموعة الارانب المعاملة بـ (5 ملغم / كغم وزن الجسم) جسيمات الفضة النانوية أظهرت، المكونات الكلوية سليمة : محفظة بومان ، الكبيبات الكلوية ، عروة هنلي، وجود نزف دموي ، وجود توسع في بعض النيببات الكلوية الشكل (3- 9) .

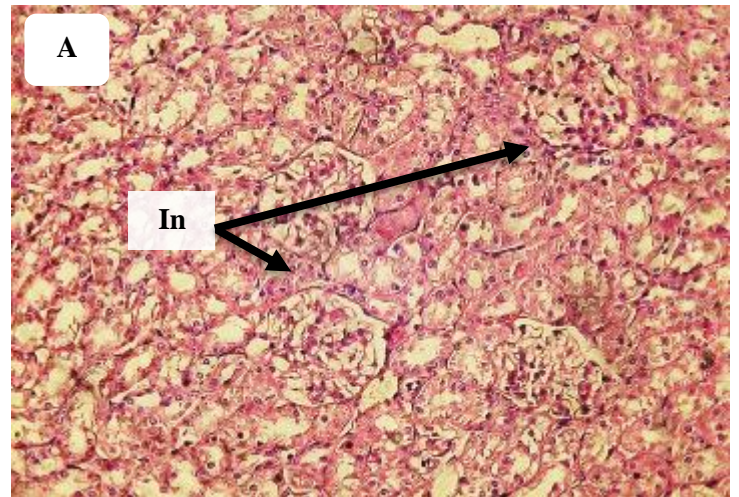
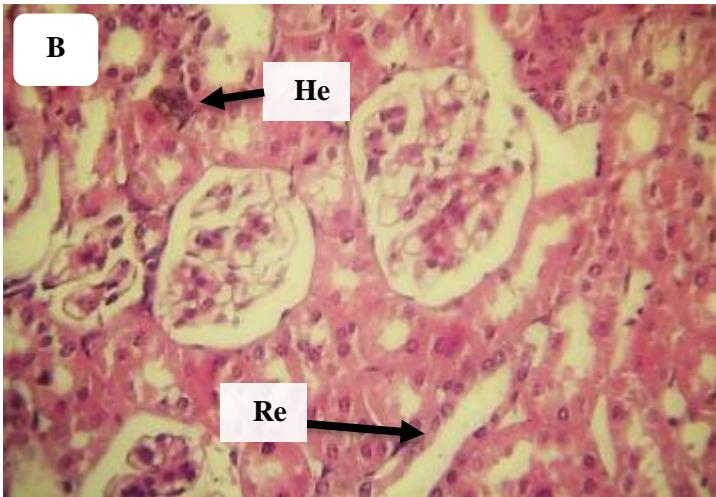
اظهرت المقاطع النسجية لكلى مجموعة الارانب المعاملة بـ (10 ملغم / كغم وزن الجسم) جسيمات الفضة النانوية ، عودة الكبيبات الكلوية ، و عروة هنلي ، ومحفظة بومان الى الوضع الطبيعي ، النيببات الكلوية متوسعة ، وجود القليل من الـ (hyaline cast) ، وجود نزف بسيط ، عدم وجود ارتشاح للخلايا اللمفاوية ، الشكل (3- 10)

واظهرت المقاطع النسجية لكلى مجموعة الارانب المعاملة بـ (15 ملغم / كغم وزن الجسم) جسيمات الفضة النانوية ، انسجة الكلى سليمة ، (المكونات الكلوية سليمة) : محفظة بومان ، الكبيبات الكلوية ، عروة هنلي ، النيببات الكلوية ، وجود نزف ، عدم وجود (Hyaline cast) ، الشكل (3- 11) .

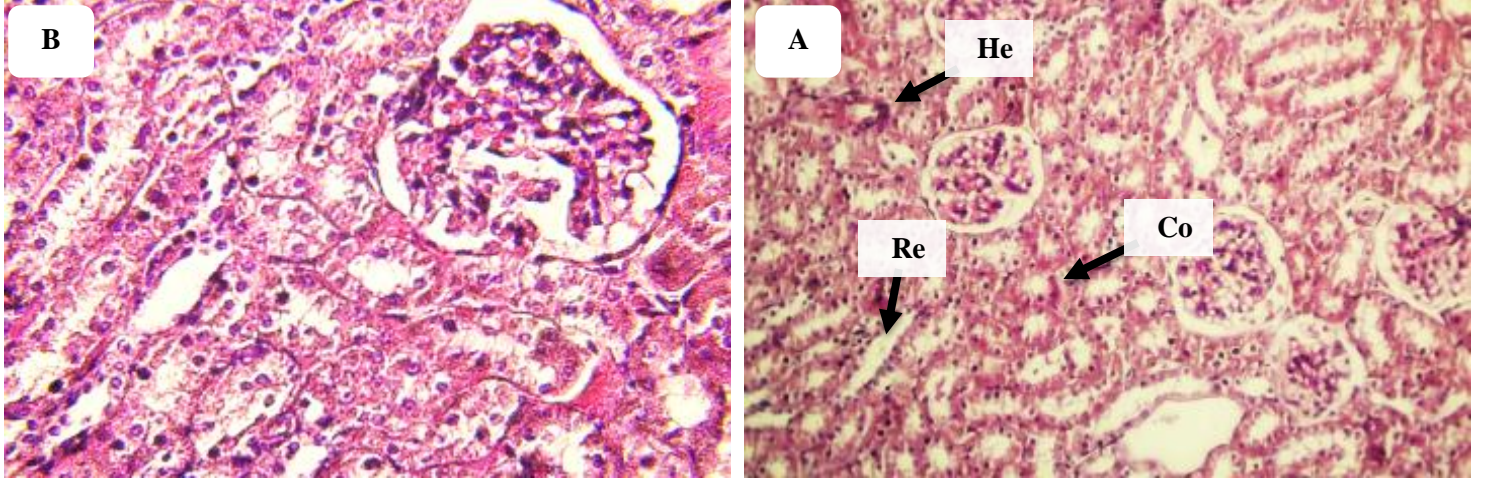
اظهرت المقاطع النسجية لكلى مجموعة ذكور الارانب المعاملة بـ (200 ملغم / كغم وزن الجسم) من مستخلص أوراق نبات المورينغا ، انسجة الكلى سليمة، مع وجود بعض الاحتقان والقليل من النيببات الكلوية المتوسعة .



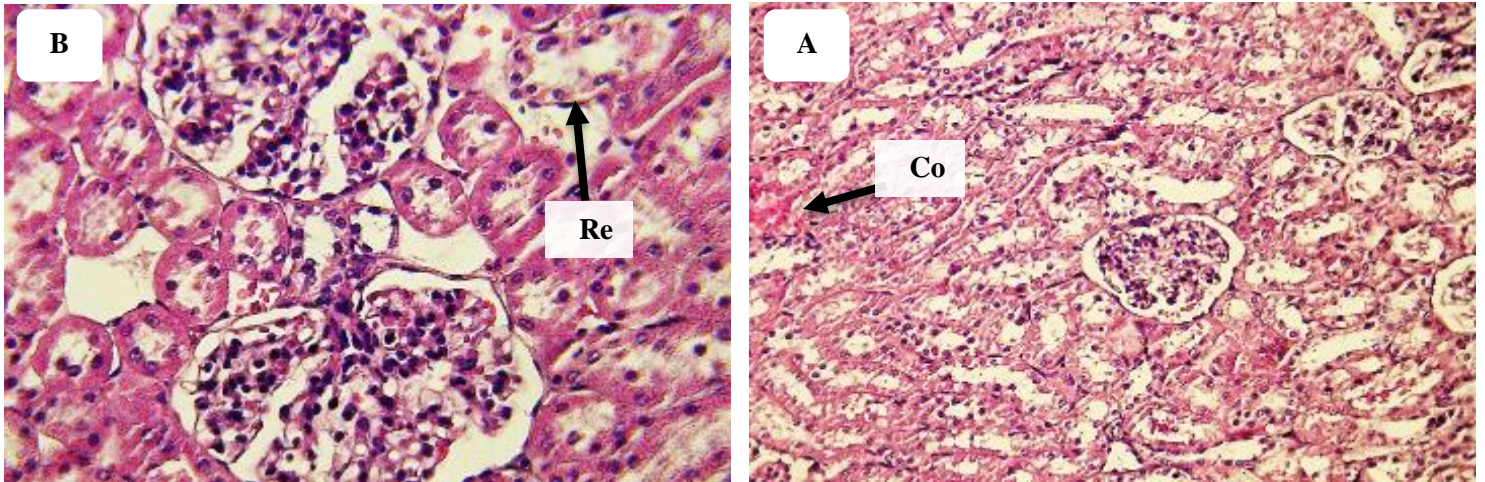
شكل رقم (3 - 7) : مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة يبدووا التركيب النسجي طبيعي، يوضح فيه الجسيمة الكلوية (Rc: Renal corpuscle) ، وتتكون من محفظة بومان (BC: Bowman's capsule) ، والكبيبة (G: Glomerulus) ، ومحاطة بطبقة جدارية (PL: Parietal layer) ، والطبقة الاحشائية (VI: Visceral layer) ، وفسحة بومان (BS: Bowman's space) . ويوضح ايضاً النبيب الملتوي الداني (PCT: Proximal convoluted tubules) والقاصي (DCT: Distal convoluted tubules) ، بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.).



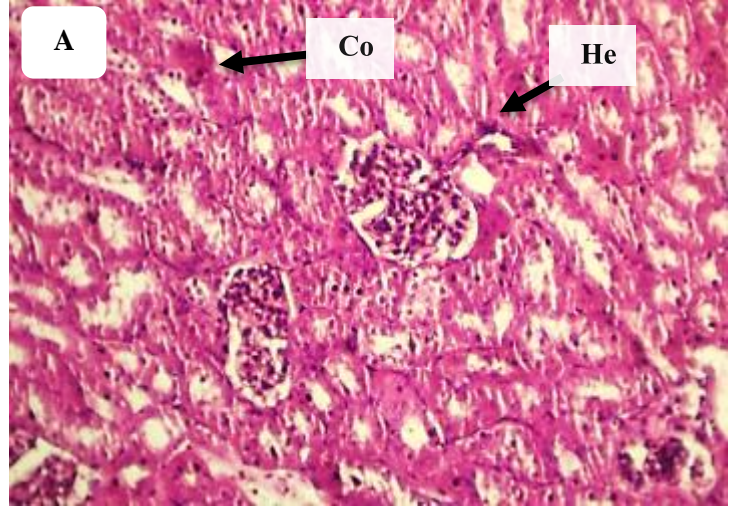
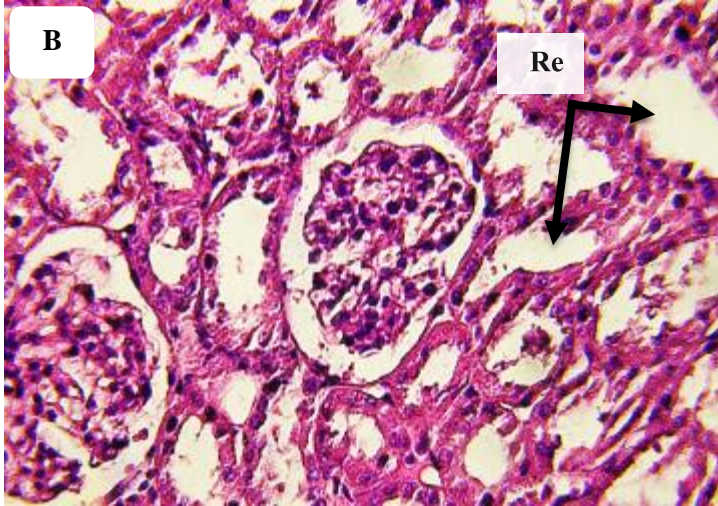
شكل رقم (3 - 8) : مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة ، أظهرت (A) نزف دموي (He) Hemorrhage ، توسع النبيبات الكلوية (Re) Renal tubules dilatation ، تجمع الانوية ، بقوة تكبير (200X) . (B) ارتشاح الخلايا اللمفاوية Infiltration lymphocytes (In) ، احتقان (Co) Congestion . بقوة تكبير (400X) ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.).



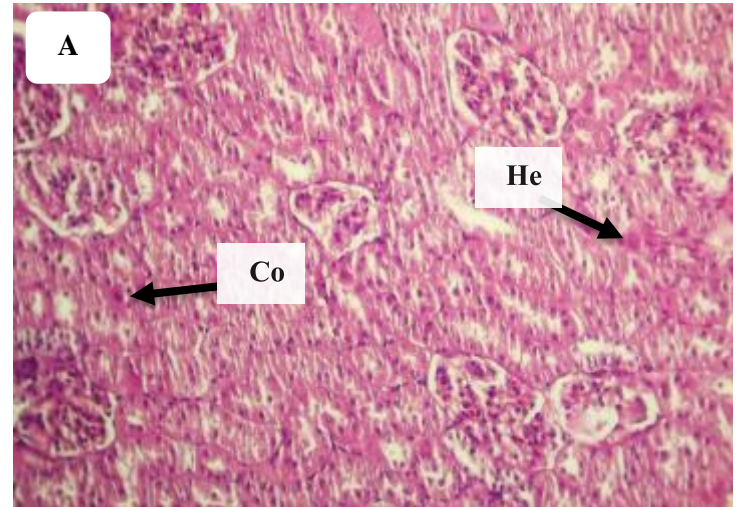
شكل رقم (3 - 9) : مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم)، أظهرت (A : نزف دموي Hemorrhage (He) ، مازالت بعض النبيبات الكلوية متوسعة (Renal tubules dilatation (Re) ، بقوة تكبير (200X). (B) بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.) .



شكل رقم (3 - 10) : مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم)، أظهرت (A : عودة المظهر النسيجي الطبيعي ، مع وجود احتقان بسيط (Co) Congestion ، بقوة تكبير (200X). (B) مازالت بعض النبيبات الكلوية متوسعة (Renal tubules dilatation (Re) ، بقوة تكبير (400X) ، ملون الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.) .



شكل رقم (3 - 11) : مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم)، أظهرت (A) وجود احتقان (Co) ، نزف دموي (He) Hemorrhage . بقوة تكبير (200X) . (B) النبيبات الكلوية متوسعة Renal tubules dilatation (Re) . بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.) .



شكل رقم (3 - 12) : مقطع مستعرض في كلى احد حيوانات مجموعة المعاملة مستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم)، أظهرت (A) وجود احتقان بسيط (Co) ، نزف دموي (He) Hemorrhage . بقوة تكبير (200X) . (B) بعض النبيبات الكلوية متوسعة Renal tubules dilatation (Re) . بقوة تكبير (400X) ، ملونة الهيماتوكسيلين والايوسين (H.&E.) .

لوحظت تغيرات نسيجية مختلفة في كلى الحيوانات التي تعاني من فرط كوليسترول الدم والتي شملت: احتقان ، ارتشاح الخلايا الليمفاوية خاصة بالقرب من الكبيبات ، توسع في الأنابيب الكلوية، نخر و تنكس .

وتعد السمنة وفرط كوليسترول الدم من عوامل الخطر الأكثر شيوعاً للإصابة بأمراض الكلى المزمنة ، مما يشير إلى أن ترسب الدهون في الانسجة الحشوية الكلوية يضر بوظيفة الكلى (Gai *et al.* , 2019) . النظام الغذائي عالي الكوليسترول يحفز السمنة كعامل خطر كبير للإصابة بالضعف الكلوي ، ويعد الاستهلاك المفرط للنظام الغذائي عالي الدهون يمكن أن يسبب السمنة ويمكن أن يعدل بشكل كبير البنية القشرية الكلوية للفئران (Aguila *et al.*, 2003). تنكس الخلايا المبطنة للأنابيب الكلوية ، وكذلك الكبيبات ، والتي يمكن أن تسهم في ترسب الدهون التي يمكن أن تؤثر بشكل مباشر على الغشاء القاعدي الكبيبي ، ويمكن تسريع هذه الدورة البطيئة في حالة الاضطرابات الأيضية التي تسببها السمنة ، مثل الالتهاب أو الأكسدة (Henegar *et al.* , 2001) .

في حالة فرط كوليسترول الدم المزمنة ، يحدث تراكم الدهون الزائد في الكلى ، وتؤدي السمية الدهنية إلى تنشيط المسارات الالتهابية ، والليفية ، والمؤدية لموت الخلايا المبرمج، مما يسبب إصابة خلوية وخلل وظيفي كلوي (De Vries *et al.* ,2014 ; Chen *et al.* , 2019) . ويعد النظام الغذائي عالي الدهون مسبب للسمنة وقد ينتج متلازمة التمثيل الغذائي ، وقد ثبت أنه يغير التمثيل الغذائي للدهون الكلوية ويسبب الخلل الوظيفي اللايسوسومي مما يؤدي إلى إصابة الكلى في الفئران (Kume *et al.* , 2007 ; Yamamoto *et al.* ,2017) .

