جامعة كربلاء

كلية التربية العلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة نسيجية وكيميوحيوية للدور الوقائي لهرمون Dehydroepiendesteron في كبح تصلب الشرايين Atherosclerosis المستحث من إعطاء الكولسترول في إناث لأرانب البالغة

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

كتبت بواسطة

غفران عدنان عبد الامير حلبوص

بأشراف

أ.م.د بتول عباس حسين

حزيران - 2024 م   ذو الحجة – 1446 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

((هل يَسْتَوِي الَّذِينَ
يَعْلَمُونَ وَالَّذِينَ لا
يَعْلَمُونَ إِنَّمَا يَتَذَكَّرُ أُولُو
الألبـاب))

صدق الله العلي العظيم

سورة الزمر الآية (9)

إقرار المقوم العلمي

أقر بأن رسالة الماجستير الموسومة:

(دراسة تأثير هرمون parasteron على تصلب الشرايين المستحدث على الارانب البالغة)

التي تقدمت بها الطالبة غفران عدنان عبد الامير حلبوص قد جرى تقويمها علميا بإشرافي وهي جزء من متطلبات نيل الماجستير في الكيمياء.

التوقيع:

الاسم: عايد حميد حسن

المرتبة العلمية: أستاذ دكتور

العنوان: الطب البيطري – جامعة كربلاء

التاريخ:

إقرار المقوم العلمي

أقر بأن رسالة الماجستير الموسومة:

(دراسة تأثير هرمون parasteron على تصلب الشرايين المستحدث على الارانب البالغة)

التي تقدمت بها الطالبة غفران عدنان عبد الامير حلبوص قد جرى تقويمها علميا بإشرافي وهي جزء من متطلبات نيل الماجستير في الكيمياء.

التوقيع:

الاسم: حسين عباس سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ دكتور

العنوان: كلية التربية – جامعة القادسية

التاريخ:

إقرار المشرفين

نشهد بان أعداد هذه الرسالة تمت تحت أشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء هي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /علم الحيوان

التوقيع :

اسم المشرف : أ.م.د بتول عباس حسين

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التأريخ : / /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

استناداً الى التوصية أعلاه من قبل المشرف الأستاذ الدكتور بتول عباس حسين ارشح هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاسم : أ.د نصير مرزا حمزة

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التأريخ : / /

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة أدناه ،قد اطلعنا على الرسالة الموسومة " دراسة نسيجية وكيميوحيوية للدور الوقائي لهرمون Dehydroepiendesteron في كبح تصلب الشرايين Atherosclerosis المستحث من إعطاء الكولسترول في إناث الأرانب البالغة" وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وكل ما يتعلق بها ووجدنا أنها جديرة بالقبول بتقدير (امتياز) لنيل درجة ماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان .

رئيس اللجنة

التوقيع :-

الاسم :- أشواق كاظم عبيد

العنوان:- أستاذ دكتور

التاريخ:- 2/8/ 2024

عضو اللجنة

التوقيع :-

الاسم :- نصير مرزا حمزة

العنوان :- أستاذ دكتور

التاريخ:- 2/8/ 2024

عضو اللجنة

التوقيع :-

الاسم :- ريم عبد الرحيم مردان

العنوان :- استاذ مساعد دكتور

التاريخ:- 4/8/ 2024

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :-

الاسم :- بتول عباس حسين

العنوان :- استاذ مساعد دكتور

التاريخ:- 2/8/ 2024

التوقيع :-

الاسم :- أ . د . حميدة عيدان سلمان

العنوان :- عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: 29/8/ 2024

الإهداء

إلى من أملي رضاه وغايتي حبه ورحمته وغفرانه الله رب العالمين سبحانه .....

إلى سيدي ومولاي رسول الرحمة (محمد صلى الله عليه وعلى اله).....

إلى إمام الحق أمير العلم والمعرفة علي بن أبي طالب (عليه السلام).....

إلى أهل بيت الرحمة والتقوى سادة الأنام أهل بيت الرسول (ص).....

الى صاحب العصر والزمان وشريك القران مولاي الحجة (عجل الله تعالى فرجة الشريف).....

الى من غابت ابتسامته وبقيت نسمات دعائه حاضرة في الوجدان (ابي رحمه الله واسكنه فسيح جناته)

الى رمز الالهام واحق خلق الله بالإكرام ، من اذابت روحها في الحياة شمعة لثير ظلامي (امي اطال الله بقائها)

الى زوجي وسندي في الحياه من اتكئ عليهم في امري ، واشد بهم ازري عائلتي.

الى اخوتي الذين ازروني وثبتوا خطاي ومنحوني الثقة .

الى صديقتي التي سهلت لي عقبات الحياه وعراقيلها وشجعتني على بلوغ الهدف .

وطني العزيز.

لكم جميعا اهدي هذا الجهد المتواضع .

غفران

شكر وتقدير

الحمد والشكر لله العلي الأعلى ،الوفي الأوفى ، رب الآخرة والأولى ،فالق السماوات العلى ومبدع الارضين السفلى له الآخرة والأولى ،الذي خلق فسوى والذي قدر فهدى والذي اخرج المرعى فجعله غثاء أحوى ....

وأنا اطوي الصفحات الأخيرة من رسالتي يسرني ويفرحني أن أتقدم بالشكر والتقدير إلى رئاسة جامعة كربلاء لإتاحتها الفرصة لإكمال دراستي وأتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية التربية /قسم علوم الحياة والى منتسبي القسم كافة كما أتقدم بالشكر والامتنان إلى الأستاذة الفاضلة الدكتورة، بتول عباس حسين الجابري والى لإشرافها على متابعة العمل على أكمل وجه واسأل الله العلي القدير أن يمن عليها بكل الخير والصحة والعافية.

كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى الاستاذ خضير عباس فاضل عطية (زوجي) لمساعدته لي في تسهيل كثير من الصعوبات خلال ايام الدراسة وطول مده البحث ويسرني أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى صديقتي الست اصيل عمار والست زهراء اياد لما قدمته لي من عون في تجاوز بعض الصعاب .

وأتقدم بالشكر الجزيل إلى كل من أعانني وقد غاب اسمه وحضر فضله وفقهم الله لما فيه خير وعافية .

غفران

الخلاصـــــــة

هدفت الدراسة الحالية لتقيم التغيرات النسجية والمرضية النسجية المناعية الناتجة من تغذية حيوانات التجربة على غذاء عالي الكوليسترول ومن ثم معالجتها بهرمون (Dehydroepiendesteron) (DHEA) على تصلب الشرايين المستحدث ومعرفة تأثيره على القلب والأوعية الدموية والكبد ، وكانت مدة المعاملة ست اسابيع ، واستخدم (20) حيوانا من الأناث المحلية البالغة وتبلغ من العمر بين (8-9) أشهر في شهر كانون الأول وبوزن (1500-2000) غرام وتم تقسيمها الى أربع مجاميع وبواقع (5/مجموعة) ولمدة ست اسابيع ، المجموعة الأولى (G1) مجموعة السيطرة التي اعطيت الماء مع الغذاء الاعتيادي ، المجموعة الثانية (G2) اعطيت الكوليسترول (1.5 غم/ لكل100غم من الغذاء) والمجموعة الثالثة (G3) اعطيت الكوليسترول (1.5غم / لكل 100غم من الغذاء) مع الهرمون (2 غم / كغم) والمجموعة الرابعة جرعت الهرمون فقط (2 غم / كغم) ، وتم اخذ عينات الدم في نهاية التجربة لدراسة المعايير الكيموحيوية والتي شملت على دراسة تركيز الكوليسترول الكلي (TC) Total Cholesterol ، الكليسيريدات الثلاثية Triglyceride(TG) ، والبروتينات الدهنية عالية الكثافة High density Lipoprotein (HDL) ، والبروتينات الدهنية واطئة الكثافة LDL) Low density Lipoprotein) ، والبروتينات الدهنية واطئة الكثافة جدا (VLDL) Very low density Lipoprotein ، ومستوى تركيز المالونديهايد (MDA) ، ومستوى تركيز الكلوتاثيون (GSH) ، وقياس تركيز انزيم النتريك اوكسايد (NO) ، وقياس تركيز هرمون Dehydroepiendesteron (DHEA) ، وقياس تركيز الهرمونات الاستروجين (Estrogen)، والبروجسترون (Progesterone)، واجراء تقنية (IHC) لمستقبل الاستروجين (ER) على خلايا العضلة القلبية .

جاءت نتائج الدراسة الحالية كما يلي :-

وجود ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في تركيز TC، TG، وLDL،و VLDL، وانخفاض معنوي في تركيز HDL وارتفاع معنوي ($p<0.05$) في تركيز (MDA) وانخفاض معنوي في تركيز GSH في المجموعة المعاملة بالكوليسترول G2 مقارنة مع مجموعة السيطرة ،

كما أظهرت الدراسة أن استخدام الكوليسترول مع الهرمون G3 أدى إلى انخفاض معنوي ($p<0.05$) في تركيز ، TG، وLDL،و VLDL، وارتفاع في تركيز HDL، بالمقارنة مع المجموعة G2 ، وزيادة معنوية ($p<0.05$) في تركيز GSH ، وانخفاض معنوي في تركيز MDA بالمقارنة مع المجموعة G2 ، وارتفاع تركيز هرمون الاستروجين، والبروجسترون، وارتفاع معنويا ($p<0.05$) في تركيز معدل انزيم النتريك اوكسايد في المجوعة المعاملة G3 مقارنة مع مجموعة السيطرة ومن ناحية أخرى كان هناك انخفاض معنويا ($p<0.05$) في مجموعة المعاملة G2 بالنسبة لمجموعة السيطرة .

في حين اظهرت مجموعة G4 التي جرعت بالهرمون فقط ارتفاع معنويا ($p<0.05$) في تركيز هرمون Dehydroepiendesteron (DHEA) في مجموعة المعاملة G3 و المجموعة المعاملة بالهرمون G4 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية في المقاطع النسجية المأخوذة من الشريان الأبهر والكبد والقلب لمجموعة أناث الأرانب المعاملة بالكوليسترول G2 اظهرت نتائج الشريان ،عدم انتظام البطانة الداخلية ، وارتشاح الخلايا الالتهابية ، واحتقان النسيج ، وتراكم الدهون ، وظهور الخيوط الدهنية ، أما G3 لوحظ تراكم قليل للخلايا الدهنية ، ووضوح الغشاء المطاطي الداخلي للشريان، ولم يلاحظ وجود التهاب او احتقان للنسيج، وسمك جدار الشريان، وعدم انتظام البطانة الداخلية ، والمجموعة G4 لوحظ فيها وضوح طبقات الشريان وعدم ملاحظة تغيرات نسجيه واضحة أقرب الى الطبيعي وفي الكبد لوحظ توسع في الجيبانيات الدموية ، واحتقان حول الوريد المركزي ، وتنكس دهني ، وظهور قطيرات دهنية ،مقارنه بمجموعة السيطرة ، أما المجموعة G3 لوحظ احتقان خفيف حول الوريد المركزي ، تنكس دهني قليل داخل النسيج ، وتوسع الجيبانيات الدموية ، وظهور خلايا kuffer cell ، وأما بالنسبة المجموعة G4 لوحظ احتقان خفيف حول الوريد المركزي ،بالمقارنة مع مجموعة السيطرة .

ولوحظ في القلب للG2 احتقان الأوعية الدموية ، وظهور الخلايا الرغوية ، وترسب لمادة الكوليسترول . والمجموعة G3 لوحظ ارتشاح خفيف للخلايا الالتهابية وتجمعات دهنية خفيفة مع تليف ، أما G4 لوحظ فيها ارتشاح الخلايا الإلتهابية قليل، وتليف ،بالمقارنة مع المجموعة السيطرة .

أما نتائج التعبير الكيمائي المناعي النسجي لم تظهر تعبيرا عاليا لمستقبل الاستروجين في مجاميع المعرضة للكوليسترول G2 بالمقارنة مع المجاميع السيطرة وظهور ارتفاع معنوي في المجاميع المعاملة بهرمون الباراستيرون (DHEA) G3 وG4 مقارنة مع المجاميع الأخرى.

تم الاستنتاج من الدراسة الحالية إلى أن التجريع ب 2 غم /كغم بهرمون Dehydroepiendesteron (DHEA) لم يكن هناك اي تأثير سلبي على المعايير والتراكيب النسجية وان استخدام هرمون Dehydroepiendesteron ولمدة ست اسابيع للحيوانات المصابة بفرط الكوليسترول له تأثير في تحسين الدهون lipid profile في الدم وانسجة الاوعية الدموية والكبد والقلب وتقليل الاجهاد التأكسدي الناتج من اعطاء الكوليسترول .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
	الآية القرآنية
I	الإهداء
II	الشكر والتقدير
III	الخلاصة
VI	قائمة المحتويات
X	قائمة الجداول
XI	قائمة الاشكال والصور
XV	قائمة المختصرات
1-2	1- الفصل الاول المقدمة
1	المقدمة
4-20	2- الفصل الثاني استعراض المراجع
4	2-1 تصلب الشرايين
5	2-2 التصنيف
6	2-2-1 المضاعفات
6	2-2-2 علامات الحدوث
7	2-2-3 مضاعفات تصلب الشرايين
7	2-4 عوامل الخطر
7	4-2-1 العمر
8	4-2-2 الجنس
8	4-2-3 التدخين
8	4-2-4 النظام الغذائي
8	4-2-5 السمنة
9	2-5 الكوليسترول
10	5-2-1 الية التأثير للكوليسترول وكيفية امتصاصه وتحوله الى آفات التصلب
12	5-2-2 الكوليسترول الكلي

5-2-3 الدهون الثلاثية	13
5-2-4 كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة	13
5-2-5 كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة	13
6-2 مضادات الاكسدة	14
2- 7 نسيج القلب	14
2- 8 انسجة الاوعية الدموية	14
2- 9 الهرمونات	15
10-2 الغدد الكظرية	15
2- 11 الهرمونات الستيرويدية	16
12-2 مالون ثنائي الدهايد	16
13-2 هرمون دِيهيدرو إيبي آندروستيرون	17
14-2 التخليق الحيوي لهرمون دِيهيدرو إيبي آندروستيرون	17
2- 15 علاقة هرمون دِيهيدرو إيبي آندروستيرون بمستقبل الاستروجين	17
16-2 خصائص الهرمون المضاد للشيخوخة	18
17-2 تأثير هرمون الدهيا على الاستروجين	18
18-2 الدور البيولوجي للهرمون	18
19-2 كيمياء الانسجة المناعية	19
20-2 عقار دِيهيدرو إيبي آندروستيرون	20
3-الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	26-45
1-3 الاجهزة المستعملة حسب المنشأ والشركة	26
1-1-3 المواد المستعملة حسب المنشأ والشركة	26
2-1-3 المواد الكيميائية المستعملة حسب المنشأ والشركة	27
2-3 طرائق العمل	27
3-2- 1 حيوانات التجربة	27
1-2-3 الهرمون والعقار المستعمل	28
2-2-3 هرمون الباراستيرون أندروستيرون الدهيا	28
3-2-3 الكوليسترول	28

4-2-3 تصميم التجربة	29
3-3 مخطط تصميم التجربة	29
4-3 عينات الدم	30
5-3 تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم	30
1-5-3 تقدير تركيز الكليسيريدات الثلاثية	32
2-5-3 تقدير تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة	33
3-5-3 تقدير تركيز الدهون البروتينية الواطئة الكثافة	34
4-5-3 تقدير تركيز البروتينات الدهنية واطئة الكثافة جداً	34
6-3 الفحوصات الكيموحيوية	35
1-6-3 تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصل	35
2-6-3 تقدير تركيز المالونديهايد في مصل الدم	36
3-6-3 تقدير تركيز انزيم النترك اوكسايد	38
7-3 قياس تركيز الهرمونات	38
1-7-3 قياس تركيز هرمون الدهيا	38
2-7-3 قياس تركيز هرمون الأستروجين	39
3-7-3 قياس تركيز هرمون البروجيستيرون	40
8-3 التحضيرات النسجية	41
1-8-3 الانكاز والترويق	41
2-8-3 التشريب	41
3-8-3 الطمر	41
4-8-3 التصبيغ والتحميل	42
9-3 تقنية كيمياء الانسجة المناعية	42
10-3 مكونات عدة الاختبار	43
11-3 فحص الشرائح	45
12-3 والتصوير المجهري	45
13-3 التحليل الإحصائي	45
4-الفصل الرابع النتائج	47-75
1-1-4التغيرات في معدل تركيز الكوليسترول Cholesterol	47