و قد تكون هذه التغييرات ناتجة عن ترسب الدهون في الأنابيب الكلوية المبطنة بالخلايا ، وكذلك الكبيبات و التي يمكن أن تتلف الغشاء القاعدي الكبيبي بشكل مباشر ، و يمكن أن يحفز أيضاً تنشيط الخلايا الميزنكية Mesangial وتكاثرها ، (Kasiske *et al.* ,1990 ; Agarwal & Curley, 2005) . وهي واحدة من السمات المرضية الأساسية لاعتلال الكلية المرتبط بالسمنة، يمكن أن يؤدي تكاثر الخلايا الميزنكية Mesangial إلى الإصابة بتصلب الكبيبات وفقدان وظائف الكلى (Sun *et al.* , 2019) .

كان هناك عدد من الدراسات السابقة التي أبلغت عن الآثار الضارة للتغذية بغذاء عالي الكوليسترول على الكلى. (Kume *et al.* (2007) وصف أن التغذية بغذاء عالي الدهون تحفز الإنزيمات المولدة للدهون في مسار تخليق الأحماض الدهنية ولكنها تمنع تحلل الدهون ، مما يؤدي

لاحقاً إلى تراكم الدهون الزائدة داخل الكلى ، وقد يؤدي التمثيل الغذائي المتغير للدهون في النهاية إلى إصابة كلوية ، بما في ذلك تصلب الكبيبات والتليف العبري و الزلالية.

ذكر (Yamamoto *et a* (2017) أن تغذية بغذاء عالي الكوليسترول تؤدي إلى تراكم الدهون الفسفورية في الجسيمات داخل الخلايا الأنوبية القريبة الكلوية التي تضعف لاحقاً التدفق الذاتي الذي يؤدي إلى التهاب الكلى. لذلك ، يبدو أن الأنظمة الغذائية التي تحتوي على نسبة عالية من الدهون لها طرق متعددة للبحث على إصابة الكلى .

تبتلع البلاعم أيضاً الدهون لتصبح خلايا رغوية ، والتي يتم اكتشافها بشكل شائع في المراحل المبكرة من التهاب كبيبات الكلى ، كل نوع من أنواع الخلايا هذه قادر على إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية التي تعمل على أكسدة LDL ، و يمكن أن يتسبب LDL المؤكسد في زيادة تجنيد الخلايا الوحيدة، والخلل البطاني ، والسمية الخلوية لخلايا Mesangial. (De Vries *et al* .,2014)

ركزت معظم الأبحاث على فرضية السمية الكلوية الدهنية (Moorhead *et al* .,1982). يدعي Moorhead في هذه الفرضية أن الالتهاب وتطور أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) والإجهاد الكهربائي الداخلي يمكن أن يتطور نتيجة لفرط كوليسترول الدم ، و هناك دليل على أن تراكم الدهون الكلوية يمكن أن يسبب تغيرات هيكلية ووظيفية في خلايا Mesangial ومنتجاتها وخلايا الانبوب القريب . (De Vries *et al* .,2014)

وتؤدي الميتوكوندريا دوراً أساسياً في التمثيل الغذائي الخلوي وإنتاج الطاقة اللازمة لجميع الوظائف الخلوية. الميتوكوندريا هي المصدر الأساسي لإنتاج أنواع الأكسجين التفاعلي داخل الخلايا ROS وتحتوي ترسانة ذاتية التدمير من العوامل التي يمكن إطلاقها لتعزيز موت الخلايا المبرمج (Vakifahmetoglu-Norberg *et al* ., 2017) .

وقدمت دراسة أجريت بواسطة (Sun *et al* (2020) دليلاً على أن تغذية بغذاء عالي الكوليسترول تعزز الإصابة الكلوية عن طريق إحداث الإجهاد التأكسدي والخلل الوظيفي في الميتوكوندريا الذي يؤدي إلى موت الخلايا المبرمج الأنوبية الكلوية.

عولجت مقاطع الكلى من مجموعة الحيوانات المعاملة بجسيمات الفضة النانوية ، وأظهرت مقاطع الكلى تحلل دهني في الأنابيب الكلوية مع نخر وهذا توافق مع (Awasthi *et al.* , 2013)، كما وأظهرت دراسة أخرى تجمع هائل للخلايا وحيدة النواة حول الأوعية الدموية مع نزيف في الأنابيب الكلوية ، وكذلك ظهور ترسبات من البروتينات ممثلة بالأميلويد داخل الأوعية الدموية الشكل (Bakand & Hayes , 2016) . وفي دراسة أجريت من قبل Boverhof *et al.* , (2015) أظهرت حدوث النواة المتموتة Pyknic والنخرية مع بنية مشوهة في الكبيبة وكذلك ظهور قوالب غروانية كثيفة اليوزينيات في الأنابيب الكلوية المتوسعة مع شكل تحلل دهني. وأظهرت الدراسة الحالية أيضًا توسعاً في الأوعية الدموية نتيجة العلاج بـ AgNPs ، وحدثت استجابة التهابية ، يحدث توسع هذه الأوعية نتيجة تأثير التنبيه العصبي نتيجة وجود الحالة الالتهابية مما يؤدي إلى وصول المزيد من الدم إلى الخلايا المناعية وبالتالي يخلق ضغطاً كبيراً على جدران الأوعية الدموية ويؤدي إلى توسعها ، ويؤدي أيضًا إلى تنشيط الوسائط الكيميائية (Boverhof *et al.* , 2015). و يؤكد (Kim *et al.* , 2010) وجود النزف في مقاطع نسيج الكلى وجود تمزق في الأنسجة نتيجة التعرض لأيونات الفضة المتحررة من جزيئات الفضة النانوية، ويشير أيضاً إلى أن جرعات AgNPs تؤدي إلى تسرب وانتشار خلايا الدم الحمراء داخل الفراغ العبري في الأنسجة المتضررة .

3 - 4 النتائج المناعية النسجية

3-4-1 نتائج انترلوكين IL-1 β

3-4-1-1 نتائج انترلوكين IL-1 β في الكبد :

أظهرت الدراسة المناعية في الغشاء الخلوي وساييتوبلازم مقاطع انسجة الكبد للارانب تعبيراً ايجابياً لانترلوكين IL-1 β بشدة متفاوتة حيث كانت ضعيفة +1 score لحيوانات السيطرة السالبة و عالية +3 score مجموعة السيطرة الموجبة ومتفاوتة في مجاميع المعاملة الأخرى جدول (3 - 4).

جدول رقم (3-4) التعبير عن انترلوكين IL-1 β في سايتوبلازم والغشاء الخلوي لنسيج كبد الارانب

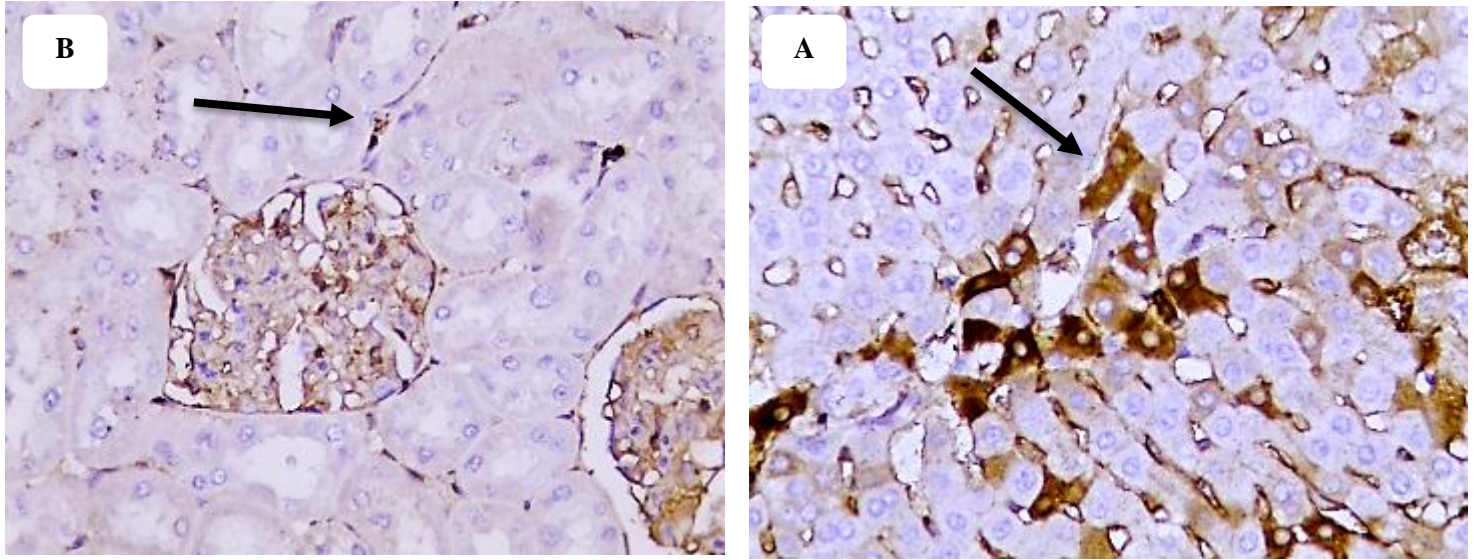
المجموعات	Score of IL-1 β	
مجموعة السيطرة السالبة	+1	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة السيطرة الموجبة	+3	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بـ AgNPs 5 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بـ AgNPs 10 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بـ AgNPs 15 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بمستخلص أوراق نبات المورينغا 200 ملغم / كغم / وزن الجسم	+3	Cytoplasmic & Cell membrane

3-4-1-2 نتائج انترلوكين IL-1 β في الكلية :

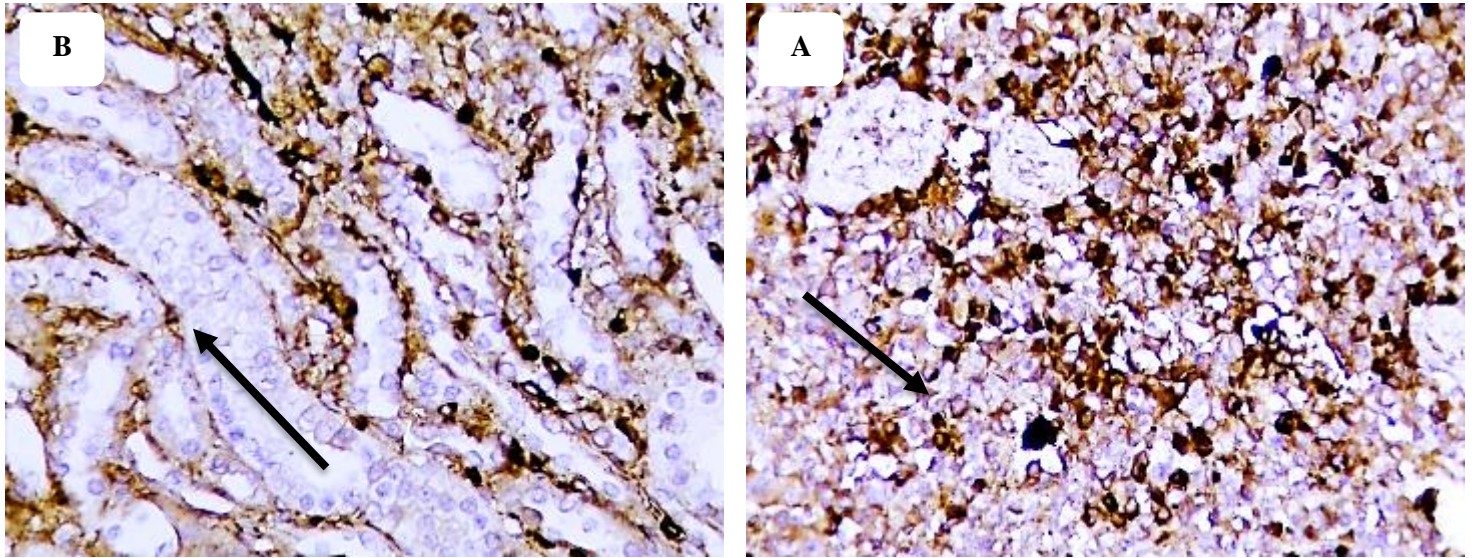
أظهرت الدراسة المناعية في الغشاء الخلوي وسائتوبلازم مقاطع انسجة الكلى للارانب تعبيراً ايجابياً لانترلوكين IL-1 β بشدة متفاوتة حيث كانت ضعيفة +1 score لحيوانات السيطرة السالبة و عالية +3 score مجموعة السيطرة الموجبة ومتفاوتة في مجاميع المعاملة الأخرى جدول (3-5) .

جدول رقم (3-5) التعبير عن انترلوكين IL-1 β في سايتوبلازم والغشاء الخلوي لنسيج كلى الارانب

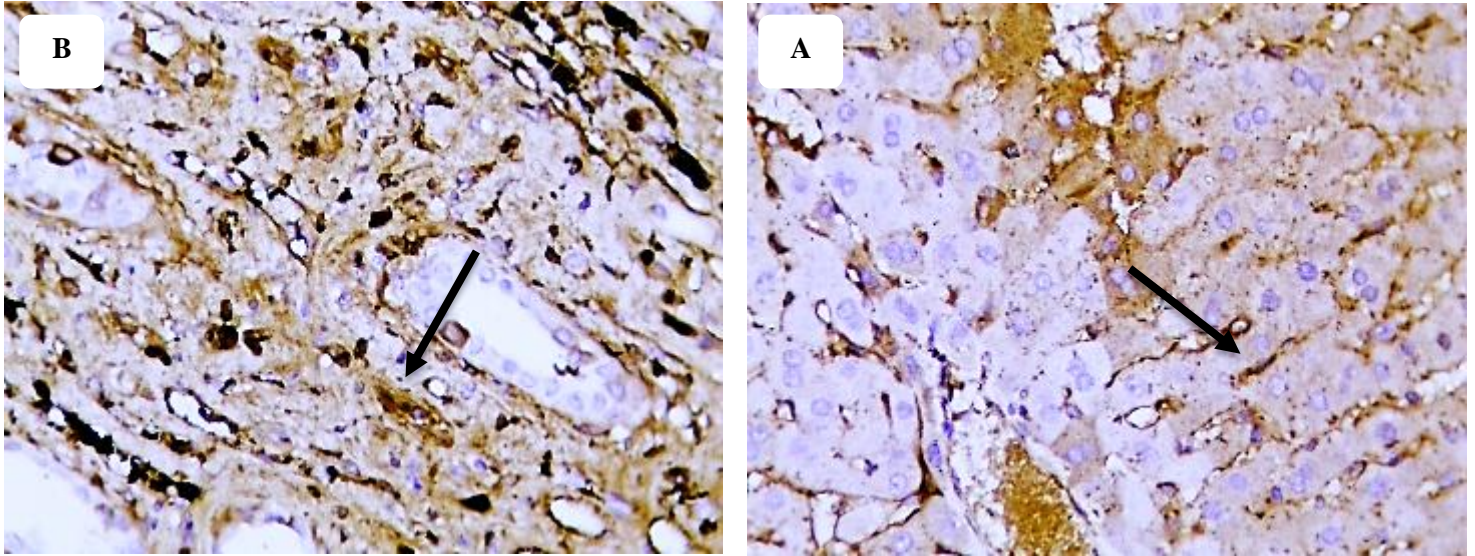
المجموعات	Score of IL-1 β	
مجموعة السيطرة السالبة	+1	Cell membrane
مجموعة السيطرة الموجبة	+3	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بـ AgNPs 5 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بـ AgNPs 10 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بـ AgNPs 15 ملغم / كغم / وزن الجسم	+3	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريب بمستخلص أوراق نبات المورينغا 200 ملغم / كغم / وزن الجسم	+3	Cytoplasmic & Cell membrane



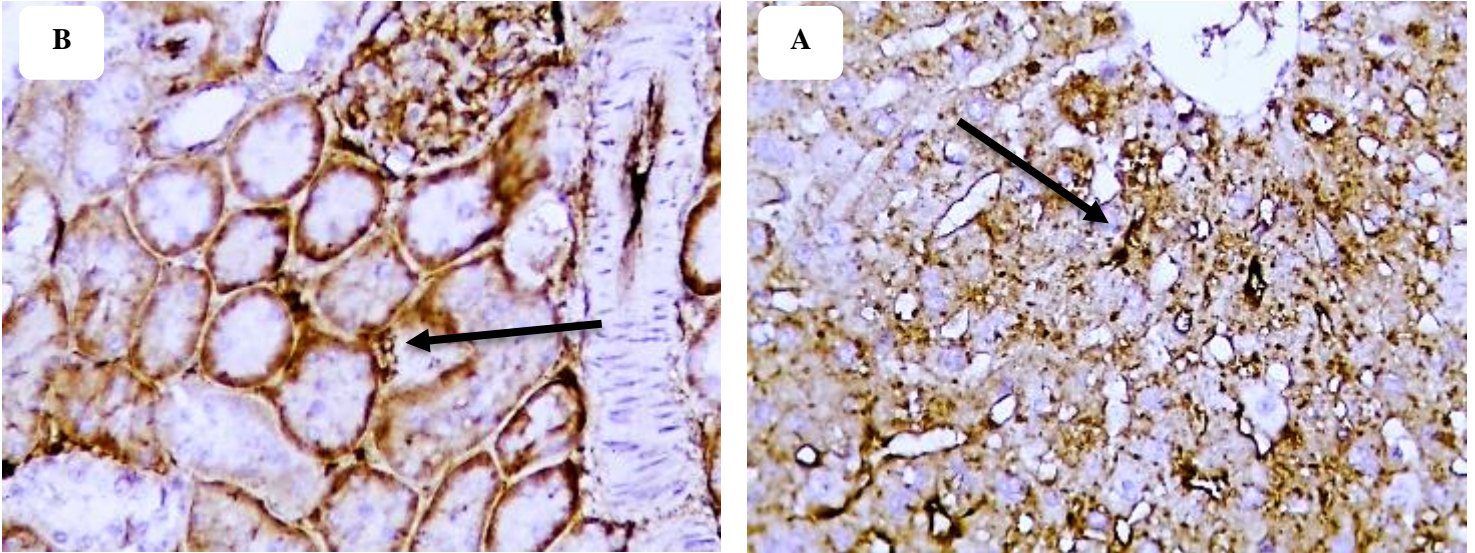
شكل (3 - 13) : (A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة , أظهر : المناطق البنية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +1 . (B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة , أظهر : قلة المناطق البنية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم , تصبغ IHC . Score +1 .