48	2-1-4التغيرات في معدل تركيز الدهون الثلاثية TG
49	3-1-4 التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL في مصل الدم
50	4-1-4 التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة (LDL (mg/dl
51	5-1-4 التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية واطئة الكثافة جدا (VLDL) في مصل الدم .
52	6-1-4التغيرات في معدل تركيز الكلوتاثيون Glutathione (GSH) في مصل الدم
53	7-1-4 التغيرات في معدل تركيز المالونداليهايد Malondialdehyde (MDA) في مصل الدم .
54	8-1-4 تأثير معدل تركيز انزيم النتريك اوكسايد Nitric oxide في مصل الدم
55	9-1-4التغيرات في معدل تركيز هرمون DHEA,S في مصل الدم
56	10-1-4التغيرات في معدل تركيز الاستروجين Estrogen (E2) في مصل الدم.
57	11-1-4التغيرات في معدل تركيز البروجيسترون Progesterone في مصل الدم
58	2-1-4 التغيرات النسجية
59	1-2-1-4 تأثير غذاء الكوليسترول والهرمون على نسيج الشريان الابهر
60	2-2-1-4 تأثير غذاء الكوليسترول والهرمون على نسيج الكبد
61	3-2-1-4 تأثير غذاء الكوليسترول والهرمون على نسيج القلب
62	4-2-1-4 التعبير الكيميائي النسجي المناعي IHC لمستقبل الاستروجين على عضلة القلب
85-76	5 – الفصل الخامس المناقشة
77	1-1-5تأثير الكوليسترول والهرمون على معدل تركيز الكوليسترول والشحوم البروتينية عالية وواطئة الكثافة
79	2-1-5التغيرات في معدل تركيز الكلوتاثيون و المالونديهايد في اناث الارانب
81	3-1-5التغيرات في معدل تركيز انزيم النتريك اوكسايد Nitric oxide
82	4-1-5التغيرات في معدل تركيز الهرمونات (DHEA, E2,Prog) بتأثير الكوليسترول والهرمون

2-5 التغيرات النسجية **Histological changes**	83
1-2-5 التغيرات النسجية في الاوعية الدموية	83
2-5- 2 التغيرات النسجية للكبد	83
3-2-5 التغيرات النسجية للقلب	84
4-2-5 نتائج التقنية IHC لمستقبل الاستروجين (ER)	85
الاســـتـنـتـاجات والتوصيـــــات	86-87
الاستـنـتـاجـات	86
التـوصـيـات	87
المصـــــــــــــــــــــــــادر	103-88
المصادر الأجنبية	88
الخلاصة باللغة الإنكليزية	104

قائمة الجداول

الجدول	رقم الصفحة
جدول (3-1) يوضح اسم الاجهزة المستعملة والشركة المصنعة والمنشأ	26
جدول (3-2) يوضح اسم المواد المستعملة والشركة المصنعة والمنشأ	26
جدول (3-3) يوضح المواد الكيميائية المستعملة والشركة المصنعة والمنشأ	27
جدول (4-1) معدل تركيز الكوليسترول **Cholesterol** في مصل اناث الارانب البالغة	47
جدول (4-2) التغيرات في معدل تركيز الدهون الثلاثية **TG**في مصل اناث الارانب البالغة	48
جدول (4-3) يبين معدل تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة في مصل اناث الارانب البالغة	49
جدول (4-4) يبين معدل تركيز الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة(**LDL**)في مصل اناث الارانب البالغة	50
جدول (4-5) التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية واطئة الكثافة (**VLDL**) في مصل اناث الارانب البالغة	51
جدول (4-6) يبين تأثير الكلوتاثيون **GSH** في مصل اناث الارانب البالغة	52
جدول (4-7) يبين معدل تركيز المالونداليهايد(**MDA**) في مصل اناث الارانب البالغة	53
جدول (4--8) يبين تأثير معدل انزيم النتريك اوكسيد (**NO**) في مصل اناث الارانب البالغة	54

جدول (4-10) يبين تأثير الأستروجين(Estrogen (E2 في مصل اناث الارانب البالغة	55
جدول (4-11) معدل تركيز هرمون البروجيسترون Progesterone في مصل اناث الارانب البالغة	56

قائمة الاشكال والصور

الاشكال والصور	رقم الصفحة
الشكل (2-1) استقلاب الكوليسترول في الخلايا الرغوية لآفة تصلب الشرايين	8
الشكل (2-2) تطور لوحة تصلب الشرايين	9
الشكل (3- 1) مخطط تصميم التجربة	29
الشكل (4-2) التركيب الكيميائي لهرمون الدهيا (DHEA)	20
صورة رقم (1-1) مقطع نسيجي للشريان الابهر يوضح فيه طبقات الشريان الطبيعية لمجموعة السيطرة في اناث الارانب البالغة .	46
صورة رقم (1-2) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5 غم/ 100كغم من الغذاء.	46
صورة رقم (1-3) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5 غم/ 100كغم من الغذاء مع الهرمون بـ 2 غم /كغم	47
صورة رقم (1-4) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالهرمون بـ 2 غم/ كغم .	61
صورة رقم (1-5) مقطع عرضي لنسيج الكبد في مجموعة السيطرة في اناث الارانب البالغة	62
صورة رقم (1-6) مقطع عرضي لنسيج الكبد في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100كغم من الغذاء	
صورة رقم (6-2) مقطع نسيجي للكبد في مجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100كغم من الغذاء	62

صورة رقم (1-7) مقطع عرضي لنسيج الكبد في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100كغم من الغذاء مع الهرمون 2غم /كغم	63
صورة رقم (1-8) مقطع عرضي لنسيج الكبد في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالهرمون فقط 2غم /كغم	64
صورة رقم (1-9) مقطع طولي لنسيج القلب لمجموعة حيوانات السيطرة في اناث الارانب البالغة	65
صورة رقم (1-10) مقطع طولي لنسيج القلب في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/ 100كغم من الغذاء	66
صورة رقم (1-11) مقطع طولي لنسيج القلب في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/ 100كغم من الغذاء مع الهرمون 2غم /كغم	67
صورة رقم (1-12) مقطع طولي لنسيج القلب في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالهرمون فقط 2غم /كغم	68
صورة رقم (1-13) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة السيطرة	69
صورة رقم (1-14) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة السيطرة	70
صورة رقم (1-15) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة الكوليسترول	72
صورة رقم (1-16) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة الكوليسترول	73
صورة رقم (1-17) مقطع نسيجي لمجموعة الكوليسترول مع التجريع بالهرمون بـ2غم/كغم DHEA تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين	74
صورة رقم (1-18) مقطع نسيجي لمجموعة الكوليسترول مع التجريع بالهرمون بـ 2غم/كغم DHEA تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين	75

صورة رقم (1-19) مقطع نسيجي لمجموعة التجريع بالهرمون بـ 2غم/كغم DHEA فقط تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين	76
صورة رقم (1- 20) مقطع نسيجي لمجموعة التجريع بالهرمون بـ 2غم/كغم DHEA فقط تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين	77

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ACTH	Adrenocorticotropic hormone
CVD	Cardiovascular Disease
CAD	Coronary artery disease
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DHEA,S	Dehydroepiandrosterone Sulfate
eNO	enzyme Nitric oxide
E2	Estrogen
ER	Estrogen receptor
Era	Estrogen receptor Alpha
ERE	Estrogen-response element
GSH	Glutathione
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HDL	High Density Lipoprotein
(H_2O_2)	Hydrogen peroxide
OH	hydroxyl radicle
HMG-COA	Hydroxytc-3-methylglutary coenzyme
IHC	Immunohistochemistry
LPL	Lipoprotein Lipase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-C	Low Density Lipoprotein cholesterol
MDA	Malondialdehyde
MI	Myocardial infarction
NO	Nitric oxide
NO+	Nitrogen Oxide

Ox- LDL-C	**Oxidized low Density Lipoprotein cholesterol**
PAD	**Peripheral artery disease**
OONO	**Peroy nitrite**
PRO	**Progesterone**
RNS	**Reactive Nitrogen Species**
ROS	**Reactive Oxygen Species**
TC	**Total Cholesterol**
TG	**Triglyceride**
VLDL	**Very Low-Density Lipoprotein**
NAFLD	**Non-alcoholic fatty liver disease**
TBA	**Thiobarbituric acid**
TCA s	**Trichloro cetic Acid solution**
PBS	**Peroxide block solution**
DPX	**Distrene-Plasticizer-xylen**

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة

Introduction

المقدمة

تصلب الشرايين هو مرض التهابي مزمن يتميز بتراكم اللويحات (المكونة من الكوليسترول والمواد الدهنية والنفايات الخلوية والكالسيوم والفيبرين) داخل جدران الشرايين. يؤدي هذا التراكم، المعروف باسم تصلب الشرايين أو لوحة تصلب الشرايين، إلى تضييق الشرايين وتصلبها فتصبح أقل مرونة، مما يضعف تدفق الدم إلى الأعضاء والأنسجة الحيوية. (Lusis, 2000) .

التصلب الشرياني هو الآلية الرئيسية وراء مرض القلب الإقفاري، حيث ان الخلل في الطبقة البطانية والأوعية الدموية الدقيقة يمكن أن يسبب أيضًا نقصًا في التروية، وتكون هذه المشكلة أكثر شيوعًا لدى النساء(Kelkar *et al* ., 2016)

يحدث التصلب الشرياني نتيجة لإصابة الأوعية الدموية وخلل في وظائفها، وغالبًا ما ينجم ذلك عن عوامل الخطر مثل ارتفاع ضغط الدم، ومرض السكري، واضطرابات شحوم الدم، والتدخين. يتبع ذلك استجابة التهابية تؤدي إلى تكوين اللويحة. في الحالات الحادة، يمكن أن يؤدي تمزق اللويحة وتكون التخثرات إلى احتشاء عضلة القلب (Nakanishi *et al* .,2016).

يعد هرمون Dehydroepiandrosterone (DHEA) هو هرمون طبيعي ينتج بشكل طبيعي في الجسم، ويتم إفرازه بواسطة الغدة الكظرية والغدد الجنسية الاخرى . و يُعتبر DHEA بعد تحويله إلى العديد من الهرمونات الأخرى في الجسم، بما في ذلك الاستروجين والتستوستيرون. يلعب DHEA دورًا هامًا في الحفاظ على التوازن الهرموني وصحة العديد من الأعضاء والأنظمة في الجسم حيث ترتفع المستويات الطبيعية لهذا الهرمون في وقت مبكر من البلوغ ثم تقل تدريجيا مع تقدم العمر ويعتقد ان انخفاض مستوياته هو سبب في تغيرات كبيرة مرتبطة بالعمر (Poretsky *et al*., 2009)

حيث ان هذا الهرمون لديه تأثير مضاد للالتهابات يساعد في الوقاية من التهابات الأوعية الدموية، و يلعب DHEA أيضًا دورًا مهمًا في الغدد الصماء التناسلية، كما هو الحال مع الأندروجينات الأخرى .

فـإن DHEA مسؤولا عن تكوين البويضـات فـي المبيض. تشمل التـأثيرات الموصـوفة علـى تكوين جريبات المبيض تنظيم عامل النمو الشبيه بالأنسولين ، والحساسية تجاه موجهات الغدد التناسلية وتقليل توقف الجريبات (Sen *et al* .,2010).

كما ان الهرمون من المركبات الكيميائية المشتقة من الكوليسترول قوتها وتأثيرها الحيوي يعتمد على تأثيرها الكيميائي ولها وظائف عديدة مضادة للإلتهاب anti-inflammation ومضادة للأكسدة anti-oxidation وذات اثار مناعية مهمة Maninger (*et al* ., 2009)

The aims of study الهدف من الدراسة

تهدف الدراسة الحالية الى اختبار فعالية Parasteron وبجرعة 2غم\ كغم على نسيج الشريان الابهر والكبد والقلب في اناث الارانب البالغة ودراسة بعض التغيرات الوظيفية والنسيجية وتشمل محاور الدراسة التالية :-

1. صور الدهون الكاملة Lipid profile .Ch.TG. HDL. LDL. VLDL,
2. تأثير على معدل تركيز المالونديهايد وهي MDA وتركيز الكلوتاثيون GSH
3. على تركيز انزيم Nitric oxide (NO).
4. على تركيز مستويات هرموني الاستروجين والبروجستيرون
5. وايضا باستخدام تقنية Imunohisto chemistry تأثيره على مستقبل الأستروجين ER في خلايا العضلة القلبية
6. ومعرفة تأثيره على نسيج القلب والاوعية الدموية والكبد.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

استعراض المراجع

Literature review

1-2 تصلب الشرايين Atherosclerosis

تصلب الشرايين يعد السبب الرئيسي للوفاة بين كبار السن في البلدان الغربية، يشير البحث إلى أن مع تقدم العمر، يكون للالتهاب ومستويات الهرمونات الجنسية الداخلية تأثير مستقل ومتزايد على خطر تصلب الشرايين.(Wong *et al*.,2020)

هو حالة تقدمية تنطوي على سماكة وتصلب جدران الشرايين بسبب تراكم الترسبات. ويعتبر السبب الكامن وراء أمراض القلب والأوعية الدموية المختلفة، بما في ذلك مرض الشريان التاجي، ومرض الشريان السباتي، ومرض الشريان المحيطي، والأمراض الدماغية الوعائية (مثل السكتة الدماغية) (Pahwa and Jialal, 2023).

ويعد مرض تصلب الشرايين هو مرض معقد يسبب ارتفاع معدل الوفيات بين عامه السكان حول العالم (Benjamin *et al*.,2019;Knuuit *et al* .,2020) .

وتسبب المرض في ما يقرب من ثلث الوفيات في جميع انحاء العالم (Mozaffarian *et al*.,2016)،مما يساهم في وفاة حوالي 17.7مليون شخص سنويا في جميع انحاء العالم (Rehman *et al*.,2021.,Shahjehan *et al* .,2021) (Qammar *et al*.,2020) .

تمثل الامراض القلبية الوعائية سببا رئيسيا للوفاة بين عامة السكان ، حيث يبلغ معدل انتشارها 40% على الاقل بين المرضى اللذين يعانون من مرض الكبد الدهني غير الكحولي (NAFLD) (Younossi *et al* .,2016) هو مؤشر وعامل خطر لتطور امراض القلب والاوعية الدموية ،لأنه يزيد من خطر الاصابة بالأمراض والوفيات (Targher *et al* .,2021).

مستويات الجلوكوز وارتفاع ضغط الدم والكوليسترول الدهني منخفض الكثافة (LDL-c) هي عوامل الخطر الايضية القلبية الثلاثة التي تتوسط ما بين 40% و50% من العلاقة بين السمنة وامراض القلب والاوعية الدموية (Christen *et al* .,2019). يبدا احتباس الدهون والتغيرات التأكسدية داخل الشرايين ، مما يؤدي بعد ذالك الى خلل التهابي مستمر ويؤدي في النهاية الى تجلط الدم وتشكيل لويحات دهنية (Ahmed *et al* .,2020).

2-2 التصنيف Category

يمكن تصنيف تصلب الشرايين على أساس موقع وشدة الإصابة الشريانية، فضلا عن مرحلة تطور المرض. تشمل التصنيفات الشائعة ما يلي:(Rafieian *et al*., 2014) مرض الشريان التاجي :Coronary artery disease (CAD) تصلب الشرايين الذي يؤثر على الشرايين التاجية التي تغذي عضلة القلب بالدم. ومرض الشريان السباتي: تصلب الشرايين الذي يؤثر على الشرايين السباتية التي تغذي الدماغ بالدم. و مرض الشريان المحيطي: peripheral artery disease (PAD) تصلب الشرايين الذي يؤثر على الشرايين في الأطراف، وخاصة الساقين. وتصلب الشرايين الأبهري: تصلب الشرايين الذي يؤثر على الشريان الأبهر، وهو أكبر شريان في الجسم.ومراحل تصلب الشرايين: قد تشمل هذه المراحل

الخطوط الدهنية (المرحلة المبكرة)، وتكوين اللويحة الليفية، وتمزق اللويحة، وتكوين الخثرة (المرحلة المتقدمة).

1-2-2 المضاعفات Complications

يمكن أن يؤدي تصلب الشرايين إلى مضاعفات مختلفة، بما في ذلك (Pahwa and Jialal., 2023) مرض الشريان التاجي Coronary artery disease (CAD) الذبحة الصدرية (ألم في الصدر)، واحتشاء عضلة القلب (نوبة قلبية)، واعتلال عضلة القلب الإقفاري (ضعف عضلة القلب بسبب انخفاض تدفق الدم). مرض الشريان السباتي: نوبات نقص تروية عابرة transient ischemic attacks (TIAs) أو سكتات دماغية. مرض الشريان المحيطي (PAD): العرج (ألم في الساق أثناء المشي)، ونقص تروية الأطراف الحرجة (ألم شديد في الأطراف أثناء الراحة)، ونخر الأنسجة. تصلب الشرايين الأبهري: تمدد الأوعية الدموية الأبهري (ضعف وانتفاخ جدار الأبهر) وتسلخ الأبهر (تمزق الطبقة الداخلية لجدار الأبهر).

2-2-2 علامات الحدوث Signs of occurrence

غالبًا ما يتطور تصلب الشرايين بصمت على مدار سنوات عديدة دون التسبب في ظهور أعراض حتى يحدث تضيق كبير في الشرايين أو تمزق اللويحات. قد تشمل اعراض تصلب الشرايين ما يلي (Piechocki *et al*;2024)

- الذبحة الصدرية أو ألم في الصدر(CAD) .
- ضيق في التنفس (CAD أوPAD).
- ألم في الساق أو تشنج أثناء النشاط البدني في (PAD) .
- خدر أو ضعف أو شلل في الوجه أو الذراع أو الساق (في مرض الشريان السباتي أو السكتة الدماغية).
- ارتفاع ضغط الدم (ارتفاع ضغط الدم).
- ارتفاع مستويات الكولسترول.
- وذمة محيطية (تورم) في الساقين أو القدمين.
- ضعف الانتصاب (عند الرجال).