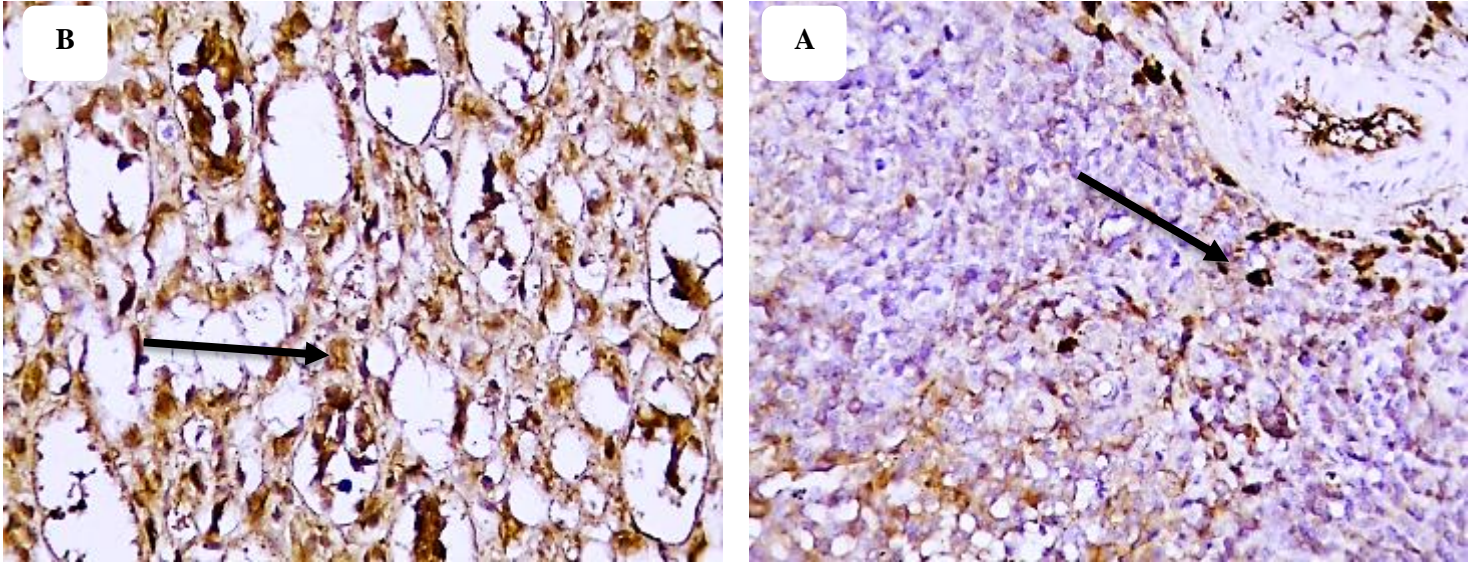
شكل (3 - 14) : (A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول) , أظهر : المناطق البنية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +3 . (B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول) , أظهر : المناطق البنية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +3 .



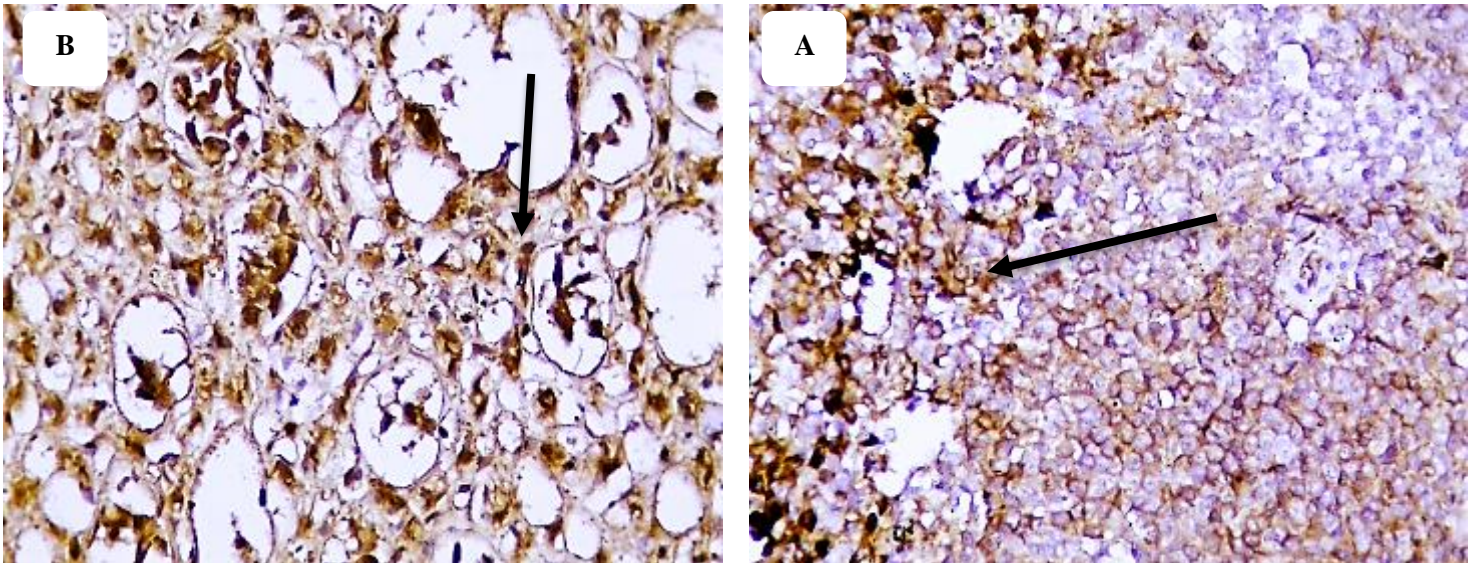
شكل (3 - 15) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +2 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score + 2 .



شكل (3 - 16) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +2 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score + 2 .



شكل (3 - 17) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +2 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بجسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +3 .



شكل (3 - 17) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +3 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ $IL-1\beta$ في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +3 .

اظهرت الدراسة الحالية حدوث التهاب في المقاطع النسجية المصبغة بتقنية IHC و اظهر مناطق بنية للكشف عن IL-1 β ولاسيما في المقاطع المعاملة بجسيمات الفضة النانوية .

ان إنترلوكين السيتوكاينين المناعة الذاتية IL-1 β ، و يؤدي أدوارًا رئيسية في مجموعة واسعة من الحالات الالتهابية ، بما في ذلك تصلب الشرايين ومضاعفاته ، و يقلل تقييد IL-1 β في المرضى الذين يعانون من تصلب الشرايين من عبئ الالتهاب وتكرار امراض القلب والأوعية الدموية ، مما يؤسس دورًا مهمًا لإشارات IL-1 β في التسبب في تصلب الشرايين . (Ridker *et al.* , 2017) .

حصلت زيادة في IL-1 β للمجاميع المستحث فيها فرط الكوليسترول وتوافقت النتائج مع (2005), Hansson وذكر ان الزيادة في إنتاج IL-1 β يحدث في الاشخاص الذين يعانون من فرط كوليسترول الدم ، وان تعديل مسارات المناعة والالتهابات آلية مركزية تسهم عبرها عوامل الخطر في تصلب الشرايين .

ان تراكم الدهون ادى الى زيادة إنتاج IL-1 β وتوافقت النتائج مع ما جاء به (2013), Nov *et al.* اذا وصفوا ان زيادة IL-1 β كانت مصحوبة بتراكم الدهون في خلايا الكبد والالتهاب ومقاومة الأنسولين الكبدي والتليف ، و اظهرت الفئران التي استخرج منها IL-1 β والتي تتبع نظامًا غذائيًا عالي الدهون التهاباً في الأنسجة وزيادة IL-1 β مقارنةً بفئران السيطرة السالبة . تدعم هذه البيانات الدور الهام لـ IL-1 β في التهاب الأنسجة، وتوافقت نتائجنا أيضا مع (2010), Moschen *et al.*

و تزداد تركيزات IL-1 β في المرضى الذين يعانون من فرط الكوليسترول ، على الرغم من أن نصف عمر هذا السيتوكين قصير جدًا (2010), Donath *et al.* .

و اظهر المرضى الذين يعانون من فرط الكوليسترول و السمنة المفرطة تعبير IL-1 β أعلى بكثير في الأنسجة الدهنية تحت الجلد / الحشوية مقارنة بتعبير الكبد (2010), Nold *et al.* .

و في دراسة أجريت من قبل (2011), Kamari *et al.* لتحديد دور IL-1a / β في التنكس الدهني والتهاب الكبد الدهني اقترح ان في نموذج التنكس الدهني كان ناتجاً عن النظام الغذائي ، لوحظ أيضاً زيادة في التعبير الكبدي عن IL-1a / β .

اشارت دراسة من قبل Isoda *et al.* (2005) ، أن النقص في IL-1a أو IL-1b يقلل بشكل ملحوظ من تطور التتسكس الدهني Steatosis إلى التهاب الكبد الدهني Steatohepatitis وتليف الكبد في نموذج الفأر الذي يعاني من التهاب الكبد الدهني الناتج عن النظام الغذائي ، علاوة على ذلك ، اشارت دراسة أخرى من قبل Mansouri *et al.* (2008) ان تراكم الكوليسترول في الكبد مما يخلق دائرة التهاب وتراكم IL-1 β .

و كشف دراسة أجريت من قبل Jiang *et al.* (2019) عن وجود علاقة بين إنتاج IL-1 β ، ومستويات الكوليسترول الكلي والدهون الثلاثية في الدم وبينت الدراسة أن الأنسجة في المرضى الذين يعانون من كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة في الدم 130 مجم / ديسيلتر أو الكوليسترول الكلي 200 مجم / ديسيلتر أنتجت كمية أعلى بمقدار 10 أضعاف من IL-1 β مقارنة مع المرضى الذين يعانون من انخفاض كوليسترول LDL في الدم أو الكوليسترول الكلي . ويؤدي تراكم الكوليسترول في خلايا الكبد دوراً محورياً في التهاب الكبد الناجم عن الدهون وتوافقت هذه النتائج أيضاً مع (Marí *et al.* , 2006 ; Wouters *et al.* ,2010)

و ان عملية توليد IL-1 β الناضج عملية ديناميكية يتحكم فيها التنشيط الالتهابي، اذ تتمتع بلورات الكوليسترول والبروتين الدهني المؤكسد منخفض الكثافة (LDL) ، مما يؤدي إلى نضوج وإفراز IL-1 β (Sheedy *et al.* , 2013 ; Duewell *et al.* , 2010) . بينما يمكن تحفيز توليد IL-1 β في Macrophages بواسطة متعدد السكريات الدهنية (LPS) Lipopolysaccharide (Gaidt *et al.* , 2016) .

اشارت دراسة اجريت من قبل Yamaguchi *et al.* (2007) ان الفئران التي تعاني من نقص IL-1 β كانت اقل التهاب في الكبد ، وكذلك تنكس دهني أقل مقارنةً بفئران السيطرة ، وقد تكون العلاقة بين تراكم الكوليسترول وزيادة الالتهاب اشارة الى احتمال ان يكون IL-1 β مساهم بشكل كبير في تنظيم توازن الكوليسترول اثناء التنكس الدهني وان تثبيط التهاب الكبد قد لا يكون بسبب انخفاض تراكم الدهون (McClain *et al.* , 2007)

اظهرت الدراسة الحالية مستوى التهاب متباين للمجاميع المعاملة بجسيمات الفضة النانوية بتراكيز مختلفة ومستخلص اوراق نبات المورينغا .

توضح البيانات في الدراسة الحالية هناك على أن AgNPs لها أنشطة التهابية. و أظهرت دراسة أجريت من قبل Carlson *et al.* (2008) أن الخلايا البلعمية للجرذان التي تعرضت

لتركيز منخفضة من AgNPs (5 و 10 و 25) ملغم , أنتجت مستويات كبيرة من السيتوكينات المؤيدة للالتهابات ، مثل IL- 1 β و TNF- α وهذا توافق مع نتائج الدراسة الحالية .

و اشارت دراسة اجريت من قبل (Zampronio *et al.* , (1994) أن الجسيمات النانوية الفضية عززت انتاج IL-1 β المصاحب للالتهابات ، و عند إعطائها للفئران أثارت استجابات حموية ، وعليه يبدو أن AgNPs تمتلك إمكانات لتحفيز إطلاق IL-1 β .

واقترح (Lim *et al.*, (2012) انه عند التعرض لـ AgNP ، فإنها تحفز التفاعلات المناعية بتركيزات مختلفة ، بما فيها تحريض انتاج الإنترلوكين IL-1 β والذي يشارك في توليد ROS .

ومن ناحية أخرى ، يقترح بعض الباحثين أن AgNPs يمكن أن يكون لها أيضًا خصائص مضادة للالتهابات واقترح (Tian *et al.* , (2007) أن علاج الحروق المصابة بها الفئران باستخدام AgNPs يزيد من معدل الشفاء .

بينما اشارت دراسة اجريت من قبل (Fabrega *et al.* , (2011) ان التراكيز (20 و 40 و 60) ملغم من AgNPs لم يحفز تعبير السيتوكينات المؤيدة للالتهابات، مثل IL-1 β أو IL-6 وعزى ذلك الى انه قد يكون لحجم الجسيمات النانوية ونوع الخلايا ووقت التحفيز في المختبر تأثير أيضًا على إنتاج السيتوكينات المؤيدة للالتهابات

وفي الانسجة اخرى يلاحظ قدرة AgNP على التسلسل الى مجرى الدم ، وتسبب أن الجسيمات النانوية ارتشاح إلى جدار الخلية وبالتالي تتسلل الى مجرى الدم ينتج عن هذا انتقال هذه الجزيئات النانوية وتوزيعها إلى أعضاء مختلفة كالكبد والكلى وغيرها . (Johnston *et al.*, 2010; Kim and Choi, 2012; Liu *et al.*, 2013)

من المعروف أن الجسيمات النانوية تحفز السمية عبر الإجهاد التأكسدي والالتهاب عن طريق توليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) في الخلايا (Martin & Teismann , 2009) .

وتعد البلعمة لـ AgNPs محفزة للإشارات الالتهابية عبر توليد ROS ، تليها الخلايا المنشطة التي تسببها إفراز TNF- α وتوليد IL-1 β و IL-6 ، وبالتالي ، قد تؤدي زيادة عامل نخر الورم ألفا TNF- α والسيتوكينات الالتهابية مثل IL-1 β أو IL-6 إلى تلف غشاء الخلية وموت الخلايا المبرمج. (Park *et al.* , 2010)

3-4-2 دراسة انترلوكين IL-6

3-4-2-1 نتائج انترلوكين IL-6 في الكلية :

أظهرت الدراسة المناعية لانترلوكين IL-1 β في الغشاء الخلوي وسائتوبلازم مقاطع انسجة كبد للارانب تعبيراً ايجابياً بشدة متفاوتة حيث كانت متوسطة +1 score لحيوانات السيطرة السالبة و عالية +3 score لمجموعة السيطرة الموجبة ومتفاوتة في مجاميع المعاملة الأخرى جدول (3 - 6) .