يعد الاكتشاف المبكر لعوامل الخطر ومعالجتها (مثل ارتفاع ضغط الدم وارتفاع الكوليسترول والسكري والتدخين والسمنة والخمول البدني) ضروريًا لمنع أو إبطاء تطور تصلب الشرايين وتقليل خطر حدوث مضاعفات ، تعد الفحوصات الطبية المنتظمة، والاختبارات التشخيصية (مثل تحليل الدهون، ومخططات القلب الكهربائية، واختبارات الإجهاد، ودراسات التصوير)، وتعديلات نمط الحياة

(مثل النظام الغذائي الصحي، وممارسة التمارين الرياضية بانتظام، والإقلاع عن التدخين، والالتزام بتناول الأدوية) مكونات أساسية للنهج الشامل. لمعالجة تصلب الشرايين والحد من مخاطر القلب والأوعية الدموية (Bays *et al* .,2021) .

بما في ذالك احتشاء عضلة القلب ، والذبحة الصدرية (Partida *et al* .,2018). يعد الكوليسترول اكثر انواع الدهون خطرا بسبب ارتباطه القوي بأمراض القلب والاوعية الدموية عند ارتفاع نسبته في الدم ، كما ويعد الكوليسترول كجزء اساسي في دخوله في صناعة الخلايا، اذ يمكن لجميع الخلايا تصنيعه من اسلاف بسيطة وككحول ستيرويد ،و الكوليسترول موجود حصرا في الحيوانات ويتواجد في جميع الخلايا وسوائل الجسم تقريبا ويعد الكوليسترول المادة الاساس للعديد من الاستيرويدات المهمة من الناحية الفسيولوجية بما في ذالك الاحماض الصفراوية والهرمونات الستيرويدية (Nelson *et al*.,2017).

3-2-2 مضاعفات تصلب الشرايين Complications of atherosclerosis

نتيجة لتأثر الشرايين المتوسطة والكبيرة الحجم ،يصبح التجويف في النهاية معرض للخطر ، مما يسبب متلازمات إقفاريه توثر على القلب والدماغ والاطراف (Shah,2019). تتحول الخيوط الدهنية في جدران الشرايين تدريجيا الى تصلب الشرايين ولويحات مميزة ، والتمزق السريع لهذه اللويحات العصيدية يؤدي الى تجلط الدم الموضعي ، وتعتمد العواقب السريرية لهذه اللويحات على موقعها ومدى سرعة انسداد الشريان (Herrington *et al*.,2016). اللويحات التي تتسبب في انسداد قناه الشريان التاجي فجاءة تعرض القلب للخطر ، واذا ترك دون علاج ، يؤدي الى احتشاء عضلة القلب والنوبة القلبية Heart attack (MI) التي لا رجعة فيها (Janjusevic *et al*.,2022). يؤدي تراكم اللويحات لتصلب الشرايين الى انسدادات كاملة مزمنة للقلب والاوعية الدموية .

4-2 عوامل الخطر التي تسبب تصلب الشرايين

Risk factors that cause atherosclerosis

4-2-1 العمر Age

التقدم في العمر هو عامل خطر رئيسي للإصابة بأمراض القلب والاوعية الدموية وتصلب الشرايين لأنه يرتبط بانخفاض وظيفة المايتوكوندريا وارتفاع في مستويات الاوعية الدموية وكلاهما من المحتمل ان يعزز التهاب المفاصل الروماتيزم بشكل مستقل عن فرط شحميات الدم الزمن (Tyrrell andGoldstein.,2021) .

4-2-2 الجنس Gender

غالبا ما تعاني النساء من امراض القلب والاوعية الدموية اقل من الرجال (Gierach *et al* .,2009). بسبب الهرمون الذكري (Testosterone) عند الرجال الذي يمتلك تأثير فعال في زيادة كمية الشحوم المحمولة في الدم وزيادة ترسب اللويحات (Plagues) المسببة لتصلب الشرايين وتزداد نسبة الاصابة عند النساء بعد 50 سنة بسبب انخفاض هرمون Estrogen (Auda *et al*.,2021).

4-2-3 التدخين Smoking

هو عامل خطر فردي لتصلب الشرايين ، ويمنع النيكوتين ويثبط نشاط Enzyme Nitric oxide (eNO) انزيم اوكسيد النتريك الذي بدورة يقلل من انتاج اوكسيد النتريك (NO) والتوافر البيولوجي له ، ويزيد من الاجهاد التأكسدي الناتج .

وبالتالي يؤدي الى تولد الجذور الحرة (ROS) الجذور الحرة Free radicals هي ذرات تمتلك الكترونات غير مرتبطة في غلافها الذري الخارجي بسبب افتقادها لرقم ثابت في غلافها الاخير ، فهي في حركة دائمة لتبحث عن ذرة اخرى او جزي ءاخر لترتبط به وتحقق الثبات لذألك تهاجم الجذور الحرة الجزيئات الاخرى وتفقدها الالكترونات وتصبح جذور حرة ، وهذه هي البداية لتخريب سلسلة الخلايا الحية (Digiacomo *et al* .,2019).

4-2-4 – النظام الغذائي والنشاط البدني Diet and physical activity

يمكن ان يؤدي نقص النشاط البدني الى تفاقم عوامل الخطر لتصلب الشرايين مثل ارتفاع ضغط الدم، ومستويات الكوليسترول ، والسكر ، وزيادة الوزن. تحتوي بعض الاطعمة على نسبة عالية من السكريات والاملاح، والكوليسترول، والدهون المشبعة والمتحولة التي تؤدي الى تفاقم عوامل الخطر لتصلب الشرايين يمكن الوقاية من تصلب الشرايين وتأخيره وعلاجه من خلال النظام الغذائي وممارسة الرياضة (Al-Sharea *et al*.,2019).

4-2-5 السمنة Obesity

مؤشر مهم للإصابة بأمراض القلب والاوعية الدموية وتصلب الشرايين ، حيث تزداد احتمالية اصابة الاشخاص بنسبة 10% لكل نقطة يرتفع مؤشر كتلة الجسم فوق الوزن الطبيعي لان السمنة يصاحبها اضطراب ايضي لنمط توزيع الدهون في الجسم فتؤدي الى زيادة خزن الدهون وتزيد من عملية التصلب (Barrio *et al* ., 2008) .

5-2 الكوليستيرول Cholesterol

الكوليسترول هو مادة شمعية شبيهة بالدهون توجد في خلايا الجسم وتنتشر في مجرى الدم. وهو ضروري لأداء الجسم الطبيعي، لأنه يلعب أدوارًا مهمة في بناء أغشية الخلايا، وتوليف بعض الهرمونات (مثل هرمون الاستروجين والتستوستيرون)، وإنتاج الأحماض الصفراوية لعملية الهضم (Craig *et al.*,2023) يصنف الكولسترول إلى نوعين رئيسيين اعتمادا على البروتينات التي تنقله في مجرى الدم (Huff *et al.*, 2024) كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL): يُشار إليه عادةً باسم الكولسترول "الضار"، وهو مسؤول عن نقل الكولسترول من الكبد إلى خلايا الجسم. ومع ذلك، إذا كان هناك فائض من الكولسترول LDL في مجرى الدم، فإنه يمكن أن يتراكم في جدران الشرايين، مما يؤدي إلى تكوين الترسبات وزيادة خطر الإصابة بتصلب الشرايين وأمراض القلب والأوعية الدموية.

كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة (HDL): المعروف باسم الكولسترول "الجيد"، يساعد كوليسترول HDL على إزالة الكوليسترول الزائد من مجرى الدم ونقله مرة أخرى إلى الكبد، حيث يتم استقلابه وإفرازه من الجسم. ترتبط المستويات المرتفعة من الكوليسترول الجيد (HDL) بانخفاض خطر الإصابة بتصلب الشرايين وأمراض القلب والأوعية الدموية. بالإضافة إلى كوليسترول LDL وHDL، هناك نوع آخر يسمى كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة جدًا (VLDL)، والذي يحمل في المقام الأول الدهون الثلاثية (نوع آخر من الدهون) في مجرى الدم. ترتبط المستويات المرتفعة من الكوليسترول VLDL أيضًا بزيادة خطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية (Nicholls *et al* ., 2011) .

يعد الحفاظ على مستويات الكوليسترول الصحية أمرًا مهمًا لتقليل خطر الإصابة بأمراض القلب والسكتة الدماغية. تعد المستويات المرتفعة من كوليسترول LDL، إلى جانب المستويات المنخفضة من كوليسترول HDL، من عوامل الخطر الرئيسية لتصلب الشرايين وأمراض القلب والأوعية الدموية. يمكن أن تساعد تعديلات نمط الحياة، مثل اتباع نظام غذائي صحي منخفض الدهون المشبعة والمتحولة، وممارسة النشاط البدني بانتظام، والحفاظ على وزن صحي، وتجنب التدخين، والحد من استهلاك الكحول، على خفض مستويات الكوليسترول الضار LDL ورفع مستويات الكوليسترول الجيد HDL. (Ghodeshwar *et al.*, 2023)في بعض الحالات، يمكن وصف أدوية مثل الستاتينات، ومثبطات حمض الصفراء، ومثبطات PCSK9، ومثبطات امتصاص الكوليسترول للمساعدة في إدارة مستويات الكوليسترول، خاصة عندما لا تكون

تغييرات نمط الحياة وحدها كافية لتحقيق المستويات المستهدفة. تعد المراقبة المنتظمة لمستويات الكوليسترول من خلال اختبارات الدم أمرًا مهمًا لتقييم مخاطر القلب والأوعية الدموية وتوجيه قرارات العلاج (Chhetry *et al* ., 2023).

تركيبته الجزيئية هي $C_{27}H_{46}O$ في حالته النقية ، وهي مادة بلورية بيضاء عديمة الرائحة والمذاق . الكوليسترول غير قابل للذوبان في الماء ولكن قابل للذوبان في الكحول بشكل معتدل وقابل للذوبان ايضا في الاثير ، والكلوروفورم ، والكحول الساخن ، والزيوت النباتية، وخلات الايثيل .

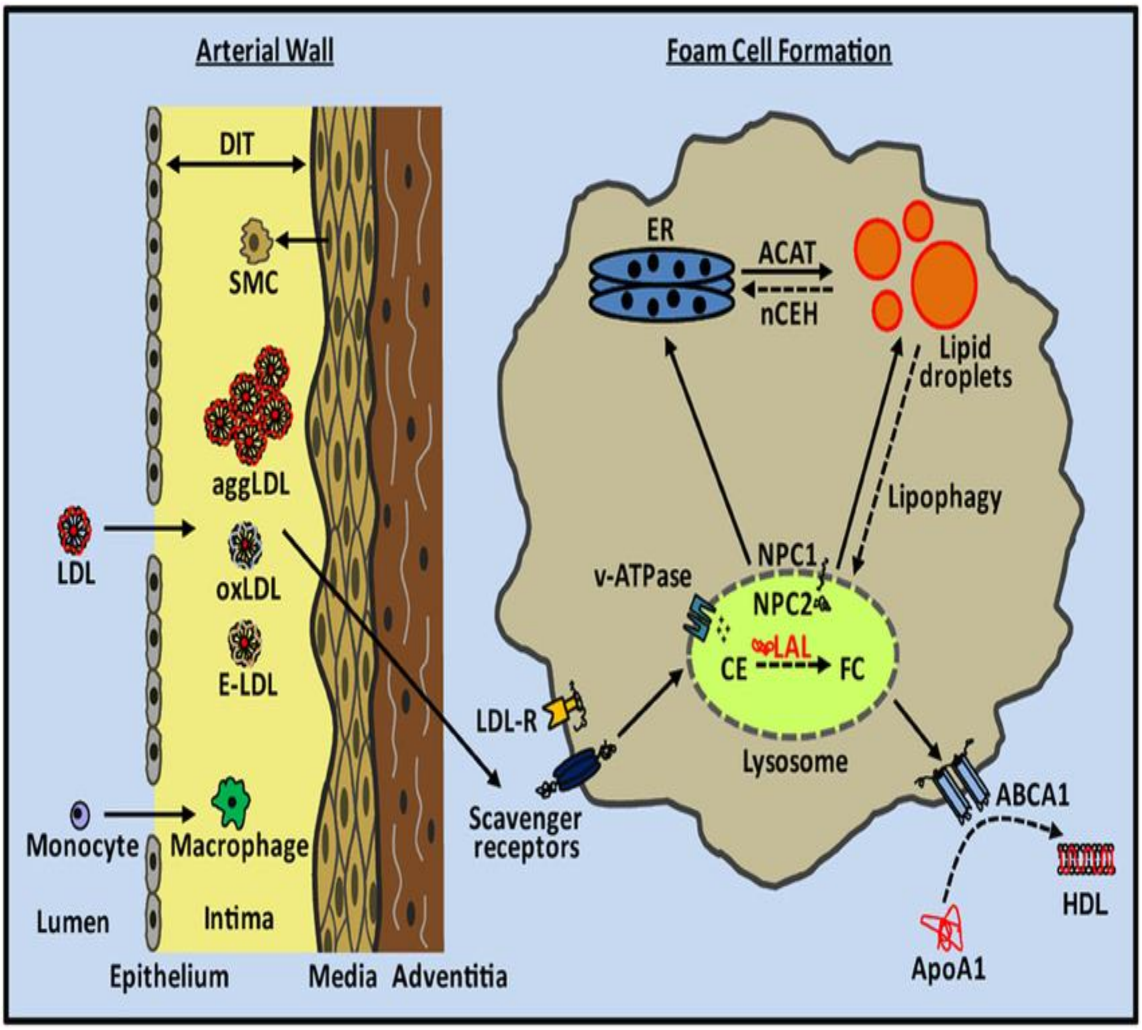
5-2-1 آلية التأثير للكوليسترول وكيفية امتصاصه وتحوله الى آفات تصلب الشرايين

The mechanism of action of cholesterol and how it is absorbed and transformed into atherosclerosis lesions

يلعب الكوليسترول دورًا حاسمًا في تطور آفات تصلب الشرايين، والتي تعد السمة المميزة لتصلب الشرايين. تتضمن آلية العمل تراكم الكوليسترول في جدران الشرايين والاستجابة الالتهابية اللاحقة. ويحدث ذلك من خلال:(Kong *et al*., 2022). امتصاص الكوليستيرول: يتم الحصول على الكوليستيرول من خلال المصادر الغذائية، وخاصة الأطعمة التي تحتوي على نسبة عالية من الدهون المشبعة والدهون المتحولة. بمجرد تناوله، يتم امتصاص الكوليسترول في الأمعاء الدقيقة ويتم تعبئته في الكيلومكرونات، وهي جزيئات البروتين الدهني التي تنقل الدهون الغذائية عبر مجرى الدم . يتم نقل الكوليستيرول في مجرى الدم بشكل رئيسي كجزء من جزيئات البروتين الدهني، بما في ذلك البروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL)، والبروتين الدهني منخفض الكثافة للغاية (VLDL)، والبروتين الدهني عالي الكثافة (HDL). الكولسترول LDL هو الناقل الرئيسي للكوليسترول إلى الأنسجة الطرفية، بما في ذلك جدران الشرايين.

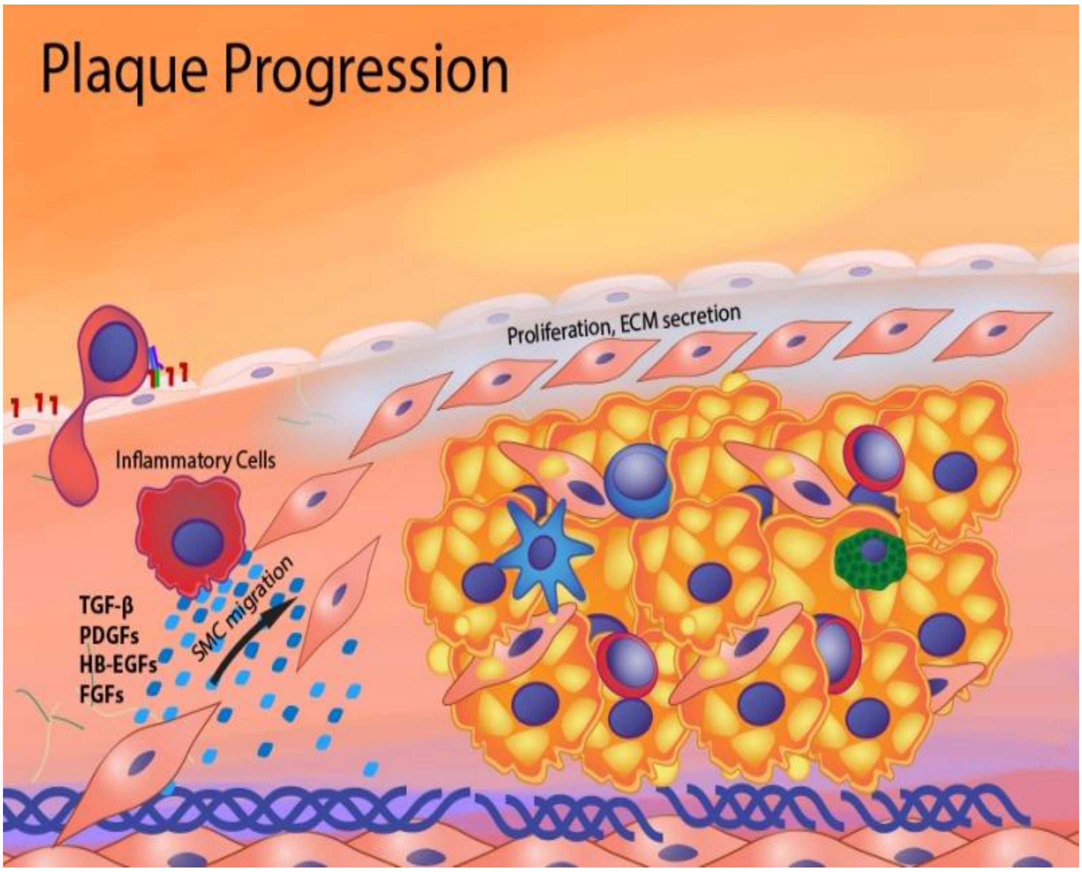
إصابة بطانة الأوعية الدموية: الخطوة الأولى في تطور تصلب الشرايين هي إصابة بطانة الأوعية الدموية، والتي يمكن أن تحدث بسبب عوامل مختلفة، بما في ذلك ارتفاع ضغط الدم، والتدخين، وارتفاع الكولسترول، والسكري، والالتهابات. يؤدي الخلل البطاني إلى ظهور جزيئات الالتصاق وتسلل الخلايا الالتهابية إلى جدار الشرايين. تراكم الكولسترول: يخترق الكولسترول LDLالبطانة التالفة ويتراكم داخل المساحة تحت البطانية لجدار الشرايين. تخضع جزيئات LDL لتعديلات، مثل الأكسدة والتكسر، مما يجعلها أكثر عرضة للامتصاص بواسطة البلاعم. تكوين الخلايا الرغوية: تبتلع الخلايا البلعمية الموجودة في جدار الشرايين جزيئات LDL المؤكسدة، مما يؤدي إلى تكوين الخلايا الرغوية. الخلايا الرغوية هي بلاعم محملة بالدهون تساهم في تطور تصلب الشرايين عن طريق إطلاق

السيتوكينات الالتهابية، وتعزيز الإجهاد التأكسدي، وتحفيز تكاثر خلايا العضلات الملساء. تكوين الخطوط الدهنية: يؤدي تراكم الخلايا الرغوية ،إلى جانب هجرة خلايا العضلات الملساء وتكاثرها، إلى تكوين خطوط دهنية داخل جدار الشرايين. الخطوط الدهنية هي أولى آفات تصلب الشرايين المرئية وتمثل المرحلة الأولى من تطور اللويحة. تكوين اللويحة وتطورها: مع مرور الوقت، يمكن أن تتطور الخطوط الدهنية إلى لويحات تصلب الشرايين الأكثر تقدمًا والتي تتميز بغطاء ليفي، ونواة غنية بالدهون، ونواة نخريه. يمكن أن يؤدي عدم استقرار اللويحة والتمزق والتخثر إلى أحداث قلبية وعائية حادة، مثل احتشاء عضلة القلب (نوبة قلبية) والسكتة الدماغية. (Voet *et al*.,2011)



الشكل (2-1) يبين استقلاب الكوليسترول في الخلايا الرغوية لآفة تصلب الشرايين

. (Chistiakov *et al*., 2017)



الشكل (2-2) تطور لوحة تصلب الشرايين (Virmanir et al**., 2006)** .

5-2-2 الكوليسترول الكلي Total Cholesterol(TC)

يمكن لعدد كبير من الخلايا انتاج الكوليسترول ، وفي البشر يساهم الكبد بحوالي نصف الانتاج الاجمالي (Hong *et al*.,2020).يعد الكوليسترول جزءا اساسيا من الاغشية حقيقية النواة في الخلايا ، ويشارك في تنظيم سيولة الغشاء وتنظيمه والعناصر الفيزيائية والكيميائية الاخرى (Chakraborty *et al*.,2020). كما ان الكوليسترول لدية القدرة على التفاعل مع مجموعة من بروتينات الغشاء الخلوي (Luo *et al* .,2020). يتحول الكوليسترول الى استرات الكولستريل التي يتم اطلاقها كمكون حيوي للبروتينات الدهنية في البلازما ويتم الاحتفاظ بها كمخزن للكوليسترول في قطرات الدهون العصارية الخلوية (Subczynski *et al*.,2017).

5-2-3 الدهون الثلاثية Triglycerides (TGs)

يتم ربط ثلاث جزيئات من الاحماض الدهنية (غير المشبعة او المشبعة او كليهما) بجزيء جلسرين واحد بواسطة روابط الاستر (ester) لتكوين دهون ثلاثية (TG)، وهي دهون طبيعية في جسم الانسان ،تعمل الدهون الثلاثية كمصدر رئيسي للطاقة الخلوية (Laufs *et al*.,2020) لنقل الدهون الغذائية ، ويتراوح نطاق تركيزها النموذجي في المصل بين (150- 40) غم / ديسيلتر ، تحمل الكيلومكرونات (Chylomicrons) الناشئة من القناة المعوية (intestinal tract) الدهون الثلاثية (TG) خارجيا، بينما يحمل (VLDL) المشتق من الكبد الدهون الثلاثية (TG) داخليا.(Lewis *et al*.,2015).البروتين الدهني منخفض الكثافة (VLDL) وبقاياه المنتجة اثناء استقلاب الدهون الثلاثية (TG)هي الكيلومكرونات (Chylomicrons) وهو مكون رئيسي للبروتينات الدهنية الغنية بالدهون الثلاثية ، (Peng *et al*.,2017).

5-2-4 كوليسترول البروتين الدهني منخفض الكثافة Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol

تتمثل الوظيفة الفسيولوجية ل LDL في تزويد الخلايا في الانسجة خارج الكبد بالكوليسترول والتي ترتبط بعد ذالك وتتكامل باستخدام مستقبلات غشاء البلازما ، من المعترف به على نطاق واسع ان البروتين الدهني المؤكسد منخفض الكثافة (ox LDL) هو بروتين دهني مسبب للأمراض . تطور تصلب الشرايين ،الذي يؤدي الى مرض الشريان التاجي ، عندما يكون هناك تركيز اعلى في المصل الاحجام المختلفة لجزيئات LDL قد يكون لها تأثيرات واضحة على كيفية تطور المرض (Chunta *et al*., 2020).

5-2-5 كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة High-density lipoprotein(HDL) cholesterol

البروتين الدهني الاصغر والاكثر كثافة ، البروتينات الدهنية هي جزيئات معقدة ذات قلب مركزي الكوليسترول الحر والدهون الفوسفاتية وعدد من البروتينات الدهنية (Apo) التي تعتبر ضرورية لتكوين البروتين الدهني ووظيفته في البلازما تسمى (HDL). HDL هو عباره عن دهون ،ينقل الكوليسترول الزائد عبر الانسجة المحيطية الى الكبد للتخزين والتحلل وبالتالي يشار الية ب الكوليسترول الجيد (Xiang and Kingwell,2019) . هناك علاقة عكسية واضحة بين مستويات الكوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة في الدم وخطر الاصابة بأمراض القلب التاجية (Zhang *et al* .,2019).

6-2 مضادات الاكسدة : Antioxidant

هي عبارة عن جزيئات تحافظ على الخلايا من التلف الذي قد تسببه الجذور الحرة فيها ، والجذور الحرة عبارة عن نتاج طبيعي عن عمليات الايض . وتمتلك الجذور الحرة الكترونا حرا فتأخذ الكترونا اخر من مضادات الاكسدة وتصبح معتدلة ، وبالتالي فان حاجتنا لمضادات الاكسدة امر لا مفر منه . اهم انواع مضادات الاكسدة .

تنقسم مضادات الاكسدة الى نوعين :

القابلة للذوبان في الماء : يتم استيعابها وتؤدي عملها في داخل الخلايا .

القابلة للذوبان في الدهون : يتم استيعابها في جدار الخلية وتؤثر علية .

7-2 نسيج القلب Heart tissue

القلب : هو العضو الاساسي في جهاز الدوران يتكون من الالياف العضلية القلبية .

الخلايا العضلية القلبية عبارة عن خلايا مخططة متفرعة ومترابطة بواسطة أقراص مقحمة، والتي تحتوي على الديسموسومات والوصلات الفجوية من أجل الانكماش المنسق. الشغاف: الشغاف هو الطبقة الأعمق من القلب، ويتكون من طبقة رقيقة من الخلايا البطانية والنسيج الضام. وهو يبطن غرف القلب ويغطي صمامات القلب. النخاب: النخاب هو الطبقة الخارجية للقلب، والمعروفة أيضًا بالطبقة الحشوية من التأمور المصلي. يتكون من النسيج الضام والأنسجة الدهنية والأوعية الدموية. (Ripa *et al* .,2024).

8-2 أنسجة الأوعية الدموية Vascular tissue

الشريان: الشرايين عبارة عن أوعية دموية تحمل الدم المؤكسج بعيدًا عن القلب إلى أجزاء مختلفة من الجسم. لديهم جدران عضلية سميكة تتكون من ثلاث طبقات الغلالة الباطنية : Tunica intima الطبقة الأعمق التي تتكون من الخلايا البطانية وطبقة رقيقة من النسيج الضام .الغلالة الوسطانية : Tunica medina الطبقة الوسطى مكونة من خلايا عضلية ملساء وألياف مرنة، وهي مسؤولة عن تنظيم قوة الأوعية الدموية وضغط الدم. الغلالة البرانية: Tunica advection الطبقة الخارجية المكونة من نسيج ضام، تحتوي على أعصاب، والأوعية الوعائية (الأوعية الدموية الصغيرة التي تغذي جدار الوعاء الدموي)، والأوعية اللمفاوية (Takahashi et al., 2015) .

9-2 الهرمونات Hormones

الهرمونات هي مواد كيميائية يفرزها الجسم لتنظيم انشطه الجسم المختلفة ، وللحفاظ على التوازن في الجسم من خلال اطلاقها في مجرى الدم ، او لتنتشر من خلال اغشية الخلايا بعد اطلاقها من الغدد المفرزة لها .تفرز الهرمونات في الجسم من نظام الغدد الصماء (Endocrine system) المنتشر في جميع انحاء الجسم لتتحكم في عمليات النمو ، والتكاثر ، وانشطة الجسم المختلفة ، بما في ذالك منطقة ما تحت المهاد Hypothalamus ، والغدة النخامية Pituitary gland،والغدد الكظرية Adrenal gland، والغدد التناسلية Gonads، والغدة الدرقية Thyroid gland، والبنكرياس Pancreas، والغدد جار الدرقية Parathyroid glands، وتحتوي الخلايا المستهدفة على مستقبلات خاصة لكل هرمون توجد هذه المستقبلات اما على سطح الخلية او داخل الخلية (Knight,2021)

وتنقسم الهرمونات الى ثلاثة انواع رئيسية هي : الهرمونات المشتقة من الاحماض الامينية Amino acid-derived hormones، هرمونات الببتايد Peptide hormones، والهرمونات الستيرويدية Steroids hormone (Albrecht *et al* ., 2003) .

10-2 الغدد الكظرية Adrenal glands

الغدد الكظرية عبارة عن غدة صغيرة مثلثة الشكل تقع في اعلى كل كلية . وهي جزء من نظام الغدد الصماء وهي مسؤولة عن انتاج الهرمونات التي تساعد الجسم على الاستجابة للتوتر والحفاظ على عدة وظائف مهمه ،بما في ذالك تنظيم ضغط الدم ومستويات السكر في الدم وتوازن الملح والماء في الجسم . تتكون الغدد الكظرية من جزأين : قشرة الغدة الكظرية ونخاع الغدة الكظرية . (Xing *et al*., 2015). تنتج قشرة الغدة الكظرية هرمونات مثل الكورتيزول الذي يلعب دورا مهما في عمليات الايض والتي تتمثل في كيفية استهلاك الجسم للطاقة، بالإضافة الى دورة في ابطاء عمل الجهاز المناعي والتحكم في مستويات السكر في الدم،

والالدوستيرون الذي يساعد في التحكم بمستويات ضغط الدم ،ولتحقيق التوازن بين مستويات الصوديوم والبوتاسيوم في الجسم . بينما ينتج لب الغدة الكظرية الادرينالين والنورادرينالين، اللذان يتحكمان بشكل اساسي بردة فعل الجسم ضد عوامل التوتر بتحفيز ضح الدم بشكل اكبر الى العضلات او الى الاجزاء المعينة بالموقف الذي يتعرض له الانسان ، ب الاضافة الى دورة في سرعة ضربات القلب (Dutt *et al*.,2021) .تشير الكثير من الدراسات الى ان قصور الغدة الدرقية يعد مؤشر لضعف الغدة الكظرية وبالتالي مؤشر لنقص افراز هرمون DHEA وهذا يكون شائعا في الاشخاص الذين يعانون من اضطرابات الدرقية (Johnson *et al*., 2012).

الغدة الكظرية تتألف نسيجا من ثلاث مناطق متمايزة هي ابتداء من السطح الخارجي باتجاه اللب : المنطقة الحبيبية Zona glomerulus التي تكون مسؤولة عن افراز القشرانيات المعدنية mineral corticoid مثل هرمون الالدستيرون Aldosterone و المنطقة الثانية هي Zona fasculata التي تنتج القشرانيات السكرية مثل الكورتيزول Cortisol والمنطقة الشبكية Zona retecularis التي تعمل على انتاج الباراستيرون parasteron.

11-2 الهرمونات الستيرويدية Steroid Hormones

هي مركبات ستيرويدية وجزيئات محبة للدهون معقدة تلعب دور مهم في جسم الكائن الحي ولها العديد من الاجراءات في الجسم لتنظيم وظائف الخلايا والانسجة والاعضاء مدى الحياة وتصنف حسب منشأها الى ستيرويدات قشرية (نسبة الى قشر الكظر حيث يتم انتاجها) و ستيرويدات جنسية (تفرز من الغدد التناسلية والمشيمة) ، ويتم اطلاقها في الدورة الدموية عند الحاجة ، اذ تلعب الهرمونات الستيرويدية غالبية اثارها الفيسيولوجية في الخلايا عن طريق الارتباط ببروتينات معينة في السايتوبلازم ، بعدها يتم انتقال معقد الهرمون الذي اتحد مع مستقبله الخاص داخل النواة ليتحد مع DNA الذي يستجيب ويعمل على استنساخ mRNA ليحدث الفعل المراد في السايتوبلازم (Cole *et al* .,2019)،الهرمونات الستيرويدية تتكون بصورة رئيسية من الكوليسترول الذي يتم امتصاصه من الدم مباشرة بواسطة الالتهام الخلوي Endocytosis عن طريق الغشاء الخلوي الذي ينقل مستقبلات خاصة للبروتينات الدهنية واطئة الكثافة (LDL) Low-density lipoprotein وهي التي تحتوي على نسبة عالية من الكوليسترول (Guyton and Hall,2016).

12-2 مالون ثنائي الدهايد Malondialdehyde (MDA)

يمثل MDA المؤشر الاكثر اهمية والناتج النهائي لعملية اكسدة الدهون ، واستجابة مؤثرة لزيادة الجذور الحرة وبذلك يعد تركيزه اشارة للإجهاد التأكسدي ويعمل على تثبيط الانزيمات المضادة للأكسدة لأنه ذو سمية عالية لذلك تساهم المستويات المرتفعة منه في العديد من امراض التمثيل الغذائي وكذلك المستويات العالية في مصل الدم وزيادة الوزن وبذلك زيادة الاجهاد التأكسدي . (Abdelazeim et al ., 2020)

13-2 هرمون Dehydroepiandrosterone (DHEA)

هرمون الباراستيرون هو هرمون ستيرويد يفرزه الجسم بصورة طبيعية في الغدة الكظرية ، ويساعد هذا الهرمون في انتاج هرمونات اخرى ، بما في ذالك التستوستيرون والاستروجين ، كما ترتفع مستويات الهرمون الطبيعي في وقت مبكر من البلوغ ، ثم تقل تدريجيا مع تقدم العمر ، ويستخدم كعلاج مضاد للشيخوخة يسمى بالهرمون المضاد للشيخوخة anti-aging hormone (Abraham *et al* .,2013). تنخفض مستويات الهرمون من خلال التقدم بالعمر ويستخدم ال (parasteron) كمكمل غذائي على نطاق واسع بدون وصفة طبية لمكافحة الشيخوخة (Donato *et al*,2015) ، ويفرز هذا الهرمون بشكل رئيسي من المنطقة الشبكية Zona Reticular لقشرة الغدة الكظرية وينتج بشكل اقل من قبل الغدد التناسلية والدماغ اذ يشتق من الكوليستيرول كماده مولدة للهرمون .