جدول رقم (3- 6) التعبير عن انترلوكين IL-6 في سائتوبلازم والغشاء الخلوي لانسجة كبد الارانب

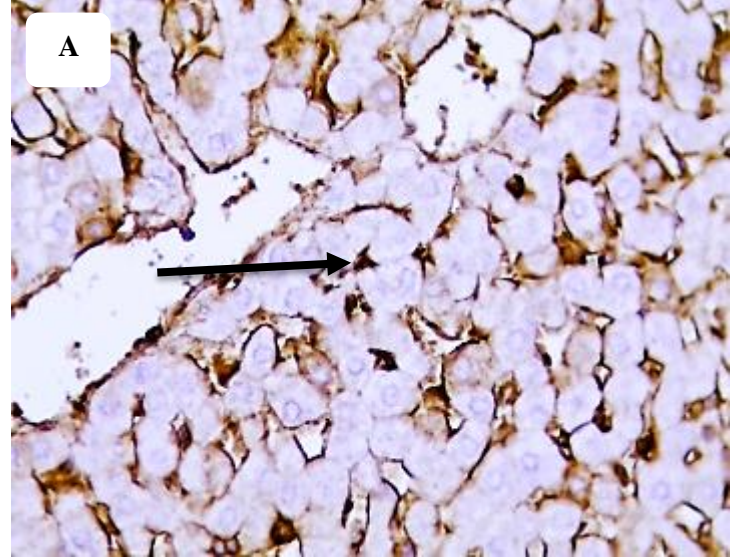
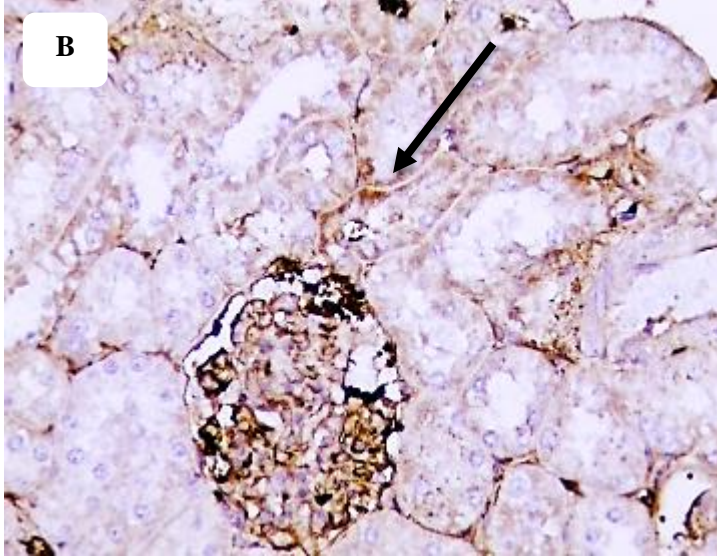
المجموعات	Score of IL-6	
مجموعة السيطرة السالبة	+1	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة السيطرة الموجبة	+3	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بـ 5 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بـ 10 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بـ 15 ملغم / كغم / وزن الجسم	+3	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بمستخلص أوراق نبات المورينغا 200 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane

3-4-2-2 نتائج انترلوكين IL-6 في الكلية :

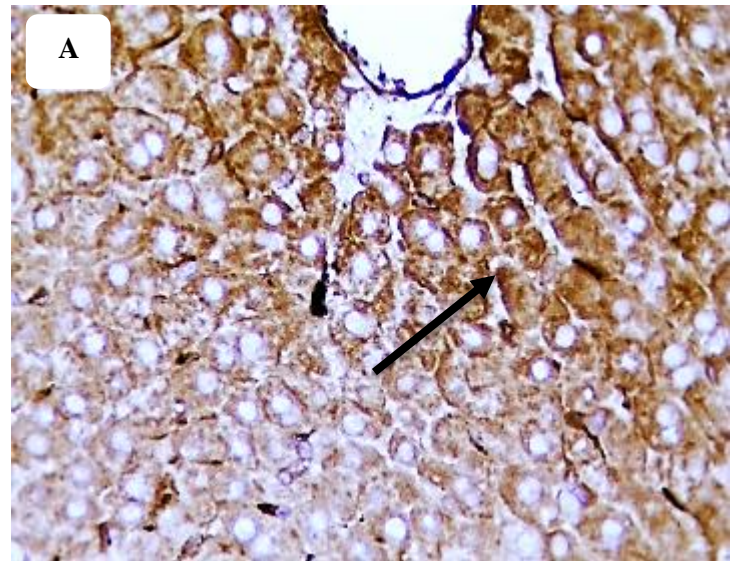
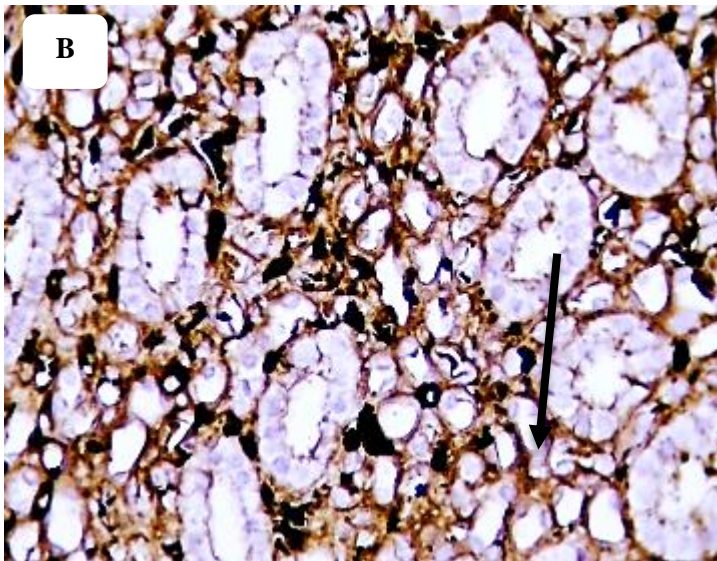
أظهرت الدراسة المناعية لانترلوكين IL-1 β في الغشاء الخلوي وسائتوبلازم مقاطع انسجة كلى للارانب تعبيراً ايجابياً بشدة متفاوتة حيث كانت متوسطة +1 score لحيوانات السيطرة السالبة و عالية +3 score لمجموعة السيطرة الموجبة ومتفاوتة في مجاميع المعاملة الأخرى جدول (3 - 7) .

جدول رقم (3- 7) التعبير عن انترلوكين IL-6 في سائتوبلازم والغشاء الخلوي لانسجة كلى الارانب

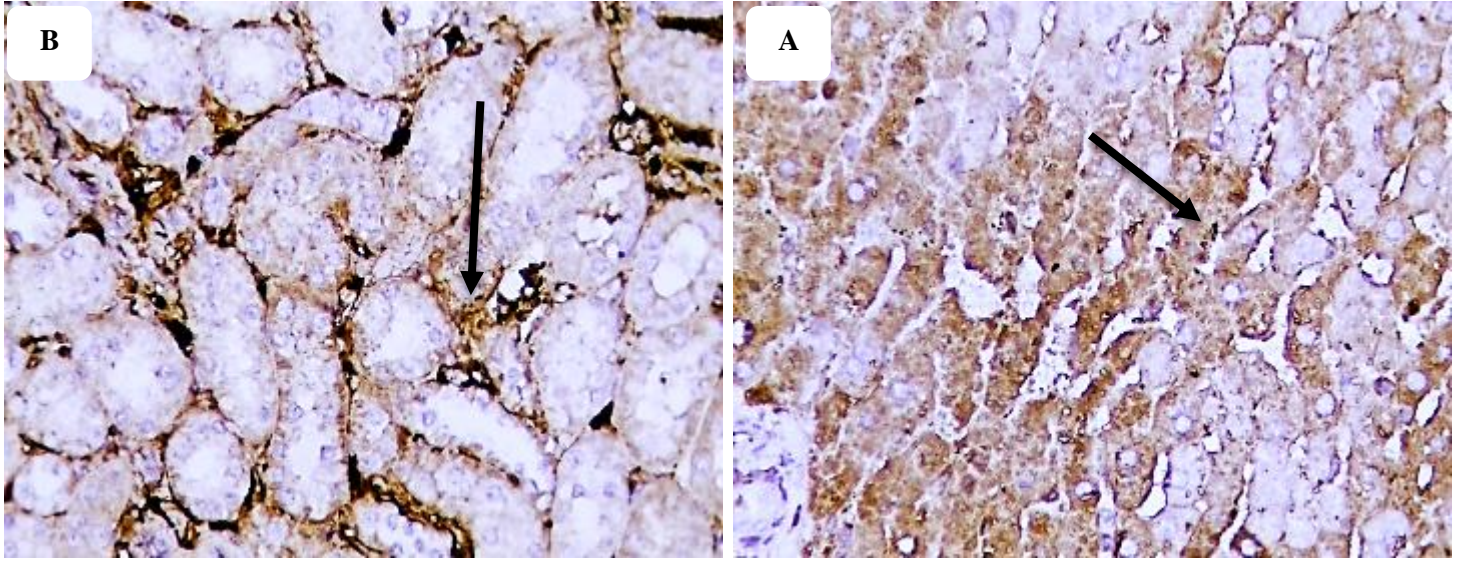
المجموعات	Score of IL-6	
مجموعة السيطرة السالبة	+1	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة السيطرة الموجبة	+3	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بـ 5 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بـ 10 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بـ 15 ملغم / كغم / وزن الجسم	+3	Cytoplasmic & Cell membrane
مجموعة التجريع بمستخلص أوراق نبات المورينغا 200 ملغم / كغم / وزن الجسم	+2	Cytoplasmic & Cell membrane



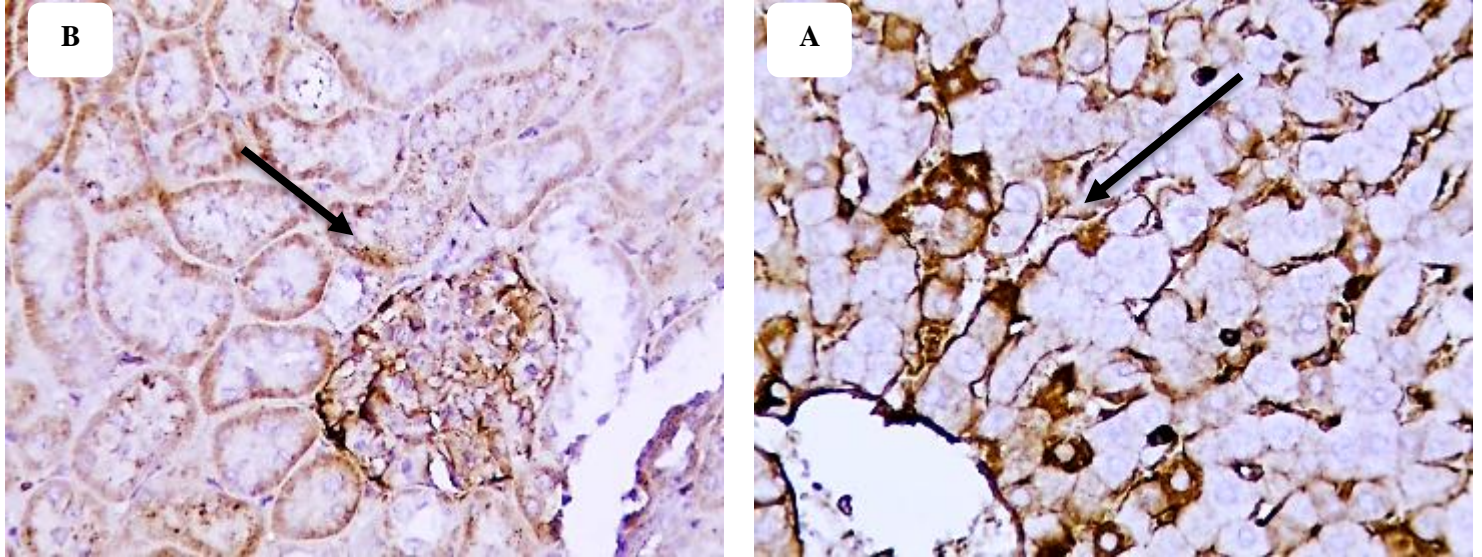
شكل (3 - 17) : (A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة , أظهر المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +1 . (B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة السيطرة السالبة , أظهر المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score + 1 .



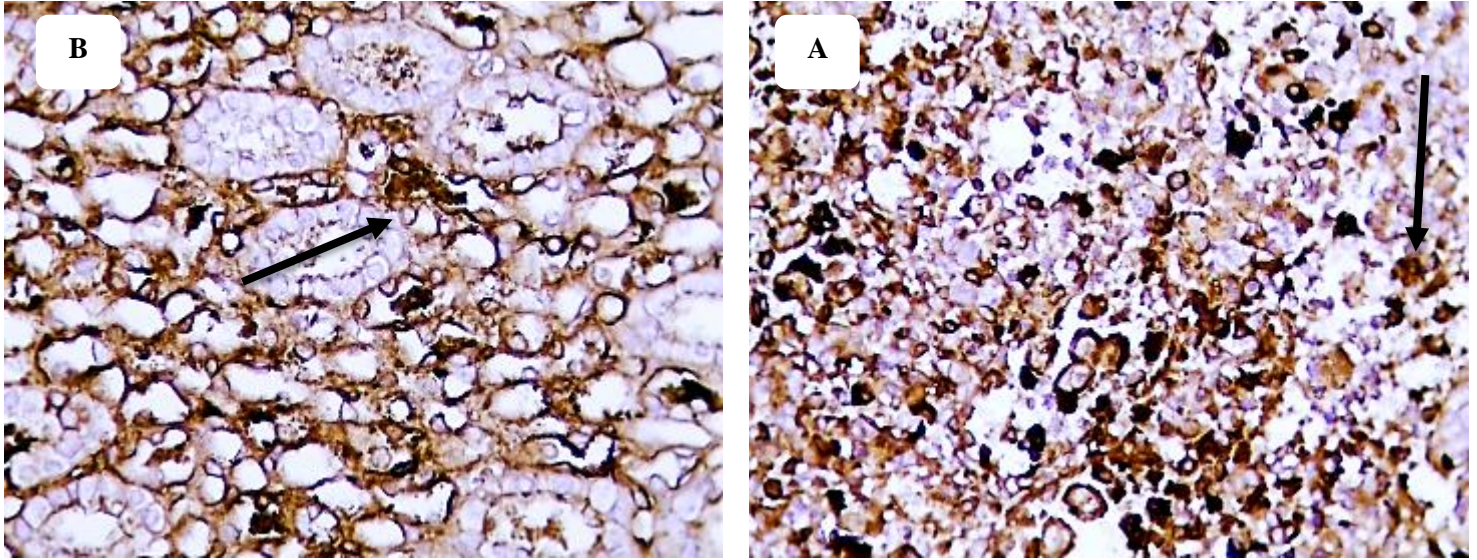
شكل (3 - 17) : (A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول) , أظهر المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +3 . (B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة السيطرة الموجبة (فرط الكوليسترول) , أظهر المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score + 3 .



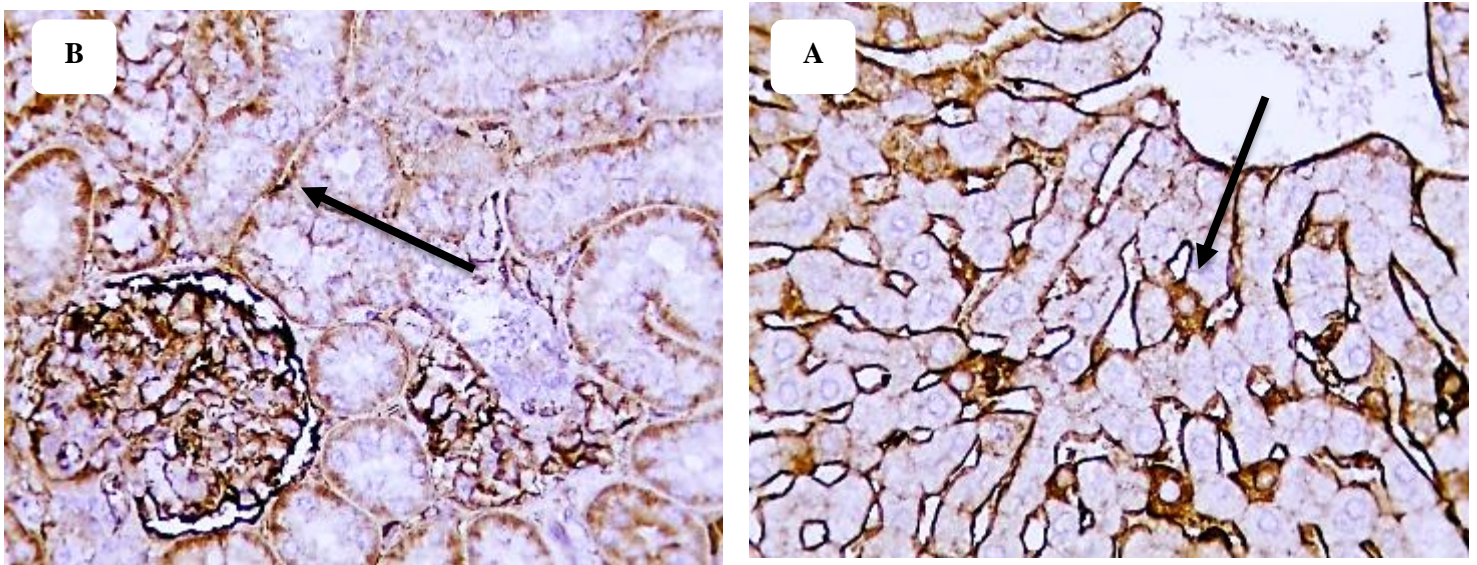
شكل (3 - 17) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة جسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم), أظهر : المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي ، تصبغ IHC . Score +2 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة جسيمات الفضة النانوية (5 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي ، تصبغ IHC . Score + 3 .



شكل (3 - 17) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة جسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي ، تصبغ IHC . Score + 2 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص جسيمات الفضة النانوية (10 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي ، تصبغ IHC . Score + 2 .



شكل (3 - 17) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة جسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +3 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة جسيمات الفضة النانوية (15 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score + 3 .



شكل (3 - 17) : A) مقطع مستعرض في كبد أحد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score +2 . B) مقطع مستعرض في كلى أحد حيوانات مجموعة المعاملة بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم / كغم) , أظهر : المناطق البنوية اللون لـ IL-6 في الساييتوبلازم والغشاء الخلوي , تصبغ IHC . Score + 2 .

ويعد IL-6 سايتوكين له العديد من الوظائف لتنظيم عملية تصنيع كريات الدم Hematopoiesis ، وتحريض تفاعلات المرحلة الحادة والالتهابات وكذلك ايض العظام والغضاريف والدهون (Kishimoto *et al.*, 1995 ; Mihara *et al.* , 2012)

و يشارك Interleukin -6 في تمايز وتنظيم الاستجابة المناعية وتنظيم الوظائف الخلوية المختلفة التي تشمل التكاثر Proliferation والموت الخلوي المبرمج Apoptosis و توليد الاوعية الدموية Angiogenesis . (Culig *et al.*, 2005) علاوة على ذلك ، يتم تصنيع Interleukin -6 بواسطة أنواع مختلفة من الخلايا مثل الخلايا البائية والتائية B and T cells ، والخلايا الوحيدة Monocytes ، والبلاعم Macrophages ، والخلايا الليفية Fibroblasts ، والخلايا البطانية Endothelial والظهارية Mesothelial ، والخلايا الكيراتينية Keratinocytes ، والخلايا البدينة Mast cell ، والخلايا اللحمية Stromal cells ، وفي بعض الخلايا العصبية وبعض الخلايا السرطانية (Kishimoto *et al.*, 1995). والمصدر الرئيسي الآخر لـ IL-6 هو الأنسجة الدهنية (Fain *et al.* , 2004) .

و اظهرت نتائج الدراسة النسجية المناعية الحالية وجود مستويات مرتفعة من Interleukin -6 (IL-6) في انسجة الكبد والكلية .

وأشارت دراسات الى ان IL-6 له دور مهم و تنظيمي في عملية توازن الدهون في الانسجة وترتبط مستويات الـ IL-6 بمستويات الدهون اذ يحفز ارتباط الكوليسترول بنواقل الدهون لتكوين البروتينات الدهنية والتي تنقل الدهون عبر الدورة الدموية وبالتالي تنظيم مستويات الكوليسترول في الدم ، بالإضافة الى ان IL-6 يحفز هدم TG ويسهم في ايض الدهون الفسفورية في الكبد (Ettinger *et al.* ,1994 ; Malagarie-Cazenave *et al.* , 2004) .

اشارت دراسة اجريت من قبل Nishimoto *et al.* , (2004) أن IL-6 يسرع تحلل الدهون ويمنع تصنيعها ، مما يؤدي إلى انخفاض مستويات الدهون في الدم .

و تشير هذه البيانات إلى أن IL-6 يلعب دوراً مهماً في التمثيل الغذائي للدهون و أن حفته في الفئران أدى إلى انخفاض مستويات الكوليسترول الكلي ومستويات TG . (Hashizume *et al.* , 2010)

و وجد Petersen *et al.* ,(2005) إن تركيزات IL-6 في الأنسجة الدهنية أعلى بما يقارب 100 مرة اعلى من تلك الموجودة في البلازما ، مما يشير إلى وجود وظيفة تنظيمية

مهمة في هذا النسيج . بينما اشار (Trujillo *et al.* , 2004) الى ان IL-6 ويزيد من تحلل الدهون في الأنسجة الدهنية والخلايا الشحمية في المختبر .

وبينت الدراسة التي اجريت من قبل (Carpentier & Scruel , 2002) ان لـ IL-6 تأثير إيجابي على نظام معالجة الدهون عبر تنظيم ناقل الكاسيت Cassette ، بروتين يشارك في نقل الدهون ، علاوة على ذلك ، يمكن أن يثبط IL-6 السيتوكينات الالتهابية الأخرى و يعزز IL-6 من هدم LDL-C عن طريق تنظيم تخليق مستقبلات LDL (Reiss *et al.* , 2017).

اشار دراسة اجراها (Hashizume & Mihara , 2011) إلى أن مستويات الدهون ، تتغير في ظل الظروف الالتهابية و لقد ثبت جيداً أن IL-6 يؤثر على ابيض الدهون في الحيوانات والبشر ، و أن حجز او تثبيط IL-6 يزيد من مستويات الدهون في مرضى التهاب المفاصل الروماتويدي.

وبينت الدراسة التي اجراها (Gierens *et al.* , 2000) والتي أجريت على الخلايا الكبدية أن إنترلوكين (IL-1β) ، وعامل نخر الورم الفا (TNFα ، و IL-6) وغيرها من السيتوكينات أثناء الالتهاب يمكن أن تزيد من تعبير خلايا الكبد عن مستقبلات LDL ، اذ يقوم IL-1β و TNFα بذلك عبر آلية تتضمن تعديل محتوى الكوليسترول داخل الخلايا ، بينما يكون تأثير IL-6 في هذا الصدد لا يعتمد على تعديل الكوليسترول .

واثبتت دراسة اجريت من قبل (Wallenius *et al.* , 2002) أن مستويات عالية من TG و VLDL موجودة في الفئران التي تعاني من نقص IL-6 . بينما اشارت الدراسة التي اجراها (Nishimoto *et al.* , 2005) ان الأشخاص الذين يعانون من ارتفاع دهون الدم وبعض الامراض لديهم انتاج غير طبيعي من IL-6

واظهرت نتائج الدراسة الحالية مستويات مرتفعة من IL-6 في المجاميع المعاملة بتراكيز مختلفة من جسيمات الفضة النانوية ومستخلص اوراق نبات المورينغا .

و ثبت أن التعرض لـ AgNP أدى إلى انتاج سيتوكينات التهابية -IL-1 و IL-6 وكذلك TNF-α و يمكن أن ينتج عن التعرض لـ AgNP أنواع الأكسجين التفاعلية داخل الخلايا ROS في خلايا الثدييات ، مع زيادة الإنتاج المرتبط بتلف الخلايا وبدء الاستجابة الالتهابية (AshaRani *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2012).

وأشارت دراسة أجريت من قبل Kim & Ryu, (2013) الى ان الإجهاد التأكسدي في Monocytes إلى جانب إطلاق السيتوكينات الالتهابية هو استجابة وقائية طبيعية و أشارت الأدلة إلى وجود علاقة بين إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية والالتهاب مما أدى إلى تضخيم الاستجابة و يتسبب الإجهاد التأكسدي في التعبير عن السيتوكينات بما في ذلك IL-1 و IL-6 و TNF- α والتي تسهم بدورها في توليد ROS . و ينتج عن هذا حلقة تضخيم بين الإجهاد التأكسدي والالتهاب الذي بدأه التعرض لـ AgNP .

وإدى اعطاء AgNPs بجرعة منخفضة أدى الى استجابات التهابية في الكبد و الكلى و يبدو أن الاستجابات الالتهابية تكون ضعيفة جداً في الكلى لتضعف قدرة الكلى على الترشيح ، بالمقارنة مع السمية المنخفضة نسبياً في الكبد والكلى التي تحددها العوامل الكيميائية الحيوية (Carlson *et al.*, 2008) ، تم تحفيز الاستجابات الالتهابية بشكل كبير عن طريق الإعطاء الفموي لمدة 28 يوماً مع زيادة إنتاج السيتوكين وزيادة توزيع الخلايا البائية وتسلل الخلايا (Folkmann *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009) .



الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations



1 الاستنتاجات :

نستنتج من الدراسة الحالية ما يلي :

1. قدرة الفضة النانوية على تحسين صورة الدهون (الكوليسترول الكلي ، الكليسيريدات الثلاثية ، البروتينات الدهنية عالية الكثافة ، البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة والبروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً) في الدم لدى حيوانات التجربة ، وكان التركيز 10 ملغم / كغم / من وزن الجسم) الأكثر تأثيراً في دهون الدم لدى حيوانات التجربة .
2. إمكانية تحسين المظهر النسجي للكبد والكلى باستخدام بتركيز منخفضة جسيمات الفضة النانوية ، وكان التركيز 10 ملغم / كغم / من وزن الجسم) الأكثر تأثيراً في انسجة الكبد والكلى لدى حيوانات التجربة .
3. استخدام مستخلص أوراق المورينغا أدى الى تحسين مظهر الدهون لدى حيوانات التجربة. وايضاً أدى الى تحسين المظهر النسجي لكل من الكبد والكلى لحيوانات التجربة .
4. الدراسات المناعية النسجية اعطت نتائج اكثر دقة لتشخيص التغيرات المناعية النسجية الحاصلة في كبد وكلى حيوانات التجربة .

بالاعتماد على النتائج نوصي بما يلي :

1. دراسة تأثير تراكيز مختلفة من جسيمات الزنك النانوية في أنسجة الكبد والكلية لحيوانات التجربة (لان الزنك النانوي وبحسب الدراسات الحديثة خالي من السمية مقارنة بجسيمات الفضة النانوية) .
2. دراسة التأثيرات السمية للتراكيز المنخفضة من الفضة النانوية في أنسجة كبد حيوانات التجربة والكلية .
3. دراسة استخدام تراكيز اعلى من (15ملغم / كغم) من جسيمات الفضة لعلاج فرط الكوليسترول لدى حيوانات التجربة ودراسة تأثيراتها السمية ايضاً .
4. استخدام الفضة النانوية في تحميل بعض العقاقير التي تسهم في خفض الكوليسترول ودراسة مدى فعالية الفضة النانوية على توصيل العلاج وتأثيرها على صورة الدهون وفعاليتها في أنسجة الكبد والكلية لدى حيوانات التجربة بالمقارنة مع استخدام العقاقير بدون توصيل بالجسيم النانوي .
5. دراسة تأثير الفضة النانوية على مقاطع نسجية أخرى كالدرقية والدماغ والشرابين والبنكرياس واجزاء من القناة الهضمية .
6. دراسة معايير أخرى من السيتوكينات المناعية مثل (IL-8 و عامل النخر TNF- α) .
7. محاولة دراسة مكونات نبات المورينغا الفاعلة من خلال تشخيص المجاميع الفعالة في علاج فرط الكوليسترول في الدم والانسجة .
8. استخدام بعض المعايير المناعية النسجية لبعض المركبات التي تنتج في الخلايا والانسجة الناتجة عن بعض الامراض كضغط الدم والسكري .



المصادر

References



References

المصادر والمراجع

- Aborhyem, S.,** Ismail, H., Agamy, N., & Tayel, D. (2016). Effect of Moringa oleifera on lipid profile in rats. *Journal of High Institute of Public Health, 46*(1), 8-14.
- Abou El-Nour, K. M.,** Eftaiha, A. A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian journal of chemistry, 3*(3), 135-140.
- Adeyemi, O. S., & Sulaiman, F. A.** (2012). Biochemical and morphological changes in Trypanosoma brucei brucei-infected rats treated with homidium chloride and diminazene aceturate. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology, 23*(4), 179-183.
- Adeyemi, O. S., & Sulaiman, F. A.** (2014). Co-administration of iron sulphate and nitroglycerin promoted oxidative stress and mild tissue damage in Wistar rats. *Comparative Clinical Pathology, 23*(5), 1525-1533.
- Agarwal, R., & Curley, T. M.** (2005). The role of statins in chronic kidney disease. *The American journal of the medical sciences, 330*(2), 69-81.
- Aguila, M. B.,** Pinheiro, A., Parente, L. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver, 23*(5), 363–370.
- Ahmadi, F., & Branch, S.** (2012). Impact of different levels of silver nanoparticles (Ag-NPs) on performance, oxidative enzymes and blood parameters in broiler chicks. *Pakistan Veterinary Journal, 32*(3), 325-328.
- Ahmadi, F.,** Khah, M. M., Javid, S., Zarneshan, A., Akradi, L., & Salehifar, P. (2013). The effect of dietary silver nanoparticles on performance, immune organs, and lipid serum of broiler chickens during starter period. *International Journal of Biosciences, 3*(5), 95-100.
- Akbay, E.;**Ulusu, N.N.;Toruner, F.;Ayvaz, G.; Taneri, F.; Akturk, M.; Arslan, M. and Karasu, C. (2004).Effect of rosiglitazone treatment on the

pentose phosphate pathway and glutathione-dependent enzyme in liver and kidney of rats fed a high fat diet. *Curr Therap Res.* 65(1):79-89.

Akter, M., Sikder, M. T., Rahman, M. M., Ullah, A. A., Hossain, K. F. B., Banik, S., ... & Kurasaki, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of advanced research*, 9, 1-16.

AL-Ani, W. Y. (2012). The Effect of Aqueous Extract of Capparis spinosa Flowers on the Level of Serum Lipids in Rabbits. *Al-Anbar Medical Journal*, 10(2).

Al-Dujaili, A. N. G., & Al-shemeri, M. K. (2016). Effect of Silver Nanoparticles and Rosuvastatin on Lipid Profile in Rats Induced By High Fat-Diet. *research journal of pharmaceutical biological and chemical sciences*, 7(3), 1031-1037.

Al-Faisal, A. H. M. (2008). Genetical and molecular analysis of familial hypercholesteremia disease. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 7(2).

Alharbi, K. K., Kashour, T. S., Al-Hussaini, W., Nbaheen, M. S., Hasanato, R. M., Mohamed, S., ... & Khan, I. A. (2015). Screening for genetic mutations in LDLR gene with familial hypercholesterolemia patients in the Saudi population. *Acta biochimica Polonica*, 62(3).

Ali, A., Akhtar, N., Khan, M. S., Khan, M. T., Ullah, A., & Shah, M. I. (2013). Effect of Moringa oleifera on undesirable skin sebum secretions of sebaceous glands observed during winter season in humans.

Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. F. P. C., & Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*, 20(4), 470-475.

Almatrafi, M. M., Vergara-Jimenez, M., Murillo, A. G., Norris, G. H., Blesso, C. N., & Fernandez, M. L. (2017). Moringa leaves prevent hepatic lipid accumulation and inflammation in guinea pigs by reducing the expression of genes involved in lipid metabolism. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1330.

- Al-Moraie**, M. M., Arafat, R. A., & Al-Rasheedi, A. A. (2013). Effect of pomegranate juice on lipid profile and antioxidant enzymes in hypercholesterolemic rats. *Life Sci. J*, 10(3), 2717-2728.
- Almundarij**, T. I., Zaki, A. K. A., Albarrak, S. M., Alharbi, Y. M., Almuzaini, S. A., & Abo-Aziza, F. A. (2020). Evaluation of the Anti-diabetic Activities of Colored Rice Varieties in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(11), 1424-1433.
- Al-Shamary**, A. K. (2011). Hypercholesterolemia and acute myocardial infarction. *Iraqi journal of community medicine*, 24(2).
- Alshammary**, S. M., & Khaleel, L. W. (2018). Protective role of soybean lecithin in reducing hypercholesterolemia and DNA fragmentation inducing by high cholesterol in adult male rats. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, 9(1).
- Alves-Bezerra**, M., & Cohen, D. E. (2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Compr. Physiol.* 8, 1–8.
- AL-waealy**, L. A. M., & Al-Dujaili, A. D. N. G. (2018). Histological and physiological study of the effect of silver nanoparticles and Omega-3 on Asthma of male mice induced by ovalbumin. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 9(3), 356-362.
- Amenyogbe**, E., Chen, G., Wang, Z., Lu, X., Lin, M., & Lin, A. Y. (2020). A review on sex steroid hormone estrogen receptors in mammals and fish. *International journal of endocrinology*, 2020.
- Amin**, K. A. and Nagy, M. A. (2009). Effect of carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabe Meta Synd. J.* 1: 1-17.
- AshaRani**, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P., & Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano*, 3(2), 279-290.
- Ashe**, B. (2011). *A Detail investigation to observe the effect of zinc oxide and Silver nanoparticles in biological system* (Doctoral dissertation).
- Attia**, A., A. (2014). Evaluation of the testicular alterations induced by Silver nanoparticles in male mice: Biochemical, Histological and

ultrastructural studies, *Res. J. of Pharmac. Biol. And Chem.* 5(4) :1558-1589

Awasthi, K. K., Awasthi, A., Kumar, N., Roy, P., Awasthi, K., & John, P. J. (2013). Silver nanoparticle induced cytotoxicity, oxidative stress, and DNA damage in CHO cells. *Journal of nanoparticle research*, 15(9), 1-12.

Azza, A. (2014). Evaluation of the testicular alterations induced by silver nanoparticles in male mice: biochemical, histological and ultrastructural studies. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 5(4), 1558-1589.