14-2 التخليق الحيوي لهرمون

Dehydroepiendesteron hormone Biosynthesis

ينتج (DHEA) من المنطقة الشبكية لقشره الغدة الكظرية بتأثير الهرمون المحفز لقشرة الكظرية Adrenocorticotropic hormone (ACTH) الذي يفرز من الفص الامامي للغدة النخامية او بتأثير الهرمون المحرر لموجهه الغدد التناسلية Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) الذي يفرز من تحت المهاد Hypothalamus (Risto.,2006; Bernhard *et al* , 2016) .

15-2 علاقه هرمون(Dehydroepiendesteron) بمستقبل الاستروجين (ER)

هناك نوعان من مستقبلات الاستروجين Estrogen receptor Alpha and Estrogen receptor Beta (ERα and ERβ) حيث يعمل هرمون الأستروجين على تنظيم عمليات النسخ الجيني gene expression من خلال المسار المعروف classical estrogen signaling ويلعب دورا فسيولوجيا مهما في الكثير من الانسجة تبعا لطريقة ارتباطه بالمستقبل وتفاعله مع عناصر الاستجابة التي تعرف ب (ERE) Estrogen-response element الواقعة في المواقع النشطة للجينات المستهدفة Target genes.يمتلك هرمون parasteron بعض النشاطات الاندروجينة الضعيفة بسبب ضعف الفتة لمستقبلات الاندروجين هو قادر على الارتباط بمستقبلات الاندروجين لكن بشكل ضعيف ، وغالبا ما يرتبط بمستقبلات الاندروجين لكن تهمل بسبب التنافس للارتباط التستوستيرون الذي يمثل الاعلى الفة للمستقبل (Chen *et al* .,2005) بينما هرمون (Parasteron) يمتلك الفة عالية للارتباط بمستقبلات الاستروجين (Traish *et al*., 2011).

16-2 خصائص الهرمون المضاد للشيخوخة Anti-aging properties

ترتفع المستويات الطبيعية للديهيدرو إيبي أندروستيرون في وقت مبكر من البلوغ ثم تقل تدريجيًا مع تقدم العمر. يعتقد البعض أن انخفاض مستويات ديهيدروإيبي إيبي أندروستيرون هو سبب أو عامل مساهم في التغيرات الشائعة المرتبطة بالعمر، مثل انخفاض حجم العضلات، وقلة كثافة العظام وضعف الإدراك ، واوضحت الاثار المفيدة للهرمون باعتبارها منشطات مضادة للشيخوخة عن طريق تأثيرها المحفز للجهاز المناعي ومعالجة تصلب الشرايين والسمنة (Fontana et al., 2010).

17-2 تأثير هرمون DHEA على الاستروجين (E2) The effect of DHEA on estrogen

عادةً ما تبدأ مستويات هرمون الأستروجين في الانخفاض خلال فترة ما قبل انقطاع الطمث (Per menopause) وهي الفترة التي تسبق سن اليأس (Menopause)، ولكن هناك العديد من الأسباب التي تؤدي الى رفع مستوى الاستروجين منها هرمون ديهيدروإيبي أندروستيرون (DHEA). (Traish *et al* ., 2011)، يعد من الهرمونات الطبيعية التي من الممكن توفرها في الأسواق اصطناعيًا على شكل حبوب أو مساحيق، أو علاجات موضعية، ويمكن الاستفادة منها من أجل تعزيز إنتاج بعض الهرمونات الأخرى مثل الأستروجين والتستوستيرون (Cadegiani *et al* ., 2020).

18-2 الدور البيولوجي للهرمون The Biological role of DHEA hormone

اكتشف هذا الهرمون في عام 1934 وان انخفاض هذا الهرمون يكون مرتبط بالعمر ، اصبح DHEA هو علاج لمجموعة كبيرة ومتنوعة من الحالات الطبية ويمكن استخدامه كمكمل غذائي بدون وصفة طبية، ويمكن ايضا استخدامه كدواء لمكافحة الشيخوخة في الولايات المتحدة الامريكية ، تنخفض مستويات DHEA بعد الولادة ثم تبدا ترتفع تدريجيا قبل سنوات قليلة من البلوغ الجنسي ثم تنخفض مستوياته خلال التقدم بالعمر وتصل مستويات الذروة لهذا الهرمون من 20-30 من العمر ومن ثم يبدا ب الانخفاض (Krobath *et al* ., 1999) وهنا يمكن القول ان هذا الهرمون هو هرمون الشباب حيث ترتفع مستوياته في مرحلة الشباب وينخفض بشكل كبير مع التقدم بالعمر اذ تشير الكثير من الدراسات التي اجريت على الصحة الجسمية والاداء البدني في منتصف العمر الى ان الانخفاض في مستويات هذا الهرمون هو انخفاض اكثر في الاداء البدني والقوة (Danille *et al* .,2017).

ان انخفاض مستويات هذا الهرمون او خفض إنتاجه في الغدة الكظرية يكون مرتبط بأمراض خطيرة مثل امراض الروماتيزمية rheumatoid disease ومرض الزهايمر Alzheimer disease

وامراض القلب والاوعية الدموية cardiovascular disease وامراض الشيخوخة (Abraham *et al* ,. 2013) ، اثبتت العديد من الدراسات ان العلاج بهرمون DHEA يمكن ان يكون له مجموعة من التأثيرات المفيدة للجسم .

2-19 كيمياء الانسجة المناعية Immunohistochemistry

هي تقنية لتحديد مكان البروتين عن طريق تصوير انتقائي لمولدات الضد في الخلايا لمقاطع الانسجة البشرية او الحيوانية عن طريق مبدا ارتباط الاجسام المضادة بمولدات الضد ، ويعتمد مبدا عمل التقنية على التصبيغ الذي يعمل على تحديد المؤشرات الجزيئية المتخصصة للأحداث الخلوية المهمة مثل التضاعف الخلوي Proliferation، والموت المبرمج للخلايا وتحديد انواع من الخلايا غير الطبيعية تلك الموجودة في الانسجة المتضررة مثل الاورام (Ramos and miller,2014)

تستعمل هذه التقنية في اعطاء مفهوم واضح وصريح للدلائل الحيوية Biomarkers الموجودة في الانسجة واستعملت في كثير من الابحاث لإعطاء مؤشر لضهور البروتين المتميز protein Differentially expressed هناك تفاعل للأجسام المضادة يمكن ان تتحقق في عدة طرق ومنها اقران الجسم المضاد بأنزيم مثل انزيم البيروكسيديز Peroxidase الذي يحفز التفاعل المنتج للون ، وبشكل اساسي هناك طريقتان لهذه التقنية الطريقة المباشرة Direct method التي تعتمد على الجسم المضاد الاولي Primary antibody هي طريقة غير حساسة بسبب قلة عدد الاجسام المضادة لكنها طريقة سهلة وسريعة بالمقارنة مع الطريقة غير المباشرة . الطريقة غير المباشرة Indirect method تكون عكس الطريقة الاولى تكون اكثر حساسة واكثر تعقيدا اعتمادا على استخدامها الجسم المضاد الثانوي (Ramos- Vara ,2004).

20-2 عقار (DHEA) Dehydroepiendesteron

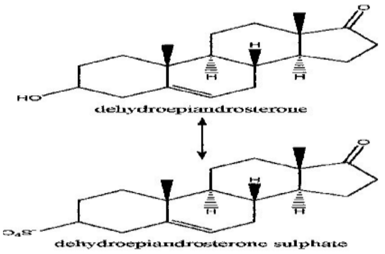
ان الاسم النظامي الكيميائي لعقار (DHEA) هو :

3-hydroxy-10,13—(3S,8R,9S,10R,13S,14S) dimethyl- 1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,15,16 dodecahydrocyclopenta (a) phenathren- 17-

اما الاسم التجاري له فهو : DHEA

الصيغة الكيميائية له $C_{19}H_{28}O_2$

اما التركيب الكيميائي لهرمون DHEA واعتمادا على (Aldred *et al* ., 1999) .



الشكل (2-3) التركيب الكيميائي لهرمون DHEA

(Aldred *et al* ., 1999)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3 - المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1-3 الاجهزة :- Devices

جدول (3-1) الاجهزة المستعملة بحسب المنشأ والشركة

ت	الاجهزة	المنشأ	الشركة
1	ELISA System /micro plate reader جهاز	USA	Bio tek
2	center fug جهاز الطرد المركزي	Germany	Her mile
3	Micropipettes	Micropipettes	Germany
4	Digital incubator حاضنة	Korea	DaihanLabtech
5	Digital Water bath حمام مائي	Korea	DaihanLabtech
6	Hot plate صفيحة ساخنة	Germany	Mettle
7	camera Digital كاميرا رقمية	Japan	Canon
8	Electric oven فرن كهربائي	Korea	Diahan-lab.Tech
9	مجهر ذو كاميرا	Japan	MEIJI
10	sensitive balance ميزان حساس	Germany	Human scope
11	Rotary Microscope المشراح الدوار	U.S.A	UNICCO , TM
12	Light microscope مجهر ضوئي	Japan	Olympus

3-1- 1 المواد Materials

جدول (3-2) الادوات المستعملة بحسب المنشأ والشركة

ت	الأدوات	المنشأ	الشركة
1	Gastric tube اداه التجريع	China	China
2	Gauze شاش	China	Medex
3	cotton قطن	Iraq	Therapy
4	Baker بيكر	China	China
5	covers Slides اغطية شرائح زجاجية	China	China
6	ادوات بلاستيكية مختلفة الاحجام	Denmark	Nunclon
7	Gel tube	Jordan	Gold star
8	Dissecting Set عدة تشريح	Pakistan	S.I.E.
9	big ben محرار	England	London
10	Glass slides شرائح زجاجية	China	Mehco
11	micropipettes ماصه مايكروبايبيت	Micropipettes	Germany
12	glass, plastic insulin محاقن انسولين syringe	Italy	Italy
13	charge slides شرائح زجاجية مشحونة	China	Mehco

3-1- 2 المواد الكيميائية Chemical Material

جدول (3-3) المواد الكيميائية المستعملة بحسب المنشأ والشركة

ت	المادة	المنشأ	الشركة
1	زايلين Xylene	England	BDH
2	شمع البرافين Paraffin Wax	Germany	Merck
3	صبغة هيما توكسلين Hemotoxyline	England	BDH
4	صبغة الايوسين Eosin		
5	عدة تقدير الكوليسترول TC والدهون الثلاثية TG والشحوم البروتيني عالية الكثافة HDL-C	Spain	Bio system
6	كوليسترول باودر cholesterol powder	UK	AVONCHEN
7	فورمالين Formalin 10%	German	Merck y
8	عدة تقدير هرمون DHEA و DHEA-S	USA	Cal biotech
9	عدة تقدير هرمون الاستروجينEstrogen	China	Elabscience
10	عدة التصبيغ الكيميائي المناعي النسجي -FLEX	Denmark	Dako
11	كحول اثيلي Ethanol	England	BDH
12	كلوروفورم Chloroform	England	BDH
13	عدة تقدير انزيم Nitric oxide	Sigma	USA
14	عدة تقدير الكلوتاثيون GSH	Sigma	USA
15	عدة تقدير المالوندالديهايد MDA	Sigma	USA
16	هرمون Dehydroepiendesteron (DHEA)	Natural	USA

3-2 طرائق العمل Methods

3-2-1 حيوانات التجربة Experimental animals

استخدمت في هذه التجربة (20) من اناث الأرانب المحلية. بأعمار (8- 9) أشهر تراوحت ما بين (1500- 2000)غرام .تم شراؤها من الأسواق المحلية ووضعت في اقفاص بلاستيكية ذات اغطية معدنية مشبكة وبأبعاد مناسبة لحجم الحيوان فرشت الاقفاص بنشارة الخشب التي تستبدل ثلاث مرات اسبوعيا .مع مراعاة جانب النظافة .في البيت الحيواني التابع الى كلية الصيدلة /جامعة كربلاء ، اخضعت هذه الحيوانات لظروف مختبرية خاصة بدرجة حرارة 25 م ، واعتمدت الإضاءة الطبيعية طول مدة الدراسة وبواقع 10 ساعات ضوء و 14 ساعة ظلام وتم تغذيتها بعليقة من البلت المركز concentrated pullets واعطيت الماء بصورة حرة. واعطيت علاجات لغرض التأكد من خلوها من الامراض اذ جرعت فمويا 0.5 غم(amoxillin) في 1 لتر من الماء ولمدة خمسة أيام متتالية وتركت الحيوانات مدة اسبوعين لغرض التأقلم .

3-2-2 الهرمون والعقار المستعمل:-

استعمل في هذه الدراسة:-

1- هرمون الديهايدروايبي اندستيرون أو(DHEA) dehydroepiandrosterone

المنتج في امريكا من قبل شركة NATROL تم التجريع باستعمال الانبوب المعدي (Gastric tube) بجرعة (2 غم/كغم) لمدة 6 اسابيع يوميا . حضر المحلول اليومي بإذابة قرص واحد من الهرمون (1Tablet) بتركيز (50 mg) في 25 مل / ماء مقطر Distal water (Obaid.,2016).

2-الكوليسترول Cholesterol

المنتج في الولايات المتحدة الامريكية (UK)من قبل شركة (AVONCHEN) تم التجريع بواسطة خلط الكوليسترول (1.5غم / كغم) بالغذاء 98.5 غم من عليقة البلت وتم تجريعها للحيوانات (Nelson *et al*.,2017)

3-2 -3 تصميم التجربة

وزعت 20 من اناث الارانب المحلية الى اربعه مجاميع وبواقع 5 حيوان لكل مجموعه وجرعت يوميا ولمدة 6 اسابيع وعلى النحو التالي.

1- المجموعة الاولى G1 وعددها 5 ارانب جرعت الماء الاعتيادي وتم تغذيتها بالغذاء المتوازن واستخدمت كمجموعة سيطرة .

2- المجموعة الثانية . G2 وعددها 5 ارانب تم تغذيتها بالغذاء المتوازن مع 1.5 ماده كوليسترول باودر لكل 100 غرام من الغذاء.

3- المجموعة الثالثة.G3 وعددها 5 ارانب وتم تغذيتها بالغذاء المتوازن مع 1.5 ماده كوليسترول باودر لكل 100 غرام من الغذاء مع هرمون DHEA بجرعه (2غم/كغم)

4-المجموعة الرابعة .G4 وعددها 5 ارانب وتم تجريعها بهرمون DHEA بجرعة (2 غم/كغم)

تصميم التجربة وفق المخطط الاتي (شكل 3-1):
التجربة :- صممت كالاتي

وشملت (20) حيوان
وبواقع اربع مجاميع
(5)/حيوان لكل مجموعة

G4: 5 rabbit
مجموعة تم تجريعها فمويا ب (2غم/كغم) من هرمون **Parasteron** فقط

G3: 5 rabbit
المجموعة المعاملة بالكوليسترول ب (1.5 غم / 100غم في الغذاء) وهورمون **Parasteron** ب (2غم/كغم) فمويا

G2:5 rabbit
المجموعة المعاملة بالكوليسترول ب (1.5 غم / 100 غم في الغذاء)

G1:5 rabbit
Control مجموعة السيطرة وتم تجريعها بالماء والغذاء الاعتيادي

بعد التضحية بالحيوانات لمدة ست اسابيع

سحب الدم بعد ثلاثة وست اسابيع

دراسة التغيرات

Ch ,TG,HDL,LDL,VLDL,NO GSH,MDA,Dhea-S-,E2,Prog

دراسة التغيرات النسجية

اجراء تقنية **IHC** لمستقبل الاستروجين **ER** على خلايا العضلة القلبية

دراسة التغيرات النسجية لكل من الاوعية الدموية والقلب والكبد

شكل (3-1) مخطط تصميم التجربة

3-3عينات الدم Blood Samples

تم سحب عينات الدم من القلب مباشره Heart puncture بعد تجويع الحيوانات طول الليل و بعد ثلاثة وستة اسابيع من التجربة وضع الدم بعد ذلك في انابيب خاصة تحتوي على مادة مانعة للتخثر ثم فصل المصل بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة15 دقيقة وحفظت الأمصال في الثلاجة في درجة حرارة - 18 م لحين إتمام القياسات .