Babin, P. J., & Gibbons, G. F. (2009). The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a “spandrel” of hepatic lipid metabolism. *Progress in lipid research*, 48(2), 73-91.

Baigent, C., Landray, M. J., Reith, C., Emberson, J., Wheeler, D. C., Tomson, C., ... & Sharp Investigators. (2011). The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 377(9784), 2181-2192.

Bakand, S., & Hayes, A. (2016). Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 929.

Ballantyne, C. M. (2015). *Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease E-Book*. Elsevier Health Sciences.

Bancroft, J. D. (2013). *Histochemical techniques*. Butterworth-Heinemann.

BarathManiKanth, S., Kalishwaralal, K., Sriram, M., Pandian, S. R. K., Youn, H. S., Eom, S., & Gurunathan, S. (2010). Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *Journal of nanobiotechnology*, 8(1), 1-15.

Björling, E., & Uhlén, M. (2008). Antibodypedia, a portal for sharing antibody and antigen validation data. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(10), 2028-2037.

Blind, C., Koepenik, A., Pacyna-Gengelbach, M., Fernahl, G., Deutschmann, N., Dietel, M., ... & Petersen, I. (2008). Antigenicity testing by

immunohistochemistry after tissue oxidation. *Journal of clinical pathology*, 61(1), 79-83.

Bordeaux, J., Welsh, A. W., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M. T., Hanna, J. A., ... & Rimm, D. L. (2010). Antibody validation. *Biotechniques*, 48(3), 197-209.

Botchlett, R., & Wu, C. (2018). Diet composition for the management of obesity and obesity-related disorders. *Journal of diabetes mellitus and metabolic syndrome*, 3, 10.

Boverhof, D. R., Bramante, C. M., Butala, J. H., Clancy, S. F., Lafranconi, M., West, J., & Gordon, S. C. (2015). Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 137-150.

Buchwalow, I. B., & Böcker, W. (2010). Immunohistochemistry. *Basics and Methods*, 1, 1-149.

Burdus, A. C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., Mogoantă, L., Fikai, A., & Andronescu, E. (2018). Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials*, 8(9), 681.

Burham, B. (2017). Phytochemical, proximate composition and minerals contents of. *Moringa oleifera Chemistry Research Journal*, 2(2), 78-83.

Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The journal of physical chemistry B*, 112(43), 13608-13619.

Carpentier, Y. A., & Scruel, O. (2002). Changes in the concentration and composition of plasma lipoproteins during the acute phase response. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5(2), 153-158.

Cattoretti, G., Pileri, S., Parravicini, C., Becker, M. H., Poggi, S., Bifulco, C., ... & Rilke, F. (1993). Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *The Journal of pathology*, 171(2), 83-98.

- Charoensin, S.** (2014). Antioxidant and anticancer activities of *Moringa oleifera* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(7), 318-325.
- Chatterjea, M. N., & Shinde, R.** (2011). *Textbook of medical biochemistry*. Wife Goes On.
- Chaudhary, K., & Chaurasia, S.** (2017). Neutraceutical properties of *Moringa oleifera*: a review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4(4), 646-655.
- Chávez-Santoscoy, R. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O.** (2013). Effect of flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats as cholesterol micelle disruptors. *Plant foods for human nutrition*, 68(4), 416-423.
- Chen, Y., Deb, D. K., Fu, X., Yi, B., Liang, Y., Du, J., ... & Li, Y. C.** (2019). ATP-citrate lyase is an epigenetic regulator to promote obesity-related kidney injury. *The FASEB Journal*, 33(8), 9602-9615.
- Cheong, S. H., Kim, M. Y., Sok, D. E., Hwang, S. Y., Kim, J. H., Kim, H. R., ... & Kim, M. R.** (2010). Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(1), 34-40
- Choi, J. E., Kim, S., Ahn, J. H., Youn, P., Kang, J. S., Park, K., ... & Ryu, D. Y.** (2010). Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 100(2), 151-159.
- Christy, A. J., & Umadevi, M.** (2012). Synthesis and characterization of monodispersed silver nanoparticles. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3(3), 035013.
- Chtourou, Y., Kamoun, Z., Zarrouk, W., Kebieche, M., Kallel, C., Gdoura, R., & Fetoui, H.** (2016). Naringenin ameliorates renal and platelet purinergic signalling alterations in high-cholesterol fed rats through the suppression of ROS and NF-κB signaling pathways. *Food & function*, 7(1), 183-193.
- Chun, M. R., Lee, Y. J., Kim, K. H., Kim, Y. W., Park, S. Y., Lee, K. M., ... & Park, Y. K.** (2010). Differential effects of high-carbohydrate and high-

fat diet composition on muscle insulin resistance in rats. *Journal of Korean medical science*, 25(7), 1053.

- Clayton, P.** (1998). *Disorders of cholesterol biosynthesis*. BMJ Group.
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N.** (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 47(2), 200-202.
- Crook, M. A.** (2012). *Clinical biochemistry and metabolic medicine*. London: Hodder Arnold.
- Culig, Z., Steiner, H., Bartsch, G., & Hobisch, A.** (2005). Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *Journal of cellular biochemistry*, 95(3), 497-505.
- D'Amico, F., Skarmoutsou, E., & Stivala, F.** (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of immunological methods*, 341(1-2), 1-18.
- David, O. M., Ogunmoroti, O., Ajayi, O., Eleyode, V., Ogunniran, A., Adegbuyi, T. A., & Famurewa, O.** (2017). A review of biological and therapeutic activities of *Moringa oleifera* Linn. *J Mod Drug Discov Drug Deliv Res*, 4(3), 1-13.
- De Nigris, F., Mancini, F. P., Balestrieri, M. L., Byrns, R., Fiorito, C., Williams-Ignarro, S., ... & Napoli, C.** (2008). Therapeutic dose of nebivolol, a nitric oxide-releasing β -blocker, reduces atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Nitric Oxide*, 19(1), 57-63.
- De Vries, A. L., McGuire, J. K., Steensma, T. D., Wagenaar, E. C., Doreleijers, T. A., & Cohen-Kettenis, P. T.** (2014). Young adult psychological outcome after puberty suppression and gender reassignment. *Pediatrics*, 134(4), 696-704.
- DiPiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey, L.** (2017). *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, 10e. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 10e. *New York: McGraw-Hill Education*, 255-8.
- Donath, M. Y., Böni-Schnetzler, M., Ellingsgaard, H., Halban, P. A., & Ehses, J. A.** (2010). Cytokine production by islets in health and diabetes:

cellular origin, regulation and function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(5), 261-267.

Donner, A. (2010). Nanotechnology in molecular medicine. *Trends in molecular medicine*, 16(12), 551-552.

Dowman, J. K., Tomlinson, J. W., & Newsome, P. N. (2010). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: An International Journal of Medicine*, 103(2), 71-83.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., ... & Latz, E. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464(7293), 1357-1361.

Duran, N., Durán, M., De Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., & Nakazato, G. (2016). Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3), 789-799.

Edwards-Jones, V. (2009). The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Letters in applied microbiology*, 49(2), 147-152.

El Rabey, H. A., Khan, J. A., Sakran, M. I., & Al-Ghamdi, M. A. (2018). The Antioxidant Activity of Low Doses of Moringa Seeds (*Moringa oleifera* Lam.) in Hypercholesterolemic Male Rats. *Reactive Oxygen Species*, 6(17), 363-370.

Emoto, K., Yamashita, S., & Okada, Y. (2005). Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: does pH or ionic strength of the solution play a role for refolding antigens. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(11), 1311-1321.

Ettinger, W. H., Varma, V. K., Sorci-Thomas, M., Parks, J. S., Sigmon, R. C., Smith, T. K., & Verdery, R. B. (1994). Cytokines decrease apolipoprotein accumulation in medium from Hep G2 cells. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, 14(1), 8-13.

- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S., & Lead, J. R. (2011).** Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment international*, 37(2), 517-531.
- Fadeev, N. O. (2018).** *β-cyclodextrin polymers as cholesterol sequestering agents* (Master's thesis, UiT Norges arktiske universitet).
- Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., & Bahouth, S. W. (2004).** Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*, 145(5), 2273-2282.
- Farnaghi, S. (2017).** *Role of hypercholesterolemia in osteoarthritis development* (Doctoral dissertation, Queensland University of Technology).
- Fassati, P., & Principe, L. (1982).** Enzymatic colorimetric method for the determination of triglycerides. *Clin. Chem*, 28, 2077.
- Folkmann, J. K., Risom, L., Jacobsen, N. R., Wallin, H., Loft, S., & Møller, P. (2009).** Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environmental health perspectives*, 117(5), 703-708.
- Fombang, E. N., & Saa, R. W. (2016).** Antihyperglycemic activity of Moringa oleifera Lam leaf functional tea in rat models and human subjects. *Food and Nutrition Sciences*, 7(11), 1020.
- Fowler, C. B., Evers, D. L., O'Leary, T. J., & Mason, J. T. (2011).** Antigen retrieval causes protein unfolding: evidence for a linear epitope model of recovered immunoreactivity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(4), 366-381.
- Fox, J. G. (2015).** *Laboratory animal medicine*. Elsevier.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972).** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*, 18(6), 499-502.

- Gai, K.**, Okondo, M. C., Rao, S. D., Chui, A. J., Ball, D. P., Johnson, D. C., & Bachovchin, D. A. (2019). DPP8/9 inhibitors are universal activators of functional NLRP1 alleles. *Cell death & disease*, 10(8), 1-10.
- Gaidt, M. M.**, Ebert, T. S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J. L., Rapino, F., ... & Hornung, V. (2016). Human monocytes engage an alternative inflammasome pathway. *Immunity*, 44(4), 833-846.
- Garcia, T. X.**, Costa, G. M., França, L. R., & Hofmann, M. C. (2014). Sub-acute intravenous administration of silver nanoparticles in male mice alters Leydig cell function and testosterone levels. *Reproductive Toxicology*, 45, 59-70.
- Garrett, R. H.**, & Grisham, C. M. (2010). Glycolysis. *Biochemistry*, 535-562.
- Geraldo, D. A.**, Needham, P., Chandia, N., Arratia-Perez, R., Mora, G. C., & Villagra, N. A. (2016). Green synthesis of polysaccharides-based gold and silver nanoparticles and their promissory biological activity.
- Ghasi, S.**, Nwobodo, E., & Ofili, J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed Wistar rats. *Journal of ethnopharmacology*, 69(1), 21-25.
- Gierens, H.**, Nauck, M., Roth, M., Schinker, R., Schürmann, C., Scharnagl, H., ... & März, W. (2000). Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(7), 1777-1783.
- Gonder-Frederick, L.**, Zrebiec, J., Bauchowitz, A., Lee, J., Cox, D., Ritterband, L., ... & Clarke, W. (2008). Detection of hypoglycemia by children with type 1 diabetes 6 to 11 years of age and their parents: a field study. *Pediatrics*, 121(3), e489-e495.
- Gopalakrishnan, L.**, Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food science and human wellness*, 5(2), 49-56.
- Gotto Jr, A. M.**, & Moon, J. (2010). Pitavastatin for the treatment of primary hyperlipidemia and mixed dyslipidemia. *Expert review of cardiovascular therapy*, 8(8), 1079-1090.

- Greenwell, A., Foley, J. F., & Maronpot, R. R.** (1993). Detecting proliferating cell nuclear antigen in archival rodent tissues. *Environmental health perspectives, 101*(suppl 5), 207-209.
- Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Bairey Merz, C. N., Brewer, H. B., Clark, L. T., Hunninghake, D. B., ... & Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program.** (2004). Implications of recent clinical trials for the national cholesterol education program adult treatment panel III guidelines. *Journal of the American College of Cardiology, 44*(3), 720-732.
- Gunstone, F. D., & Harwood, J. L.** (2007). *The lipid handbook with CD-ROM*. CRC press.
- Guyton, A., & Hall, J.** (2006). Textbook of medical physiology, 11th.
- Hansson, G. K.** (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine, 352*(16), 1685-1695.
- Harisa, G. I., Attia, S. M., & Abd Allah, G. M.** (2016). Natural Cholesterol Busters. *Cholesterol Lowering Therapies and Drugs, 1*.
- Harvey, R. A., & Ferrier, D. R.** (2011). Biochemistry (Lippincott's illustrated reviews series) 5th.
- Hashim, A. A. (Ed.).** (2012). *The delivery of nanoparticles*. BoD—Books on Demand.
- Hashizume, M., & Mihara, M.** (2011). IL-6 and lipid metabolism. *Inflammation and regeneration, 31*(3), 325-333.
- Hashizume, M., Yoshida, H., Koike, N., Suzuki, M., & Mihara, M.** (2010). Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Annals of the Rheumatic Diseases, 69*(4), 741-746. Maria
- Hegde, S., & Hegde, V.** (2013). An overview of Moringa production in Ethiopia. *Int. J. Sci. Res, 4*, 826-829.
- Hendi, A.** (2011). Silver nanoparticles mediate differential responses in some of liver and kidney functions during skin wound healing. *Journal of King Saud University-Science, 23*(1), 47-52.

- Henegar, J. R.,** Bigler, S. A., Henegar, L. K., Tyagi, S. C., & Hall, J. E. (2001). Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(6), 1211-1217.
- Henriksen, B. S.,** Curtis, M. E., Fillmore, N., Cardon, B. R., Thomson, D. M., & Hancock, C. R. (2013). The effects of chronic AMPK activation on hepatic triglyceride accumulation and glycerol 3-phosphate acyltransferase activity with high fat feeding. *Diabetology & metabolic syndrome*, 5(1), 1-11.
- Hosseini, E.,** & Bahrami, A. M. (2013). Aqueous Extract of Glycyrrhiza glabrous can induce Biochemical and Histopathological disorders on the Liver of Rats. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 2(7), 06-10.
- Huang, C.,** & Freter, C. (Eds.). (2016). *Cholesterol Lowering Therapies and Drugs*. BoD–Books on Demand.
- Isoda, K.,** Sawada, S., Ayaori, M., Matsuki, T., Horai, R., Kagata, Y., ... & Ohsuzu, F. (2005). Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist deteriorates fatty liver and cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 7002-7009.
- James, I.** (2001). Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III).
- Jenner, A.,** Ren, M., Rajendran, R., Ning, P., Huat, B. T. K., Watt, F., & Halliwell, B. (2007). Zinc supplementation inhibits lipid peroxidation and the development of atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(4), 559-566.
- Ji, J. H.,** Jung, J. H., Kim, S. S., Yoon, J. U., Park, J. D., Choi, B. S., ... & Yu, I. J. (2007). Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation toxicology*, 19(10), 857-871.
- Jiang, J.,** Nilsson-Ehle, P., & Xu, N. (2006). Influence of liver cancer on lipid and lipoprotein metabolism. *Lipids in health and disease*, 5(1), 1-7.

- Jiang, X., Wang, F., Wang, Y., Gisterå, A., Roy, J., Paulsson-Berne, G., ... & Yan, Z. Q.** (2019). Inflammasome-driven interleukin-1 α and interleukin-1 β production in atherosclerotic plaques relates to hyperlipidemia and plaque complexity. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(3), 304-317.
- Johnson, I., & Prabu, H. J.** (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles by leaf extracts of *Cycas circinalis*, *Ficus amplissima*, *Commelina benghalensis* and *Lippia nodiflora*. *International nano letters*, 5(1), 43-51.
- Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V.** (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 328-346.
- Jordan, R. C., Daniels, T. E., Greenspan, J. S., & Regezi, J. A.** (2002). Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part II: Immunohistochemical and immunofluorescent methods. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 93(1), 56-74.
- Jorkesh, R., Naghsh, N., & Mashayekh, A. M.** (2016). Comparing the effects of silver nanoparticles as well as Roaccutane on lipids and plasma lipoprotein of Wistar male rats. *international journal of advanced biotechnology and research*, 7, 123-128.
- Jyoti, K., Baunthiyal, M., & Singh, A.** (2016). Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(3), 217-227.
- Kabiraj, A., Gupta, J., Khaitan, T., & Bhattacharya, P. T.** (2015). Principle and techniques of immunohistochemistry—a review. *Int J Biol Med Res*, 6(3), 5204-5210.
- Kalappurayil, T. M., & Joseph, B. P.** (2017). A review of pharmacognostical studies on *Moringa oleifera* lam. flowers. *Pharmacognosy Journal*, 9(1).