لقياس المعايير الفسلجية التالية:

1- تركيز الكوليستيرول الكلي (T C)

2- تركيز الدهون الثلاثية (TAG)

3- تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة (HDL)(LDL)(VLDL)

4- تركيزا نزيم النترك اوكسايد (NO)

5- تركيز الكلوتاثيون (GSH)

6- تركيز المالوندالديهايد (MDA)

7 - تركيز هرمون الديهايدرو ايبي اندستيرون (DHEA,S)

8- تركيز هرمون الاستروجين (E2)

9- تركيز هرمون البروجيسترون (pro)

10- جمع عينات الانسجة Tissue sample collection

3-4-3تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم Total Cholesterol (TC)

تم تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم بالطريقة الانزيمية وفقا لطريقة (Allain,1974) اذ تعتمد هذه الطريقة على تحويل Cholesterol Esterase بوجود الاوكسجين (O_2) وانزيم Cholesterol Oxidase اللذان يعملان على اكسدة الكوليسترول الحر المتكون نتيجة التفاعل الاول الى (Cholest -4en-3one) و (Hydrogen Peroxidase) وهذا الاخير يتفاعل مع الفينول Phenol و 4- Aminoantipyrinel وبوجود انزيمPeroxidase ليكون كيتون امين quinoneoimine وردي اللون وكما موضح في المعادلات التالية :

$$\text{Cholesterol Ester} \xrightarrow{\text{Cholesterol Estrase}} \text{Fatty Acids + Cholesterol}$$

$$\text{Cholesterol} \xrightarrow{\text{Cholesterol Oxidase}} \text{Cholest–4–en–3–one} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Phenol} + 4 - \text{amino–antipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Quinoneimine} + 4H_2O$$

طريقة العمل

تم استخدام ثلاث انابيب اختبار هي العينة sample ، المحلول القياسي standard والكفئ (blank) وحسب الجدول التالي .

المحاليل	Blank	Sample	Standard
Sample		10µ	
Standard			10µ
Blank	10µ		
Reagent (a)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

بعدها اضيف 1.0 ml من reagent a الى العينة والمحلول القياسي والكفئ ومزجت المحاليل جيدا وتركت لمدة 5 دقائق في الحمام المائي بدرجة 37 مئوية وبعدها تم قراءة الامتصاصية لها بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 510 نانوميتر وذلك بعد تصفير الجهاز بواسطة الكفئ .

الحسابات :تم حساب تركيز الكوليسترول الكلي وفقا للقانون التالي :

$$\text{Concentration Mg/dl} = \frac{\text{sample}}{\text{standard}} \times n$$

اذ ان :

N = 200 وهو تركيز المحلول القياسي.

Sample= الامتصاصية الضوئية لعينة المصل.

Standard = الامتصاصية الضوئية للمحلول القياسي .

4-4-3 تقدير تركيز الكليسيريدات الثلاثية triacylglycerol (TAG)

تم تقدير تركيز الكليسيريدات الثلاثية بالطريقة الانزيمية وفقا لطريقة(Fassati and Principe, 1982) اذ تعتمد هذه الطريقة على تحويل الكليسيريدات الثلاثية الموجودة في مصل الدم من خلال سلسلة من التفاعلات الكيميائية وبوجود عدد من الانزيمات الى كيتون امين وردي اللون كما في التفاعلات التالية :

$$\text{Triglycerides} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{Glycerol} + \text{Fatty acids}$$

$$\text{Glycerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glycerokinase}} \text{Glycerol-3-phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerol-3-phosphate} + O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{Glycerol-3-phosphate}} \text{Dihydroxyacetone phosphate} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{Parachlorophenol} + 4\text{-aminoantipyrine} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Quinoneamine} + 4H_2O$$

طريقة العمل

تم استخدام ثلاث انابيب اختبار هي العينة sample ، المحلول القياسي standard والكفئ blank) وحسب الجدول التالي :

المحاليل	Blank	Sample	Standard
Sample		10µ	
Standard			10µ
Blank	10µ		
Working reagent	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

بعدها اضيف 1 مل من محلول العمل Working reagent الى العينة والمحلول القياسي والكفئ ومزجت المحاليل جيدا ووضعت لمدة 5 دقائق في الحمام المائي بدرجة 37 مئوية ، ثم قرات الامتصاصية بواسطة جهاز المطياف الضوئي بطول موجي 505 نانوميتر.

الحسابات :تم حساب تركيز الدهون الثلاثية وفق المعادلة التالية :

$$\text{Triglyceride concentration} = \frac{\text{sample}}{\text{standard}} \times n$$

اذ ان :N = 200 وهو تركيز المحلول القياسي .

Sample= الامتصاصية الضوئية لعينة المصل .

Standard = الامتصاصية الضوئية للمحلول القياسي .

5-4-3 تقدير تركيز الشحوم البروتينية العالية الكثافة HDL-C

تم تقدير تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافةHDL cholesterol بالطريقة الانزيمية وفقا لطريقة (Bursten ,1970) وتعتمد هذه الطريقة على ترسيب دقائق الاستحلاب (الكيلوسية) و LDL و VLDL والموجودة في مصل الدم ويتم ذلك بإضافة معامل الترسيب Precipitating reagent الى مصل العينات وبعد الانتهاء من هذه العملية وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي علما ان المحلول الناتج بعد عملية الترسيب يكون رائق ويحوي على HDL والذي يمكن قياس مستوى الكوليسترول فيه باستخدام الكاشف Reagent A من العدة الخاصة بتقدير مستوى الكوليسترول .

طريقة العمل: تتضمن طريقة العمل في تقدير مستوى HDL cholesterol خطوتين هما :

1-الترسيب

استخدمت هذه الخطوة لتحضير الراشح (الرائق) وذلك بإضافة 0.5 مل من محلول الترسيب Reagent1 الى 0.5 مل من مصل الدم ويمزج جيدا ويترك لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة ، ثم يوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعة 3000 دورة/ دقيقة

2- تقدير كمية HDL cholesterol

قسم العمل على ثلاثة انابيب اختبار هي (العينة ، المحلول القياسي ، الكفئ)

المحاليل	Blank	Sample	Standard
محلول رائق من sample		µ0.5	
Standard			µ0.5
Blank	µ0.5		
Working reagent	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

بعدها اضيف 2.0 مل من Reagent A الى المحاليل الثلاثة المذكورة اعلاه ومزجت جيدا ثم تركت لمدة 5دقائق في الحمام المائي بدرجة حرارة 37 مئوي وبعدها تقرا الامتصاصية بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي510 نانوميتر.

الحسابات:_تم حساب تركيز HDL cholesterol من القانون التالي :

$$S.HDL\text{-}Concentration = \frac{sample}{standard} \times C.STD \times 2$$

اذ إن:

C.STD= قيمة المحلول القياسي وتقدر 50 mg/dl

(2) = عامل التخفيف بالمزج مع عامل الترسيب Precipitating reagent

3-4-6 تقدير تركيز الشحوم البروتينية الواطئة الكثافة (LDL)

تم تقدير تركيز الشحوم البروتينية واطئة الكثافةLDL-Cholesterol حسابيا باستخدام معادلة (Friedewald equation) (Friedewald *et al* ,1972) وهي :

LDL= TC – (HDL + TAG/ 5)

3-4-7 قياس تركيز الشحوم البروتينية الواطئة الكثافة جدا (VLDL)

تم حساب تركيز VLDL بالاعتماد على المعادلة الموصوفة من قبل (Friedwald *et al* ., 1972)

VLDL = TAG/5

4- الفحوصات الكيموحيوية

3-4-2 تقدير تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم Glutathione (GSH)

تم قياس تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم باستخدام طريقة كاشف Moron المتبعة من قبل (Moron *et al* ., 1979).

المحاليل المستخدمة

1 - محلول حامض السلفوسالسيليك solution sulfosalicylic acid

يحضر بإذابة 4 غم من حامض السلفوسالسيليك في 100 ملليلتر من الماء المقطر ويحفظ في الثلاجة.

2- محلول دارئ الفوسفات solution phosphate buffer

يحضر بمزج (0.6 M KH_2PO_4) و(0.08 M Na_2HPO_4)، ويضبط الاس الهيدروجيني عند 8.

3- محلول كاشف مورون Moron

يحضر بتركيز 0.1 ملي مول بإذابة 0.00396 غم من مادة 5-5 dithio bis 2- nitro benzoic acid (DTNB) في 100 مللتر من المحلول المنظم ويحفظ الكاشف في الثلاجة.

طريقة العمل

1 - مزج حجم متساوي(150) مايكرو ليتر من مصل الدم ومحلول حامض Sulfosalicylic acid بتركيز 4%.

2– فصل الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق.

3- سحب 150 مايكرو ليتر من الراشح الى انبوبة اختبار، واضيف اليها 4.5 ملليلتر من كاشف Moron 0.1 ملي مول، وتترك لمدة 5 دقائق.

4 -قرأت الامتصاصية للمحلول باستخدام جهاز الطيف الضوئي عند الطول الموجي 412 تم حساب تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم باستخدام المعادلة الاتية :

$$\text{تركيز الكلوتاثيون (ميكرو مول/ مول)} = \frac{\text{Absorbance}}{Eo \times L}$$

$Eo = 13600\ M^{-1}\ CM^{-1}$

L =light path (Cm)

3 تقدير تركيز المالونداليهايد Malondialdehyde (MDA) في مصل الدم .

استخدمت طريقة تفاعل حامض الثايوباربيتيورك Thiobarbituric acid (TBA) وحسب هذه الطريقة، قيس تركيز المالونداليهايد Malondialdehyde (MDA) الذي يمثل احد النواتج الرئيسة لعملية اكسدة الدهن ويعد مستواه مؤشرا لهذه العملية، اذ يعتمد القياس على التفاعل بين المالونيلديهايد مع (TBA)

.(Buege& Aust, 1978)

المحاليل المستخدمة

1- محلول الثايوباراتيورك (TBA- solution)

يحضر بإذابة 0.6 غم من مادة الـ TBA في 100 ملليتر من الصودا الكاوية بتركيز 0.05 مولالي باستخدام القليل من التسخين، ويحضر هذا المحلول عند الاستعمال.

2- محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور Trichloro Acetic Acid (TCA-solution)

يحضر هذا المحلول بتركيزين، التركيز الاول 17.5% يحضر بإذابة 17.5غم من مادة TCA في 100 مللتر من الماء المقطر، والتركيز الثاني 70% يحضر بإذابة 70 غم من المادة نفسها في 100 ملليتر من الماء المقطر، ويحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

طريقة العمل

1- يؤخذ 150 مايكرو ليتر من مصل الدم ويضاف اليه 1 مل من محلول TCA بتركيز 17.5 %،

ويضاف 1 مللتر من محلول TBA الى المزيج، ويرج جيدا وتحضن الانابيب في ماء مغلي لمدة 15دقيقة.

2- تبرد العينات ويضاف اليها 1 مللتر من محلول TCA بتركيز 70 % ويترك المزيج بدرجة 37 مئوية لمدة 20 دقيقة.

3- يفصل الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق.

4- تقرأ الامتصاصية عند الطول الموجي 532 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي ويحسب مستوى MDA حسب المعادلة الآتية:

امتصاصية العينة عند 532 نانوميتر

تركيز المالوندالديهايد (ملي مول/ لتر) = $\frac{\text{Absorbance}}{L \times Eo} \times D$

اذ ان :

L = light path (cm).

Eo = extinction coefficient $1.56 \times 10^{5}\ mol^{-1}\ cm^{-1}$

6.7 = 0.15 /

معامل التخفيف = 1 ml vol.used in Relf

- **تقدير تركيز انزيم النتريك اوكسايد Nitric Oxide**
- تقدير أكسيد النيتريك
- تم تقييم تقدير NO في العينة بواسطة
- قياس النتريت (NO_2)، منتج التحلل المستقر، باستخدام تفاعل جريس وفقًا لطريقة كرين Green (Green et al (12)).
- باختصار، تمت إضافة خليط v:v من سلفانيلاميد 1% (في 5% H_3PO_4) ومحلول نفثيل إيثيلين ثنائي أمين 0.1% إلى العينات، وتم قياس الامتصاصية عند 546 نانومتر باستخدام مقياس الطيف الضوئي. تم بعد ذلك تقدير النتريت (NO_2^-)، أحد المستقلبات المستقرة لـ NO، من خلال منحنى قياسي تم إنشاؤه باستخدام $NaNO_2$.

3-6 قياس تركيز الهرمونات

تم استخدام عدة التحاليل (Kits) الخاصة بكل هرمون بالاعتماد على الطريقة المناعية المعروفةELISA)Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(باستخدام جهاز ELISA Reader من نوع Axiom Minireader الالماني المنشأ واجريت الخطوات لقياس كل هرمون بالاعتماد على الخطوات الموافقة لكل عده تحليل وكالآتي:-

3-6-1قياس تركيز الهرمونات(Dehydroepiandrosterone (DHEA-S

تم قياس تركيز هرمون (DHEA-S) باتباع الخطوات الآتية:-

1تأمين العدد المطلوب من الحفر wells المزودة مع عدة الفحص.

2أضافة 10 مايكرو ليتر من كل من المحاليل القياسية وعينات المصل المراد فحصها والسيطرة

3أضافة 50مايكرو ليتر من كاشف الانزيم الخاص بهرمون الدهيا الى كل حفرة.

4أضافة 50مايكرو ليتر من كاشف الجسم المضاد Ani-Dhea-S antibody-reagent الى كل حفرة.

5بعناية تم المزج لمدة 10دقائق ومن المهم اكمال المزج في هذه الخطوة.

6حضن المزيج لمدة دقيقة بدرجة حرارة الغرفة 25 مْ

7-تم هز المكونات بخفة وحذر في الحفر .

8- غسلت الحفر ثلاث مرات بالماء المقطر.

9 -تم أضافة 100 مايكرو ليتر من مادة TMB الى كل حفرة.

10– حضنت المواد الممزوجة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30دقيقة.

11– تم أيقاف التفاعلات الانزيمية بإضافة 50مايكرو ليتر من محلول الايقاف الى كل حفرة.

12- قراءة الامتصاصية على جهازElisa Reader على الطول الموجي 450 nnخلال 10دقائق بإضافة محلول الايقاف. وحسبت النتائج بالاعتماد على المعادلة المستحصلة من المنحنى القياسي

2-6-3 قياس تركيز هرمون الاستروجين Estimation of Estrogen hormone

تم قياس تركيز هرمون الاستروجين بأتباع الخطوات التالية بعد تجهيز عدة الفحص الخاصة بالهرمون وهي :

- اشرطة القياس Strips المعلمة الخاصة بهرمون الاستراديول وهي عبارة عن اشرطة جاهزة تتكون من 10 حفر مغطاه بصفيحة معلمة برمز الاستراديول.
- TIPS مستعملة في الماصة وتكون معلمة في نهايتها العريضة برموز هرمون الاستراديول لتمييزها .
- محلول السيطرة الخاصة بهرمون الاستراديول الذي حضر بإضافة 3 مل من الماء المقطر وتركة لمدة 10 دقائق.
- محلول التخفيف Estradiol dilution وهو جاهز للاستخدام.
- Estradiol calibrator الذي حضر بإضافة 2 ملم من الماء المقطر وترك لمدة 10 دقائق
- بطاقة خاصة تحتوي على المعلومات الرئيسية المشفرة لبيانات المعايرة في تقويم الفحص الخاص بتركيز هرمون الاستراديول وهذه توضع في جهاز القياس ليتم عن طريقها معرفة الاختبار بشكل اوتوماتيكي.

تم قياس تركيز هرمون الاستروجين بأتباع الخطوات التالية بعد تجهيز عدة الفحص الخاصة بالهرمون وهي :

وتضمنت طريقة العمل الخطوات التالية :

- 1 – وضع بطاقة M/e في المكان المخصص في الجهاز.
- 2- استخدام اشرطة القياس واحدا لكل عينة مصل ومحلول قياسي ومحلول السيطرة معا ووضعها في المكان المخصص للجهاز.

3- سحب 100 مل من عينة المصل والمحلول القياسي والسيطرة في الحفر الخاصة بها على شريط القياس Strip

4- اتباع الخطوات الخاصة بالجهاز ليقوم بعدها الجهاز ببدأ عملية المعايرة والتي تنتهي بعد 45 دقيقة.

5 - استخراج الاشرطة من الجهاز والتخلص منها لان استعمالها لمرة واحدة فقط.

- **قياس تركيز هرمون البروجستيرون Estimation of Progesterone hormone**

تم قياس تركيز هرمون البروجستيرون وفقا لطريقة (Aufrere, 1976) باستعمال عدة العمل المجهزة من شركة Monobind حسب والتي تتكون من :

1- الصفيحة (96 wells) microtiter plate .

2- المحلول القياسي (7 vials) وبالتركيز (0, 0.3 , 2.0, 5.0, 15, 30, 60)

3- Estradiol Biotin Reagent.

4- انزيم الاقتران Enzyme Conjugate.

5- Substrate Solution.

6- محلول ايقاف التفاعل Stop Solution .

7- محلول الغسل Wash Solution .

اولا : طريقة العمل

1 – يضاف 25 مايكرو ليتير من كل تركيز من المحلول القياسي للحفر السبعة الاولى من الصفيحة

بالإضافة الى اضافة 25 مايكرو ليتير من عينات المصل قيد الدراسة الى الحفر المتبقية .

2 – يضاف 50 مايكرو ليتير Estradiol Enzyme Reagent الى جميع الحفر .

3- تحرك الصفيحة بشكل دائري 20-30 ثانية .

4- يضاف 50 مايكرو ليتير Estradiol Biotin Reagent الى جميع الحفر .

5- تحرك الصفيحة بشكل دائري 20-30 ثانية.

6- تغطى وتحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 60 دقيقة .

7- تغسل الصفيحة بمحلول الغسل 2-3 مرات ب 350 مايكرو ليتير .

8- يضاف 100 مايكرو ليتير Substrate Solution الى جميع الحفر .

9- تحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة .

10- يوقف التفاعل الانزيمي بإضافة 50 مايكرو ليتير من محلول الايقاف Stop Solution الى كل حفرة

ويحرك 15-20 ثانية .

11- تقرا الامتصاصية بجهاز Microtiter well reader عند الطول الموجي 450 نانوميتر.

12 – ترسم العلاقة بين تراكيز المحلول القياسي على المحور السيني وقيم الكثافة الضوئية OD على المحور الصادي وهذه العلاقة تمثل المنحني القياسي .

3- 8 التحضيرات النسجية Histological preparations

تم حفظ العينة في البداية بعد استئصالها من الحيوان في محلول الفورمالين بتركيز10 % وبعد 48 ساعة استخرجت من الفورمالين وغسلت عدة مرات بالكحول الاثيلي بتركيز 70% بعدها اجريت عليها سلسلة من العمليات اعتماداً على الطريقة الموصوفة في (Presnell and Schreibman, 1997).

3 -8- 1 الانكاز والترويق Dehydration and Clearing

تم سحب الماء من النسيج وذلك بتمرير النماذج في سلسلة تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (70%، 80%، 90%، ، 100%) ولمدة ساعتين في كل تركيز بعدها روقت النماذج بوضعها في الزايلين لمدة خمس دقائق

3-8-2 التشريب Infiltration

بعد الانتهاء من عملية الترويق نقلت النماذج الى قناني حاوية على خليط من شمع البرافين Paraffin wax (ذي درجة انصهار 57-60ْم) المنصهر والمرشح والزايلين بنسبة 1:1 لمدة نصف ساعة داخل فرن كهربائي درجة حرارته60 ْم وذلك لإبقاء الشمع منصهراً ولضمان تمام عملية التشريب الكامل للنماذج بالشمع نقلت الى قناني اخرى حاوية على شمع البرافين داخل الفرن ايضاً لمدة ساعة واحدة ثم نقل مرة اخرى الى قناني اخرى حاوية على شمع البرافين لمدة ساعة واحدة ايضاً.

3-8-3 الطمر Embedding

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

3-8-4 التقطيع Sectioning

تم استخدام جهاز المشراح اليدوي Rotary Microtome لتقطيع النماذج وبسمك تراوح ما بين 5 ما يكرون ، ثم حملت اشرطة المقاطع على شرائح زجاجية نظيفة بعد ان وضعت في حمام مائي درجة حرارته45 ْم لمدة دقيقة- دقيقتين لضمان فرش المقاطع بعدها تركت على صفيحة ساخنة Hot Plate لتجف بدرجة حرارة 37ْم.

3-8-5 التصبيغ والتحميل staining and Mounting

صبغت جميع المقاطع النسجية باستخدام صبغة هيماتوكسلين- ايوسين Hemotoxyline-Eosin stain اذ وضعت الشرائح في الزايلين لمدة 5 دقائق للتخلص من الشمع ثم مررت بسلسلة تراكيز تنازلية من الكحول الاثيلي (100%، 90%، 80%، 70%، 50%) لمدة (5) دقائق في كل تركيز بعدها صبغت بصبغة الهيماتوكسلين لمدة (5) دقائق واحدة ثم غسلت بالماء الجاري لمدة دقيقتين ،ثم صبغت بصبغة الايوسين لمدة دقيقة ونقلت بعدها الى سلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي (70%، 80%، 90%، 100%)ولمدة دقيقتين في كل تركيز ما عدا التركيز الاخير وضعت فيه لمدة 5 دقائق ثم روقت بالزايلين بمرحلتين في كل مرحلة لمدة 5 دقائق بعدها اجريت عليها عملية التحميل باستخدام DBX لتثبيت غطاء الشريحة ثم تركت على صفيحة ساخنة لتجف لمدة 8 ساعات لتكون جاهزة للفحص المجهري.

3-6 تقنية كيمياء الانسجة المناعية Immunohistochemistry (IHC)

مبدأ الاختبار :

يعتمد مبدأ الاختبار على اساس تهيئة اضداد وحيدة النسيلة ذات خصوصية عالية للارتباط بمستضدات معينة موجودة على سطوح الخلايا مثل Estrogen Receptor ،حيث يتم الارتباط باستخدام اضداد ثانوية موسومة بالبايوتين Biotin ذو خصوصية عالية للارتباط بمادة Avidin المرتبطة اصلا بإنزيم Peroxidase.

بعد تكون المعقد Avidin- Biotin-Complex المرتبط بالخلايا في المقاطع النسجية التي تظهر النشاط الانزيمي بإضافة الركيزة النوعية substrate لذلك الانزيم باستخدام صبغة DAB.

3-7-1مكونات عدة الاختبار

1 - محلول الاضداد الاولية Primary antibody
2 - محلول الاضداد الثانوية Secondary antibody
3 - محلول انزيم البيروكسيديز Peroxidase solution
4- محلول صبغة DAB
5 - دارئ صبغة DAB (يحضر بتخفيفه مع الماء المقطر).
6 - power block buffer (5% من البومين المصل البقري (BSA)).
7- دارئ الشطف Water buffer
8- المحلول المثبط لأنزيم البيروكسيديز Blocking Solution

9 - محلول دارئ الفوسفات الملحي PBS

10 -محلول استظهار المستضدات Retrival solution Antigen

2-7-3 طريقة العمل Assay Procedure

اتبعت الطريقة الكيميائية –النسجية – المناعية بحسب شركة داكوا الدنماركية (Dako-Denmark) التي وضحت تفاصيلها من قبل Kumar& Rudbeck (2009) وكالاتي

أ- قبل أجراء تقنية كيمياء الانسجة المناعية (IHC) يجب ان يكون النسيج جديداً او محفوظاً بالمثبت الملائم (10/% فورمالين) بمدة لا تزيد عن 72ساعة.

- بعد أجراء عمليات التقطيع النسجي الاولية .

- البدأ بتقطيع العينات باستخدام جهاز المشراح الدوار Rotary microtome للحصول على شرائح نسجيه بسمك 4-5 مايكروميتر.

- وضعت الشرائح بحمام مائي ذو درجة حرارة 50 م للحصول على مقاطع نسجيه خالية من الطيات.

- حملت المقاطع النسجية على شرائح زجاجية مشحونة Positive charge Slides وبعدها تركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لليوم التالي.

- نقلت الشرائح الى الفرن الحراري ذو درجة حرارة 60 م لمدة 60 دقيقة لإزالة متبقيات شمع البرافين، بعدها وضعت في الزايلين X-ylene لمدة عشر دقائق.

- بعدها وضعت الشرائح في الزايلين مرة اخرى على مرحلتين خمس دقائق في كل مرة (لإذابة ما تبقى من الشمع) **Deparafinization**.

ب- استعادة الماء (Rehydration).

- تم تمرير الشرائح بتراكيز تنازلية من الكحول الاثيلي(كحول مطلق لمدة دقيقتين، كحول 90 %- 80 %لدقيقة فقط ، كحول 70% ايضا دقيقة واحدة).

- بعدها غسلت الشرائح بالمحلول الملحي الدارئ Phosphate buffered saline(PBS) لمدة عشر دقائق بعد غسلها بالماء المقطر لثلاث مرات كل مرة لمده دقيقة .

ج .استظهار المستضد (Antigen retrieval):

جففت الشرائح باستخدام اوراق الترشيح الخاصة ، ووضعت في اناء حاوي على محلول استعادة المستضد Sodium citrate (PH:7.0) ووضعت في الفرن لمدة خمس دقائق

بدرجة حرارة متوسطة وبعد تبريد محلول اعادة المستضد غسلت بالمحلول الملحي الدارئ وحددت وباستخدام قلم التحديد Barrier pen تم رسم دائرة حول المقطع النسجي قيد الدراسة وتركت لتجف لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. لإزالة أي سائل متبقي وللمحافظة على الكواشف ضمن المنطقة المحددة .

د. غلق الانزيم (Peroxidase block).

1- وضعت الشرائح في وعاء زجاجي واضيف اليها 100 مايكرو ليتر من محلول غلق الانزيم Peroxidase block reagent(RTU) لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.

2-غسلت الشرائح مرة ثانية بمحلول الشطف (PBS) لمدة خمس دقائق ووضعت عليها الاجسام المضادة الاولية FLEX RTU or diluted concentrated Primary antibody – بتركيز100 مايكرو ليتر ولمدة 20 دقيقة. وتم غسلها للمرة الثالثة بالمحلول الملحي الدارئ(PBS) وايضا لمدة خمس دقائق . وجففت باستخدام اوراق الترشيح.

3- وتم اعادتها مرة اخرى الى الوعاء الزجاجي ووضع عليها محلول الضد الثانوي (Biotinlated link) بتركيز 100 مايكرو ليتر ولمدة 20 دقيقة ايضا الذي يرتبط بالجسم المضاد الاولي ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة 15 دقيقة. بعدها غسلت الشرائح مرتين بالمحلول الملحي الدارئ لمده خمس دقائق في كل مرة لإزالة الكواشف الفائضة وجففت.

4- بعدها وضعت الشرائح في الوعاء الزجاجي واضيف عليها 100 مايكرو ليتر من محلول (Streptaviden -peroxidase) ووضعت في مكان رطب وحضنت عند درجة حرارة 37م لمدة 15 دقيقة اخيرا غسلت المقاطع النسجية بالمحلول الملحي الدارئ (PBS) مدة خمس دقائق وجففت.

5- تم أضافة خمس قطرات من محلول ملون DAB لكل المقطع النسجي ومغطيا للعينة بأكملها وحضنت الشريحة في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة.

6- غسلت الشرائح الزجاجية بالماء المقطر

7- جففت الشرائح وغمرت بالهيماتوكسلين Hemotoxyline RTU لمدة خمس دقائق وبتركيز 100 مايكرو ليتر.

8- ثم غسلت بالماء المقطر والمحلول الملحي المنظم ومرة اخرى بالماء المقطر ومررت بسلسلة من التراكيز الكحولية التصاعدية (50% - 70% -95% -100 %) .لمدة 3 في كل تركيز .

9- تركت لتجف في هواء الغرفة واضيفت قطرة الى قطرتين من (DPX) -Distrene plasticizer-xylen وغطيت بغطاء الشريحة Covre slip الى اليوم التالي لغرض فحصها.

فحص الشرائح Slid Examination

فحصت الشرائح مجهريا لمعرفة النتائج من قبل مختص بعلم الكيمياء-الانسجة المناعية تم تقييم نتائج التعبير الكيميائي المناعي النسجي اعتمادا على الكثافة Intensity في كيفية التوزيع Distribution ونسبة الخلايا الايجابية Positive Score الذي سجل على مقياس من 0 -3 (0= لاشي non ، 1= ضعيف weak ، 2= معتدل moderate، 3= قوي strong)، تم تقييم النسبة المئوية للخلايا المناعية باعتبارها النسبة المئوية للخلايا التي تظهر التفاعل في عشر حقول تحت قوة تكبير (X 100) وسجلت الكثافة للصبغة ونسبة التفاعل كمتوسط لوحظ في عشر حقول مجهرية Microscopic Fields. حيث اعتمدت النسبة المئوية من الخلايا الموجبة للصبغة مقسومة على العدد الكلي للخلايا (الموجبة للصبغة والسالبة للصبغة). تم تصوير المقاطع النسيجية باستخدام مجهر ضوئي نوع Olympus light microscope مزود بكاميرا رقمية Digital Camera نوع Canon عالية الدقة .

9-3 التصوير المجهري Microphotography

تم تصوير المقاطع النسيجية باستخدام مجهر ضوئي نوع Olympus light microscope مزود بكاميرا رقمية Digital Camera نوع Olympus عالية الدقة.

10-3 التحليل الاحصائي statistical analysis

استعمل البرنامج الاحصائي (**SAS, 2012**) لدراسة تأثير المجاميع والمدة في الصفات المدروسه وفق التصميم العشوائي الكامل (CRD) وقورنت الفروق بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (LSD).

الفصل الرابع

النتائج

Results

4 – النتائج Result

اوضحت الدراسة الحالية النتائج الاتية :

4-1-1التغيرات في معدل تركيز الكوليسترول TC (mg/dl)

بينت نتائج الدراسة الحالية في الجدول (4-1) الى وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في معدل تركيز الكوليسترول في مصل الدم في المجموعة الثانية (G2)المعاملة بالكوليسترول 1.5 غم/100 غم من الغذاء بعد مرور ثلاثة اسابيع من التجربة حيث بلغت (73.96) و بعد ست اسابيع من التجربة بلغت (83.78) ، مقارنة مع مجموعة السيطرة (G1) التي بلغت بعد ست اسابيع من التجربة (49.28) وانخفاض معنوي P < 0.05 في مجموعة اعطاء الهرمون (G4) حيث بلغت (38.54) بعد ثلاثة اسابيع من التجربة ، وبعد ست اسابيع من التجربة بلغت (43.50) .حيث كان هناك تأثير في الفترة الزمنية وتداخل بين المجموعات المعاملة . مقارنة مع مجموعة السيطرة .في حين كان هناك انخفاض معنوي للكوليسترول في G3 مقارنة مع باقي المجاميع بعد ست اسابيع من التجربة

الجدول (4-1)معدل تركيز الكوليسترول Cholesterol في مصل اناث الارانب البالغة.

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 سيطرة	42.44±0.32 D	49.28±1.29 C	45.86± 1.29 C
G2 معاملة بالكوليسترول	73.96±1.05 B	83.78±1.00 A	78.87±1.77 A
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	46.68±0.92 C	72.27±0.13 B	59.47±4.28 B
G4 معاملة بالهرمون فقط	38.54±1.45 E	43.50±1.23 D	41.02±1.22 D
معدل الفترة الزمنية	50.40±3.22 B	62.21±3.80 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	2.0812	1.4716	2.9433

SE ±Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).

المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

2-1-4التغيرات في معدل تركيز الدهون الثلاثية TG (mg/dl)

اشارت نتائج الدراسة الحالية في الجدول (2-4) الى وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في معدل تركيز الدهون الثلاثية في مصل اناث الارانب المعرضة لغذاء الكوليسترول في (G2) حيث بلغت من بعد ثلاثة اسابيع (42.40) وبعد ست اسابيع بلغت (119.15) بالمقارنة مع المجموعة السيطرة (G1) التي بلغت (21.51) (33.42) من بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة على التوالي و المجموعة (G3) لم تختلف معنويا عن مجموعة السيطرة وايضا عن مجموعة اعطاء الهرمون (G4) ولوحظ وجود انخفاض معنوي لم يصل الى حد المعنوية حيث بلغت (G3) (35.66) بعد ثلاثة اسابيع من التجربة ، وبعد ستة اسابيع من التجربة بلغت (72.02) وفي مجموعة اعطاء الهرمون (G4) حيث بلغت بعد ثلاثة اسابيع من التجربة (19.34) وبعد ست اسابيع بلغت (38.28).

الجدول (2-4) التغيرات في معدل تركيز الدهون الثلاثية TGفي مصل اناث الارانب البالغة .

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	21.51± 0.28 F	33.42±2.43 E	27.46± 2.29 C
G2 معاملة بالكوليسترول	42.40±0.67 C	119.15±0.73 A	80.77±12.80 A
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	35.66±1.02 DE	72.02±0.66 B	53.84±6.08 B
G4 معاملة بالهرمون فقط	19.34±0.66 F	38.28±1.14 D	28.81±3.21 C
معدل الفترة الزمنية	29.73±2.23 B	65.72±7.88 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	2.3082	1.6332	3.2644

Average ± SE ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

3-1-4التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL في مصل الدم (mg/dl)

يلاحظ في الجدول (4-3) وجود انخفاض معنوي تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في معدل تركيز الدهون البروتينية عالية الكثافة HDL في كل من مجموعة G2 و G3 بالمقارنة مع مجموعة السيطرة G1 حيث بلغت بعد ثلاثة اسابيع من التجربة (15.18) وبعد مرور ستة اسابيع من التجربة (12.01) و (14.62) (14.01) على التوالي اما المجموعة G4 حيث بلغت معدلاتهم (20.46) و(22.18) على التوالي

الجدول (4-3) يبين معدل تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة في مصل اناث الارانب البالغة .

الفترة الزمنية S.E ± Means المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	22.78± 0.22 A	21.84±0.45 AB	22.31±0.28 A
G2 معاملة بالكوليسترول	15.18±0.12 C	12.01± 0.58 D	13.59±0.60 B
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	14.62±0.68 C	14.01±0.48 C	14.31±0.40 B
G4 معاملة بالهرمون فقط	20.46±0.74 B	22.18±0.62 A	21.32±0.53 A
معدل الفترة الزمنية	18.26±0.82 A	17.51± 1.06 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	1.0829	0.7657	1.5315

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

4-1-4 التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة LDL (mg/dl)

تشير النتائج من الجدول(4-4) الى وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال (p<0.05) في معدل تركيز الدهون البروتينية واطئة الكثافة (LDL) في مجموعه الحيوانات المعرضة للغذاء عالي الكوليستيرول (G2) التي بلغت (50.51) و (47.94) وانخفاض في (G3) حيث بلغت (24.9) و(43.85) من بعد ثلاثة وست اسابيع على التوالي والتي لم تصل الى حد المعنوية وانخفاض معنوي في (G4) حيث بلغت (15.43) و (13.64) مقارنة مع (G2) لكنها لم تختلف معنويا عن (G1) التي بلغت (15.50) و (20.26) من بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة على التوالي

الجدول (4-4) يبين معدل تركيز الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة(LDL)في مصل اناث الارانب البالغة.