- Kamari, Y., Shaish, A., Vax, E., Shemesh, S., Kandel-Kfir, M., Arbel, Y., ... & Harats, D.** (2011). Lack of interleukin-1 α or interleukin-1 β inhibits transformation of steatosis to steatohepatitis and liver fibrosis in hypercholesterolemic mice. *Journal of hepatology*, 55(5), 1086-1094.
- Kambizi, L., Bakare-Odunola, M. T., Oladiji, A. T., Kola-Mustapha, A. T., Amusa, T. O., Atolani, O., ... & Quadri, A. L.** (2017). Proteinease inhibition, membrane stabilization, antioxidant and phytochemical evaluations of leaves, seeds and calyces of four selected edible medicinal plants. *Cogent Chemistry*, 3(1), 1314064.
- Karim, N. A. A., Ibrahim, M. D., Kntayya, S. B., Rukayadi, Y., Hamid, H. A., & Razis, A. F. A.** (2016). Moringa oleifera Lam targeting chemoprevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(8), 3675-3686.
- Karthika, S., Ravishankar, M., Mariajancyrani, J., & Chandramohan, G.** (2013). Study on phytoconstituents from Moringa oleifera leaves. *Asian journal of plant science and research*, 3(4), 63-69.
- Kasiske, B. L., O'Donnell, M. P., Schmitz, P. G., Kim, Y., Keane, W. F., Daniels, F., & Holden, G.** (1990). Renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Kidney international*, 37(3), 880-891.
- Kellner-Weibel, G., Geng, Y. J., & Rothblat, G. H.** (1999). Cytotoxic cholesterol is generated by the hydrolysis of cytoplasmic cholesteryl ester and transported to the plasma membrane. *Atherosclerosis*, 146(2), 309-319.
- Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S.** (2016). Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *Journal of pathology and translational medicine*, 50(6), 411.
- Kim, S., & Choi, I. H.** (2012). Phagocytosis and endocytosis of silver nanoparticles induce interleukin-8 production in human macrophages. *Yonsei medical journal*, 53(3), 654.
- Kim, S., & Ryu, D. Y.** (2013). Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *Journal of applied toxicology*, 33(2), 78-89.

- Kim, Y. S., Kim, J. S., Cho, H. S., Rha, D. S., Kim, J. M., Park, J. D., ... & Yu, I. J.** (2008). Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation toxicology*, 20(6), 575-583.
- Kim, Y. S., Song, M. Y., Park, J. D., Song, K. S., Ryu, H. R., Chung, Y. H., ... & Yu, I. J.** (2010). Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 1-11.
- Kirkpatrick, L. A.** (2015). *A Simple Guide to IBM SPSS Statistics-Version 23.0*. Cengage Learning.
- Kishida, T., Nogami, H., Ogawa, H., & Ebihara, K.** (2002). The hypocholesterolemic effect of high amylose cornstarch in rats is mediated by an enlarged bile acid pool and increased fecal bile acid excretion, not by cecal fermented products. *The Journal of nutrition*, 132(9), 2519-2524.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., & Taga, T.** (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *The Journal of The American Society of Hematology*. 1243-1254
- Kolawole, O. T., Kolawole, S. O., Ayankunle, A. A., & Olaniran, I. O.** (2012). Methanol leaf extract of *Persea americana* protects rats against cholesterol-induced hyperlipidemia. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 235-242.
- Koolman, J., & Röhm, K. H.** (2005). *Color atlas of biochemistry*. Thieme Stuttgart .
- Koul, B., & Chase, N.** (2015). *Moringa oleifera* Lam.: Panacea to several maladies. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(6), 687-707.
- Kulkarni, S. S., Basavraj, S., Kadakol, G. S., Vandana, T., Markande, A., Sindhoor, J., ... & Gai, P. B.** (2011). Mutation analysis of the LDL receptor gene in Indian families with familial hypercholesterolemia. *Asian Journal of Medical Sciences*, 2(2), 82-86.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Aster, J. C. (2014).** *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book*. Elsevier health sciences.
- Kumar, V., Guleria, P., Kumar, V., & Yadav, S. K. (2013).** Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in *Arabidopsis thaliana*. *Science of the total environment*, 461, 462-468.
- Kume, S., Uzu, T., Araki, S. I., Sugimoto, T., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., ... & Koya, D. (2007).** Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(10), 2715-2723.
- Lavoie, J. M., & Gauthier, M. S. (2006).** Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(12), 1393-1409.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015).** Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12791-12835.
- Lewis, G. F., & Rader, D. J. (2005).** New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation research*, 96(12), 1221-1232.
- Lim, D. H., Jang, J., Kim, S., Kang, T., Lee, K., & Choi, I. H. (2012).** The effects of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on inflammatory and stress genes in human macrophages using cDNA microarray analysis. *Biomaterials*, 33(18), 4690-4699.
- Lin, F., Shen, T., & Prichard, J. W. (2005).** Detection of Her-2/neu oncogene in breast carcinoma by chromogenic in situ hybridization in cytologic specimens. *Diagnostic cytopathology*, 33(6), 376-380.
- Lindskog, M., Rockberg, J., Uhlén, M., & Sterky, F. (2005).** Selection of protein epitopes for antibody production. *Biotechniques*, 38(5), 723-727.
- Liu, H., Yang, D., Yang, H., Zhang, H., Zhang, W., Fang, Y., ... & Xi, Z. (2013).** Comparative study of respiratory tract immune toxicity induced by three

sterilisation nanoparticles: silver, zinc oxide and titanium dioxide. *Journal of hazardous materials*, 248, 478-486.

- Lopes-Virella, M. F., Stone, P., Ellis, S., & Colwell, J. A. (1977).** Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clinical chemistry*, 23(5), 882-884.
- Lotfi, A., Aghdam, E. G., & Narimani-Rad, M. (2017).** Effect of chemically-synthesized silver nanoparticles (ag-np) on glycemic and lipidemic status in rat model. In *CMBEBIH 2017* (pp. 158-163). Springer, Singapore.
- Lye, S. H., Chahil, J. K., Bagali, P., Alex, L., Vadivelu, J., Ahmad, W. A. W., ... & Mohamed, R. (2013).** Genetic polymorphisms in LDLR, APOB, PCSK9 and other lipid related genes associated with familial hypercholesterolemia in Malaysia. *PloS one*, 8(4), e60729.
- Mabuchi, K., Fraser, T. H., Song, H., Azuma, Y., & Nishida, M. (2014).** Revision of the systematics of the cardinalfishes (Percomorpha: Apogonidae) based on molecular analyses and comparative reevaluation of morphological characters. *Zootaxa*, 3846(2), 151-203.
- MacDonald, R. G., & Chaney, W. G. (2007).** *USMLE road map, biochemistry*. New York: McGraw-Hill.
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019).** An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Biobanking*, 289-298.
- Malagarie-Cazenave, S., Ségui, B., Lévêque, S., Garcia, V., Carpentier, S., Altié, M. F., ... & Levade, T. (2004).** Role of FAN in tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide-induced interleukin-6 secretion and lethality in D-galactosamine-sensitized mice. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18648-18655.
- Manish, K.; Aditi, K.; Renu, A.; Gajraj, S. and Rooman, M.(2011).** Anti-obesity property of hexan extract from the leaves of *Gymnema sylvestre* in high fed cafeteria diet induce obesity rats. *Int Res Pharm.* 2(8):112-116.

- Manna, P., & Jain, S. K.** (2015). Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic syndrome and related disorders*, 13(10), 423-444.
- Mannock, D. A., Benesch, M. G., Lewis, R. N., & McElhaney, R. N.** (2015). A comparative calorimetric and spectroscopic study of the effects of cholesterol and of the plant sterols β -sitosterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(8), 1629-1638.
- Mansouri, R. M., Bauge, E., Staels, B., & Gervois, P.** (2008). Systemic and distal repercussions of liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor- α control of the acute-phase response. *Endocrinology*, 149(6), 3215-3223.
- Marí, M., Caballero, F., Colell, A., Morales, A., Caballeria, J., Fernandez, A., ... & García-Ruiz, C.** (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF-and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell metabolism*, 4(3), 185-198.
- Martin, H. L., & Teismann, P.** (2009). Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease. *The FASEB journal*, 23(10), 3263-3272.
- Masih, L. P., Singh, S., Elamathi, S., Anandhi, P., & ABRAHAM, T.** (2019, September). Moringa: A multipurpose potential crop—A review. In *Proc Indian Natn Sci Acad* (Vol. 85, No. 3, pp. 589-601).
- Maynard, A. D., Aitken, R. J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdörster, G., ... & Warheit, D. B.** (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 444(7117), 267-269.
- McClain, C. J., Barve, S., & Deaciuc, I.** (2007). Good fat/bad fat. *American Association for the Study of Liver Diseases*. 10.1002.21788
- Mehta, K., Balaraman, R., Amin, A. H., Bafna, P. A., & Gulati, O. D.** (2003). Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of ethnopharmacology*, 86(2-3), 191-195.

- Mihara**, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Shiina, M. (2012). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science*, 122(4), 143-159.
- Moorhead**, J. F., El-Nahas, M., Chan, M. K., & Varghese, Z. (1982). Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *The Lancet*, 320(8311), 1309-1311.
- Moschen**, A. R., Molnar, C., Geiger, S., Graziadei, I., Ebenbichler, C. F., Weiss, H., ... & Tilg, H. (2010). Anti-inflammatory effects of excessive weight loss: potent suppression of adipose interleukin 6 and tumour necrosis factor α expression. *Gut*, 59(9), 1259-1264.
- Mustad**, V. A., Etherton, T. D., Cooper, A. D., Mastro, A. M., Pearson, T. A., Jonnalagadda, S. S., & Kris-Etherton, P. M. (1997). Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women. *Journal of lipid research*, 38(3), 459-468.
- Myant**, N. B. (1981). *The biology of cholesterol and related steroids*. London: Heinemann Medical Books.
- Nagle**, C. A., Klett, E. L., & Coleman, R. A. (2009). Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *Journal of lipid research*, 50, S74-S79.
- Nakane**, P. K. (1968). Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16(9), 557-560.
- Nel**, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627.
- Nelson**, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of biochemistry*.
- Nilsson**, P., Paavilainen, L., Larsson, K., Ödling, J., Sundberg, M., Andersson, A. C., ... & Uhlen, M. (2005). Towards a human proteome atlas: high-throughput generation of mono-specific antibodies for tissue profiling. *Proteomics*, 5(17), 4327-4337.

- Nishimoto, N., Kanakura, Y., Aozasa, K., Johkoh, T., Nakamura, M., Nakano, S.,... & Kishimoto, T. (2005).** Humanized anti–interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood*, *106*(8), 2627-2632.
- Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., ... & Kishimoto, T. (2004).** Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti–interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *50*(6), 1761-1769.
- Nold, M. F., Nold-Petry, C. A., Zepp, J. A., Palmer, B. E., Bufler, P., & Dinarello, C. A. (2010).** IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nature immunology*, *11*(11), 1014-1022.
- Nov, O., Shapiro, H., Ovadia, H., Tarnovscki, T., Dvir, I., Shemesh, E., ... & Rudich, A. (2013).** Interleukin-1 β regulates fat-liver crosstalk in obesity by auto-paracrine modulation of adipose tissue inflammation and expandability. *PloS one*, *8*(1), e53626.
- O’Hurley, G., Sjöstedt, E., Rahman, A., Li, B., Kampf, C., Pontén, F., ... & Lindskog, C. (2014).** Garbage in, garbage out: a critical evaluation of strategies used for validation of immunohistochemical biomarkers. *Molecular oncology*, *8*(4), 783-798.
- Obied-Yaseen, Y. (2005).** Prevalence of hypercholestrolemia among patients in missan governorate. *The Medical Journal of Basrah University*, *23*(2), 51-53.
- Oladeji, B. S., Akanbi, C. T., & Gbadamosi, S. O. (2017).** Effects of fermentation on antioxidant properties of flours of a normal endosperm and quality protein maize varrieties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *11*(3), 1148-1158.
- Omodanisi, E. I., Aboua, Y. G., & Oguntibeju, O. O. (2017).** Assessment of the anti-hyperglycaemic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Moringa oleifera* in diabetes-induced nephrotoxic male wistar rats. *Molecules*, *22*(4), 439.

- Omolaso, B., Adegbite, O. A., Seriki, S. A., & Ndukwe, I. I.** (2016). Effects of *Moringa oleifera* on blood pressure and blood glucose level in healthy humans. *British Journal of Medical and Health Research*, 3(6), 21-34.
- Orisakwe, O. E., Husaini, D. C., & Afonne, O. J.** (2004). Testicular effects of sub-chronic administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract in rats. *Reproductive Toxicology*, 18(2), 295-298.
- Özkan, Ö., & Pekkaya, S.** (2018). Normal values of biochemical parameters in serum of New Zealand White Rabbits. *studies*, 4, 8.
- Panyala, N. R., Peña-Méndez, E. M., & Havel, J.** (2008). Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?. *Journal of applied biomedicine*, 6(3).
- Papadakis, M. A., McPhee, S. J., & Rabow, M. W.** (2013). CURRENT Medical Diagnosis & Treatment Fifty Second Edition.
- Parasuraman, S.;Kumar, E.P.; Kumar, A.and Emerson, S.F.** (2010). Antihyperlipidemic Effect Of Triglyze, A Polyherbal Formulation. *Int J Pharmacy Pharm Sci.* 2(3):118-122.
- Park, E. J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., & Park, K.** (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in vitro*, 24(3), 872-878.
- Park, E. J., Yoon, J., Choi, K., Yi, J., & Park, K.** (2009). Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology*, 260(1-3), 37-46.
- Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., & Santanam, N.** (2010). Oxidized low-density lipoprotein. *Free Radicals and Antioxidant Protocols*, 403-417.
- Patel, S., Thakur, A. S., Chandy, A., & Manigauha, A.** (2010). *Moringa oleifera*: a review of there medicinal and economical importance to the health and nation. *Drug invention today*, 2(7), 339-342.
- Paula, P. C., Sousa, D. O., Oliveira, J. T., Carvalho, A. F., Alves, B. G., Pereira, M. L., ... & Vasconcelos, I. M.** (2017). A protein isolate from *Moringa oleifera* leaves has hypoglycemic and antioxidant effects in alloxan-induced diabetic mice. *Molecules*, 22(2), 271.

- Pawaskar, S. M., & KC, S. (2017).** Preliminary phytochemical and invitro-antioxidant and analysis of moringa oleifera lam. leaf extract.
- Petersen, E. W., Carey, A. L., Sacchetti, M., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Febbraio, M. A., & Pedersen, B. K. (2005).** Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 288(1), E155-E162.
- Pourkhalili, N., Hosseini, A., Nili-Ahmadabadi, A., Hassani, S., Pakzad, M., Baeeri, M., ... & Abdollahi, M. (2011).** Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats. *World journal of diabetes*, 2(11), 204.
- Prasad, K. (2007).** A study on regression of hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by flax lignan complex. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 12(4), 304-313.
- Prioleau, J., & Schnitt, S. J. (1995).** p53 antigen loss in stored paraffin slides. *New England Journal of Medicine*, 332(22), 1521-1522.
- Qureshi, S., & Solanki, H. (2015).** 7. Moringa oleifera lam. _ a wonder plant curing multiple ailments_ its phytochemistry and its pharmacological applications by shirin qureshi and hitesh solanki. *International research journal of chemistry*, 11, 64-to.
- Rafiq, S., Ahmed, N., Soutar, A., & Qamar, R. (2011).** The genetic characterization of familial hypercholesterolemia in Pakistan. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 7(1).
- Ragab, S. M., Abd Elghaffar, S. K., El-Metwally, T. H., Badr, G., Mahmoud, M. H., & Omar, H. M. (2015).** Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids in health and disease*, 14(1), 1-11.
- Rahman, M. J., Ambigaipalan, P., & Shahidi, F. (2018).** Biological Activities of Camelina and Sophia Seeds Phenolics: Inhibition of LDL Oxidation, DNA Damage, and Pancreatic Lipase and α -Glucosidase Activities. *Journal of food science*, 83(1), 237-245.

- Ramos-Vara, J. A.** (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*, 42(4), 405-426.
- Ramos-Vara, J. A.** (2011). Principles and methods of immunohistochemistry. *Drug Safety Evaluation*, 83-96.
- Razavian, M. H., & Masaimanesh, M.** (2014). Ingestion of silver nanoparticles leads to changes in blood parameters. *Nanomedicine Journal*, 1(5), 339-345.
- Reiss, A. B., Siegart, N. M., & De Leon, J.** (2017). Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective. *Clinical Lipidology*, 12(1), 14-23.
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., ... & Glynn, R. J.** (2017). Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *New England journal of medicine*, 377(12), 1119-1131.
- Riehan, A., & Al-Amili, W. A.** (2018). Genetic Polymorphisms SNP (rs5925) of LDLR Gene Associated with Familial Hypercholesterolemia in Iraqi Patients. *Iraqi journal of biotechnology*, 17(2).
- Rigotti, A., Miettinen, H. E., & Krieger, M.** (2003). The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocrine reviews*, 24(3), 357-387.
- Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., & Weil, P. A.** (2018). *Harper's illustrated biochemistry*. New York (NY): McGraw-Hill Education.
- Sacks, F. M., Lichtenstein, A. H., Wu, J. H., Appel, L. J., Creager, M. A., Kris-Etherton, P. M., ... & Van Horn, L. V.** (2017). Dietary fats and cardiovascular disease: a presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation*, 136(3), e1-e23.
- Saini, R. K., Sivanesan, I., & Keum, Y. S.** (2016). Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech*, 6(2), 1-14.
- Saleh-Alkarim & Ghadeer Alrefai** (2015) . Immunohistochemistry Technique .

- Salerno, G. G.,** Burton, M. R., Oppenheimer, C., Caltabiano, T., Randazzo, D., Bruno, N., & Longo, V. (2009). Three-years of SO₂ flux measurements of Mt. Etna using an automated UV scanner array: Comparison with conventional traverses and uncertainties in flux retrieval. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 183(1-2), 76-83.
- Sanjay, P., & Dwivedi, K. N.** (2015). Shingru (*Moringa oleifera* Lam.): A critical review. *International Journal of Ayurveda and Pharmaceutical Chemistry*, 3(1), 217-227.
- Saper, C. B.** (2009). A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57(1), 1-5.
- Sardari, R. R. R.,** Zarchi, S. R., Talebi, A., Nasri, S., Imani, S., Khoradmehr, A., & Sheshde, S. A. R. (2012). Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *African Journal of Microbiology Research*, 6(27), 5587-5593.
- Sarwar, N.,** Danesh, J., Eiriksdottir, G., Sigurdsson, G., Wareham, N., Bingham, S., ... & Gudnason, V. (2006). Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*, 115(4), 450-458.
- Sauter, G., & Mirlacher, M.** (2002). Tissue microarrays for predictive molecular pathology.
- Schacht, V., & Kern, J. S.** (2015). Basics of immunohistochemistry. *The Journal of investigative dermatology*, 135(3), e30.
- Schwimmer, J. B.,** Pardee, P. E., Lavine, J. E., Blumkin, A. K., & Cook, S. (2008). CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation*, 118(3), 277-283.
- Sethupathy, S.,** Elanchezhian, C., Vasudevan, K., & Rajagopal, G. (2002). Antiatherogenic effect of taurine in high fat diet fed rats.
- Sheedy, F. J.,** Grebe, A., Rayner, K. J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S. B., ... & Moore, K. J. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature immunology*, 14(8), 812-820.

- Shi, S. R., Key, M. E., & Kalra, K. L.** (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39(6), 741-748.
- Singh, B., Yadav, A. L., & Meena, A. K.** (2017). A Study on Foliar Feeding of GA3 and NAA on Vegetative Growth and Yield of Phalsa (*Grewia Subinaequalis* DC). *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6, 768-775.
- Singh, P., Kim, Y. J., Singh, H., Wang, C., Hwang, K. H., Farh, M. E. A., & Yang, D. C.** (2015). Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 10, 2567.
- Sintubin, L., Verstraete, W., & Boon, N.** (2012). Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(10), 2422-2436.
- Smith, S. C., Allen, J., Blair, S. N., Bonow, R. O., Brass, L. M., Fonarow, G. C., ... & Taubert, K. A.** (2006). AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(10), 2130-2139.
- Soccio, R. E., & Breslow, J. L.** (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(7), 1150-1160.
- Sodamade, A., Owonikoko, A. D., & Owoyemi, D. S.** (2017). Nutrient contents and mineral composition of *Moringa oleifera* seed. *Int. J. Chem. Stds*, 5(2), 205-207.
- Stapleton, P. A., Goodwill, A. G., James, M. E., Brock, R. W., & Frisbee, J. C.** (2010). Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *Journal of inflammation*, 7(1), 1-10.
- Straniero, S., Laskar, A., Savva, C., Härdfeldt, J., Angelin, B., & Rudling, M.** (2020). Of mice and men: murine bile acids explain species differences

in the regulation of bile acid and cholesterol metabolism [S]. *Journal of lipid research*, 61(4), 480-491.

Su, H. L., Chou, C. C., Hung, D. J., Lin, S. H., Pao, I. C., Lin, J. H., ... & Lin, J. J. (2009). The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. *Biomaterials*, 30(30), 5979-5987.

Sujatha, B. K., & Patel, P. (2017). Moringa Oleifera–Nature’s Gold. *Imperial J Interdisciplinary Res*, 3(5), 1175-1179.

Sulaiman, A. F., Akanji, M. A., Oloyede, O. B., Sulaiman, A. A., Olatunde, A., Joel, E. B., ... & Adeyemi, O. S. (2015). Oral Exposure to Silver/Gold Nanoparticles: Status of RatLipid Profile, Serum Metabolites and Tissue Morphology. *Journal of Medical Science*, 15(2), 71-79.

Sulaiman, M., Zhigila, D. A., Mohammed, K., Umar, D. M., Aliyu, B., & Abd Manan, F. (2019). Moringa Oleifera Seed as Alternative Natural Coagulant for Potential Application in Water Treatment: A Review. *Journal of Advanced Research in Materials Science*, 56(1), 11-21.

Sumbul, S., & Ahmed, S. I. (2012). Anti-hyperlipidemic activity of Carissa carandas (Auct.) leaves extract in egg yolk induced hyperlipidemic rats. *J Basic Appl Sci*, 8, 124-34.

Sun, A. X., Yuan, Q., Fukuda, M., Yu, W., Yan, H., Lim, G. G. Y., ... & Je, H. S. (2019). Potassium channel dysfunction in human neuronal models of Angelman syndrome. *Science*, 366(6472), 1486-1492.

Sun, Y., Ge, X., Li, X., He, J., Wei, X., Du, J., ... & Li, Y. C. (2020). High-fat diet promotes renal injury by inducing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Cell Death & Disease*, 11(10), 1-14.

Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Moon, J. W., Gu, B., Mortensen, N. P., ... & Doktycz, M. J. (2010). Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environmental science & technology*, 44(13), 5210-5215.

- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (Eds.). (2018).** *Bancroft's theory and practice of histological techniques E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Taher, M. A., Abdul-Hussain, D. A., Hasan, H. F., Fahmi, Z. M., Luaibi, O. K., & Ali, M. G. (2015).** Hypolipidemic effect of caffeic acid isolated from *Arctium lappa* cultivated in Iraq, in hyperlipidemic rat model. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN: 1683-3597, E-ISSN: 2521-3512)*, 24(1), 18-24.
- Taher, M. A., Nyeem, M. A. B., Ahammed, M. M., Hossain, M. M., & Islam, M. N. (2017).** *Moringa oleifera* (Shajna): the wonderful indigenous medicinal plant. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 3(1), 20-30.
- Takahashi, Y. and Ide, T. (2000).** Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in the rat. *The British Journal of Nutrition*. 84:175-184.
- Talreja, T., Yadav, L., & Goswami, A. (2013).** In Vitro Production of Phytosterols in some Medicinal Plants. *The Journal of Indian Botanical Society*, 92(3and4), 229-232.
- Thomas, R., Soumya, K. R., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2015).** Inhibitory effect of silver nanoparticle fabricated urinary catheter on colonization efficiency of Coagulase Negative Staphylococci. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, 68-77.
- Tian, J., Wong, K. K., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., ... & Tam, P. K. (2007).** Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 2(1), 129-136.
- Tien, D. C., Liao, C. Y., Huang, J. C., Tseng, K. H., Lung, J. K., Tsung, T. T., ... & Stobinski, L. (2008).** Novel technique for preparing a nano-silver water suspension by the arc-discharge method. *Rev. Adv. mater. sci*, 18, 750-756.
- Trop, M., Novak, M., Rodl, S., Hellbom, B., Kroell, W., & Goessler, W. (2006).** Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-

like symptoms in burn patient. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 60(3), 648-652.

Trujillo, M. E., Sullivan, S., Harten, I., Schneider, S. H., Greenberg, A. S., & Fried, S. K. (2004). Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(11), 5577-5582.

Turco, S., El Kaffas, A., Zhou, J., Wijkstra, H., Willmann, J. K., & Mischi, M. (2016, September). Quantitative ultrasound molecular imaging for antiangiogenic therapy monitoring. In *2016 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)* (pp. 1-4). IEEE.

Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., & Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(3), 426-431.

Vasudevan, D. M., Sreekumari, S., & Vaidhyathan, K. (2011). General Amino Acid metabolism (Urea cycle, One Carbon Metabolism). *Vasudevan et al's (6th edition) Textbook of Biochemistry for Medical Students*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, India, 170-82.

Vasudevan, D. M., Sreekumari, S., & Vaidyanathan, K. (2013). *Textbook of biochemistry for medical students*. JP Medical Ltd.

Voet, D., & Voet, J. G. (2011). *Biochemistry*, 4-th Edition. NewYork: John Wiley & Sons Inc, 492.

Von White, G., Kerscher, P., Brown, R. M., Morella, J. D., McAllister, W., Dean, D., & Kitchens, C. L. (2012). Green synthesis of robust, biocompatible silver nanoparticles using garlic extract. *Journal of Nanomaterials*, 2012.

Wallenius, V., Wallenius, K., Ahrén, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S. L., ... & Jansson, J. O. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature medicine*, 8(1), 75-79.

Wang, D. Q. H. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu. Rev. Physiol.*, 69, 221-248.

- Wang**, Y. M., Zhang, B., Xue, Y., Li, Z. J., Wang, J. F., Xue, C. H., & Yanagita, T. (2010). The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids in health and disease*, 9(1), 1-6.
- Wei**, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, 20(5), 595-601.
- Wester**, K., Wahlund, E., Sundström, C., Ranefall, P., Bengtsson, E., Russell, P. J., ... & Busch, C. (2000). Paraffin section storage and immunohistochemistry: effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 8(1), 61-70.
- Williams**, J. H., Mephram, B. L., & Wright, D. H. (1997). Tissue preparation for immunocytochemistry. *Journal of clinical pathology*, 50(5), 422-428.
- Wojtanik**, K. M., & Liscum, L. (2003). The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), 14850-14856.
- Wouters**, K., van Bilsen, M., van Gorp, P. J., Bieghs, V., Lütjohann, D., Kerksiek, A., ... & Shiri-Sverdlov, R. (2010). Intrahepatic cholesterol influences progression, inhibition and reversal of non-alcoholic steatohepatitis in hyperlipidemic mice. *FEBS letters*, 584(5), 1001-1005.
- Xie**, R., Chung, J. Y., Ylaya, K., Williams, R. L., Guerrero, N., Nakatsuka, N., ... & Hewitt, S. M. (2011). Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(4), 356-365.
- Yadav**, R., Khare, R. K., & Singhal, A. (2017). Qualitative phytochemical screening of some selected medicinal plants of shivpuri district (mp). *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res*, 3(1), 844-847.
- Yamaguchi**, K., Yang, L., McCall, S., Huang, J., Yu, X. X., Pandey, S. K., ... & Diehl, A. M. (2007). Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 45(6), 1366-1374.

- Yamamoto**, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., Kimura, T., Namba, T., Matsuda, J., ... & Isaka, Y. (2017). High-fat diet-induced Lysosomal dysfunction and impaired autophagic flux contribute to lipotoxicity in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(5), 1534-1551.
- Yang**, Z. H., Miyahara, H., Takeo, J., & Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & metabolic syndrome*, 4(1), 1-10.
- Yildirimer**, L., Thanh, N. T., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2011). Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano today*, 6(6), 585-607.
- Yu**, Q. Q., Cheng, D. X., Xu, L. R., Li, Y. K., Zheng, X. Y., Liu, Y., ... & Zhao, S. H. (2020). Urotensin II and urantide exert opposite effects on the cellular components of atherosclerotic plaque in hypercholesterolemic rabbits. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(4), 546-553.
- Yunita**, L., Lalel, H., Manongga, S. P., Datta, F. U., & Lada, C. O. (2021). Effects of Betamelor (Black Rice, Red Beans and Moringa Leaves) Consumption on Hypercholesterolemic Rats. *EAS Journal of Nutrition and Food Sciences* . 2663-7308
- Zampronio**, A. R., Melo, M. C. C., Silva, C. A. A., Pela, I. R., Hopkins, S. J., & Souza, G. E. P. (1994). A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Mediators of Inflammation*, 3(5), 365-373.
- Zhong**, W., Xing, M. M., & Maibach, H. I. (2010). Nanofibrous materials for wound care. *Cutaneous and ocular toxicology*, 29(3), 143-152.

Summery

Summery

The current study was conducted to evaluate the histological and immunohistopathological changes resulting from feeding experimental animals a high cholesterol diet and then treating them with silver nanoparticles in comparison with Moringa leaf extract.

In the experiment, (30) male rabbits were used, and they were divided into six groups, five of which were fed for (90) days with a diet containing 2.5% cholesterol, while the control group was left fed with normal food.

Animals fed a diet containing 2.5% cholesterol for 90 days were dosed with three concentrations of silver nanoparticles AgNPs (5, 10 and 15 mg/kg body weight) and Moringa leaf extract (200 mg/kg body weight) for a period of 21 days. a day.

1 ml of blood was withdrawn from the groups treated with the diet containing 2.5% cholesterol monthly to confirm the induction of hypercholesterolemia in the blood of the experimental animals, after the feeding period and after the period of dosing with silver nanoparticles AgNPs, as well as the extract of the leaves of the Moringa plant. For the purpose of measuring the level of lipids in the blood (lipid profile), which included (total cholesterol TC, triglycerides TG, high-density lipoprotein HDL, low-density lipoprotein LDL, and very low-density lipoprotein VLDL) 10 ml were withdrawn from each One of the experimental animals for the purpose of measuring fat parameters after sacrificing the animals and the end of the experiment period.

The results of the statistical analysis showed a significant increase ($P < 0.05$) in the weights of the animals after the feeding period for the groups that were fed for (90) days with a ration containing 2.5% cholesterol.

The results of the study showed a significant increase ($P < 0.05$) in the level of fats in the blood of the groups that were fed for (90) days with a diet containing 2.5% cholesterol.

The results of the hypercholesterolemia group showed a significant increase ($P < 0.05$) in the level of cholesterol, triglycerides, low-density

Summery

lipoproteins (LDL), and very low-density lipoproteins (VLDL), while continuing to feed them with high-cholesterol food, while the results recorded a significant decrease ($P < 0.05$).) in the level of high-density lipoproteins (HDL).

A significant decrease ($P < 0.05$) in the level of total cholesterol was recorded after the dosing period for groups treated with silver AgNPs nanoparticles at a concentration (5 and 10 mg/kg of body weight), while a non-significant decrease ($P > 0.05$) was observed in the cholesterol level after The dosing period for the group treated with silver AgNPs nanoparticles at a concentration (15 mg/kg body weight) as well as the group treated with Moringa leaf extract (200 mg/kg body weight).

The results showed that there was no significant difference ($P > 0.05$) in the level of triglycerides of groups treated with silver AgNPs at a concentration of (5, 10 and 15 mg/kg body weight) for a period of 21 days, while a significant decrease ($P < 0.05$) was observed for the treatment group. With Moringa leaf extract (200 mg / kg body weight).

The results of the study showed a significant decrease ($P > 0.05$) in the level of high-density lipoproteins (HDL) for the group treated with silver AgNPs nanoparticles at a concentration (5 mg/kg of body weight), while a significant increase ($P < 0.05$) was observed for the group Working with silver nanoparticles (10 and 15 mg / kg of body weight) as well as the treatment group with Moringa leaf extract (200 mg / kg of body weight) for 21 days.

The results also showed a significant decrease ($P < 0.05$) in the average concentration of LDL in the serum of rabbits before and after the period of administration for the groups treated with silver nanoparticles (5, 10 and 15 mg/kg/body weight) and the treatment group. With the extract of the treated groups Moringa leaves (200 mg / kg / body weight).

The results of the study showed that there was no significant difference ($P > 0.05$) in the level of very low-density lipoproteins (VLDL) for groups treated with silver AgNPs nanoparticles at a concentration of (5 and 15 mg/kg of body weight) for 21 days, while a significant decrease was observed ($P < 0.05$) for the group treated with silver nanoparticles (10 mg/kg body weight) and the group treated with Moringa leaf extract (200 mg/kg body weight).

Summery

Numerous histological changes were also recorded in the liver of groups fed for (90) days with a diet containing 2.5% cholesterol. different in liver tissue.

As for the livers of animals treated with silver nanoparticles and moringa leaf extract for 21 days, it showed a return of the radiographic appearance of hepatocytes to the hepatocytes around the hepatic vein and no infiltration of inflammatory cells, with a few swollen cells and less number of fatty droplets.

As for the histological sections of the kidneys of animals that were fed for (90) days with a diet containing 2.5% cholesterol, the presence of hemorrhage and expansion of the renal tubules, infiltration of lymphocytes, congestion, as well as the accumulation of protein substances inside the renal tubules were recorded.

Histological sections of the kidneys of animals treated with silver nanoparticles and Moringa leaf extract for 21 days showed the return of the normal histological appearance of the kidneys with the presence of some dilated renal tubules.

The immunohistochemical study reinforced the results of the study and showed tissue discoloration in brown indicating the presence of the immune cytokines represented by Interleukin 1 β and Interleukin 6.

It can be concluded from this study that the use of low concentrations of silver nanoparticles and moringa leaf extract for 21 days in hypercholesterolemic animals has an effect on improving the lipid profile in the blood, in addition to improving the histological appearance of the liver and kidneys.

**Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Kerbala/College of Science
Department of Biology**



Histopathological and immunohistochemical study of the effect of silver nanoparticles and moringa on the liver and kidneys of male rabbits treated with a high cholesterol diet

A thesis

Submitted to the council of the

College of Science – University of Kerbala

**In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of
Science in Biology**

By

Mustafa Hammoud Abood

B.Sc. Kerbala University 2008

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Jasem Hanoon Hashim Al-Awadi

1443 A.H

2021 A.D