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	وسط	نهاية	معدل المعاملات
G1 السيطرة	15.50± 0.29 E	20.26± 1.56 D	17.88± 1.09 C
G2 معاملة بالكوليسترول	50.51± 1.06 A	47.94±0.94 AB	49.22±0.97 A
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	24.9± 1.37 C	43.85± 0.68 B	34.39± 3.23 B
G4 معاملة بالهرمون فقط	15.43± 2.71 E	13.64± 1.46 E	14.54±1.48 D
معدل الفترة الزمنية	26.59± 3.37 B	31.42 ± 3.42 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	2.9194	2.0643	4.1286

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).

المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

5-1-4 التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية واطئة الكثافة جدا (VLDL) في مصل الدم (mg/dl)

يلاحظ في الجدول (5-4) الى وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في معدل تركيز الشحوم البروتينية واطئة الكثافة (VLDL) في مصل اناث الارانب التي جرعت الكوليسترول في المجموعة G2 بالمقارنة مع باقي المجاميع ، ولوحظ وجود فروقا معنوية بين المجوعتين (G2) و(G3) عند المقارنة مع بعضهما البعض حيث بلغت معدلاتهما (8.31) و (7.13) على التوالي بعد ثلاثة اسابيع من التجربة ، وبلغت (23.83) و(14.40) على التوالي و بعد ست اسابيع من التجربة. بالمقارنة مع مجموعة السيطرة في معدل VLDL في مصل الدم والتي بلغت (4.30) (7.08) على التوالي من بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة و (G4) و التي بلغت معدلاتهم (3.86) و (7.66) بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة .

جدول (5-4) التغيرات في معدل تركيز الشحوم البروتينية واطئة الكثافة (VLDL) في مصل اناث الارانب البالغة.

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	4.30± 0.05 F	7.08±0.21 E	5.69±0.47 C
G2 معاملة بالكوليسترول	8.31± 0.14 C	23.83±0.14 A	16.07±16.07 A
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	7.13±0.20 E	14.40±0.13 B	10.76±1.21 B
G4 معاملة بالهرمون فقط	3.86±0.13 F	7.66±0.22 D	5.76±0.64 C
معدل الفترة الزمنية	5.90±0.42 B	10.59±1.55 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	0.3286	0.2323	0.4647

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05)
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

4-1-6التغيرات في معدل تركيز الكلوتاثيون Glutathione (GSH) في مصل الدم (mmol/l) .

اشارت النتائج الواضحة في الجدول (4-6) الى وجود انخفاض معنوي تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في معدل تركيز الكلوتاثيون في مجموعة المعاملة (G2) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة G1 بعد ثلاثة اسابيع حيث بلغت (20.96) و بعد ست اسابيع من التجربة بلغت (17.60)،في حين لوحظ وجود فروق معنوية بين G2 و G3 بعد سته اسابيع ولكنها اختلفت معنويا عن G1، بينما كان هناك ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال (P< 0.05) في تركيز (GSH) في مجموعة G3 (مجموعة اعطاء الهرمون مع الكوليسترول) والتي بلغت من بعد ثلاثة اسابيع(19.92) وبعد ست اسابيع من التجربة بلغت (34.35) مقارنة مع باقي المجاميع . ولم يلاحظ وجود فروق معنوية في G4 التي بلغت (22.64) و (20.42) من بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة على التوالي .

الجدول (4-6) يبين تأثير الكلوتاثيون GSH في مصل اناث الارانب البالغة.

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1	24.18±1.42 B	1.06 ± 24.14 B	24.16±0.83 B
G2	20.96±1.57 C	17.60±1.34 D	19.28±1.12 D
G3	19.92±0.29 CD	34.35± 0.19 A	27.14±2.41 A
G4	22.64± 0.57 BC	20.42±0.52 CD	21.53±0.52 C
معدل الفترة الزمنية	21.93± 0.63 B	24.13± 1.51 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	2.0612	1.4575	2.915

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

7-1-4التغيرات في معدل تركيز المالونداليهايد Malondialdehyde (MDA) في مصل الدم (Mmol/l)

يبين الجدول (4-7) الى وجود زيادة معنوية تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في معدل تركيز المالونداليهايد (MDA) في مجاميع اناث الارانب المعاملة بالكوليسترولG2 حيث بلغت بعد ثلاثة اسابيع بلغت (18.11) ومن بعد ست اسابيع من التجربة بلغت (19.28)على التوالي كما لوحظ وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في المجموعة G3 التي بلغت معدلاتها (12.22) (10.85) من بعد ثلاثة و ست اسابيع من التجربة على التوالي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة ، اما G4 التي بلغت (12.13) و (12.52) من بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة على التوالي .

الجدول (4-7) يبين معدل تركيز المالونداليهايد(MDA) في مصل اناث الارانب البالغة.

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	12.72±0.25 C	15.66±0.36 B	14.19±0.53 B
G2 معاملة بالكوليسترول	18.11± 0.43 A	19.28± 0.37 A	18.69 ±0.33 A
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	12.22± 0.59 C	10.85± 0.53 D	11.54±0.44 C
G4 معاملة بالهرمون فقط	12.13± 0.49 C	12.52±0.34 C	12.33±0.29 C
معدل الفترة الزمنية	13.79± 0.61 B	14.58± 0.76 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	0.8912	0.6302	1.2604

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنوي.

4-1-8 تأثير معدل تركيز انزيم النتريك اوكسايد Nitric oxide في مصل الدم (g/mmol)

بينت نتائج الدراسة الحالية في الجدول (4-8) وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال ($P < 0.05$) في تركيز معدل انزيم النتريك اوكسايد في مصل الدم في المجموعة (G3) و(G4) حيث بلغت معدلاتهم (18.06) و (22.72) على التوالي ،بعد ثلاثة اسابيع من التجربة . وبعد ست اسابيع من تجربة بلغت (30.67) و (55.80) على التوالي مقارنه مع مجموعة السيطرة (G1) والمجموعة الثانية (G2) والتي بلغت (15.22) بعد ثلاثة اسابيع من التجربة ، و بعد ست اسابيع من التجربة بلغت (12.76) .

جدول (4--8) يبين تأثير معدل انزيم النتريك اوكسيد (NO) في مصل اناث الارانب البالغة.

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	24.05±0.38 C	29.14±0.24 B	26.59±0.87 B
G2 معاملة بالكوليسترول	15.22±1.22 E	12.76±1.03 F	13.99±0.86 D
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	18.06±0.51 D	30.67± 0.49 B	24.36±2.12 C
G4 معاملة بالهرمون فقط	22.72±0.61 C	55.80±1.21 A	39.26±5.54 A
معدل الفترة الزمنية	20.01±0.88 A	32.09± 3.54 B	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	1.6335	1.1551	2.3101

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال ($P < 0.05$).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

4-1-9التغيرات في معدل تركيز هرمون DHEA,S في مصل الدم (mg/ml) .

اشارت النتائج في الجدول(4-9)الى وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في معدل تركيز هرمون DHEA,S في مجاميع المعاملة (G3) و(G4) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (G1) حيث بلغت معدلاتهم (28.50) و (34.46) على التوالي بعد ثلاثة اسابيع من التجربة ، اما بعد ستة اسابيع بلغت (35.06) و(54.94) على التوالي ، ، في حين لوحظ انخفاض معنوي في المجموعة G2 مقارنة مع G4,G3 التي بلغت معدلاتهم (23.75) و(25.02) على التوالي من بعد ست اسابيع من التجربة .

الجدول (4-9) يبين تأثير معدل تركيز DHEA,S في مصل اناث الارانب البالغة .

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	23.00± 2.48 D	24.78±1.50 CD	23.89±1.40 C
G2 معاملة بالكوليسترول	23.75±0.86 CD	25.02±0.50 CD	24.38±0.51 C
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	28.50±0.70 C	35.06 ±2.86 B	31.78±1.77 B
G4 معاملة بالهرمون فقط	34.46±3.09 B	54.92± 0.59 A	44.69±3.71 A
معدل الفترة الزمنية	27.43±1.41 B	34.94 ±2.91 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	3.8174	2.6993	5.3986

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا.

4-1-10التغيرات في معدل تركيز الاستروجين Estrogen (E2) في مصل الدم(mg/ml) .

اشارت النتائج الواضحة في الجدول (4-10) الى وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال($P < 0.05$) في معدل تركيز الأستروجين Estrogen (E2) في مجاميع المعاملة بالهرمون (G3) و (G4) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة ومجموعة المعاملة بالكوليسترول . بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة .

الجدول (4-10) يبين تأثير الأستروجين Estrogen (E2) في مصل اناث الارانب البالغة.

الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	81.11±1.76 C	79.78±1.53 C	80.45±1.12 BC
G2 معاملة بالكوليسترول	83.20±4.10 C	72.00± 0.0943 C	77.60±2.72 C
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	78.76±1.85 C	99.46±99.46 B	89.11±3.77 B
G4 معاملة بالهرمون فقط	85.31±0.56 BC	122.44±13.76 A	103.87±8.97 A
معدل الفترة الزمنية	82.09±1.24 B	93.42±5.52 B	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	10.767	7.6134	15.227

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال ($P < 0.05$).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا .

4-1-11التغيرات في معدل تركيز البروجيسترون Progesterone في مصل الدم(mg/ml) .

اشارت النتائج الواضحة في الجدول(4-11) الى وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال(P < 0.05) في معدل تركيز البروجستيرون في مجموعة المعاملة (G3) و (G4) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة بلغت معدلاتهم (78.76) و (99.46) على التوالي ، اما مجموعة السيطرة بلغت (81.11) من بعد ستة اسابيع من التجربة. ولوحظ وجود انخفاض معنوي تحت مستوى احتمال (P < 0.05) في G2 مقارنة مع باقي المجاميع .

الجدول (4-11) معدل تركيز هرمون البروجيسترون Progesterone في مصل اناث الارانب البالغة.

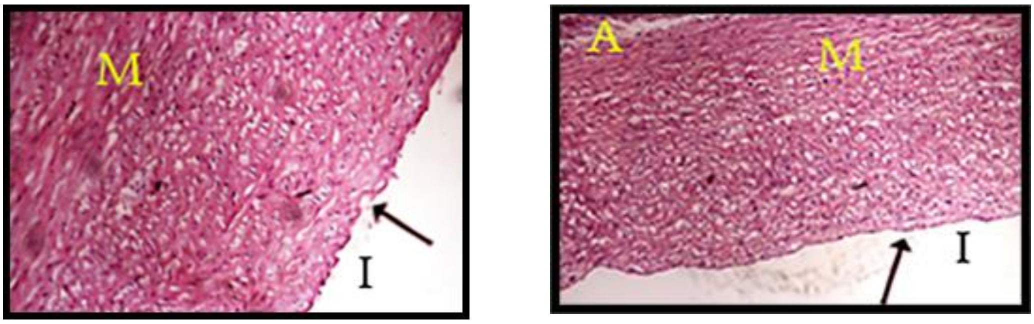
الفترة الزمنية S.E ± Means / المعاملات	بعد ثلاثة اسابيع	بعد ستة اسابيع	معدل المعاملات
G1 السيطرة	1.92 ± 0.52 AB	2.17 ± 0.77 AB	2.04 ± 0.44 A
G2 معاملة بالكوليسترول	0.88 ± 0.25 BC	0.27± 0.01 C	0.57 ± 0.15 B
G3 معاملة بالكوليسترول مع الهرمون	0.65 ± 0.16 BC	3.36± 1.15 A	2.01 ± 0.71 A
G4 معاملة بالهرمون فقط	0.33± 0.05 C	3.36 ± 0.36 A	1.81 ± 0.52 A
معدل الفترة الزمنية	0.94± 0.19 B	2.27 ± 0.43 A	
LSD	المعاملات	الفترة الزمنية	التداخل
	1.1224	0.7937	1.5874

SE ± Average ، تحت مستوى احتمال (P < 0.05).
المتوسطات التي تحمل حروف مشتركة او متشابهة لا تختلف معنويا.

2-1-4 التغيرات النسجية :

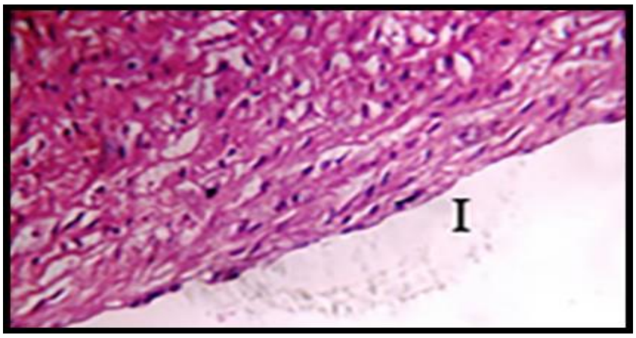
1-2-1-4 تأثير غذاء الكوليسترول والهرمون على نسيج الشريان الابهر

يلاحظ في الصورة (1-1) مقطع اعتيادي للشريان في مجموعة السيطرة .اما الصورة (1-2) يلاحظ فيها تأثير التجريع الفموي لغذاء الكوليسترول 1.5 غم / 100غم من الغذاء ولمدة ستة اسابيع ، عدم انتظام البطانة الداخلية ، وظهور للخيوط الدهنية، وتراكم الدهون وارتشاح الخلايا الالتهابية ، وظهور الخلايا الرغوية مقارنة مع مجموعة السيطرة. اما الصورة (1-3) تمثل تأثير الكوليسترول مع الهرمون على نسيج الشريان حيث يظهر فيها وضوح الغشاء المطاطي عدم انتظام البطانة الداخلية ، وتراكم قليل للخلايا الدهنية ، وظهور عدد قليل من الخلايا الرغوية . والصورة (1-4) تمثل تأثير الهرمون فقط على نسيج الشريان يظهر فيها وضوح طبقات الشريان النسيجية (اقرب الى النسيج الطبيعي) وعدم ملاحظة تغيرات واضحة في النسيج .



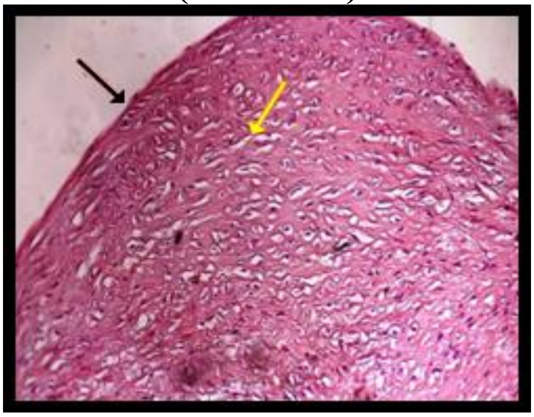
صورة رقم (1-1) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب يوضح فيه طبقات الشريان الطبيعية لمجموعة السيطرة ، ظهر فيها انتظام البطانة الداخلية (A) والغلالة الوسطى (M) والغلالة الخارجية (I)

(H&E 20X)

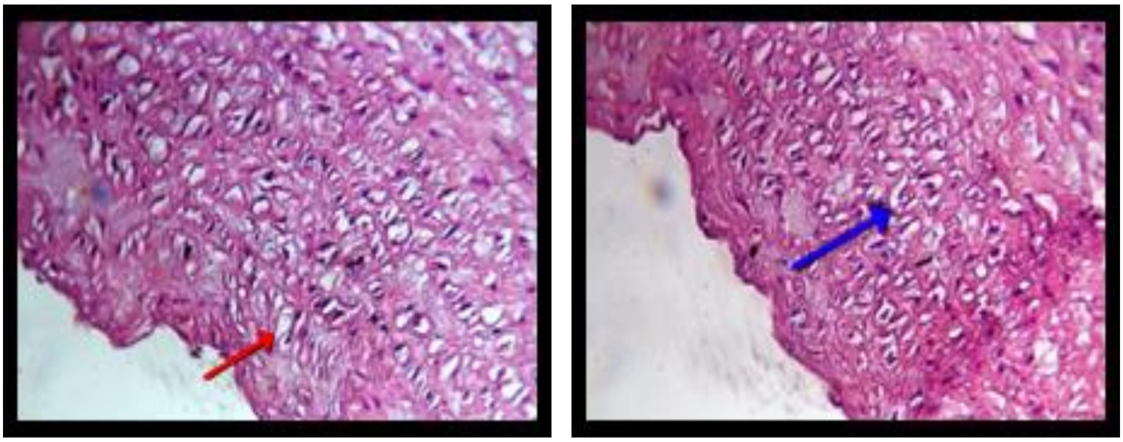


صورة رقم (1-1) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب يوضح فيه طبقات الشريان الطبيعية لمجموعة السيطرة، ظهر فيها انتظام البطانة الداخلية (A) والغلالة الوسطى (M)

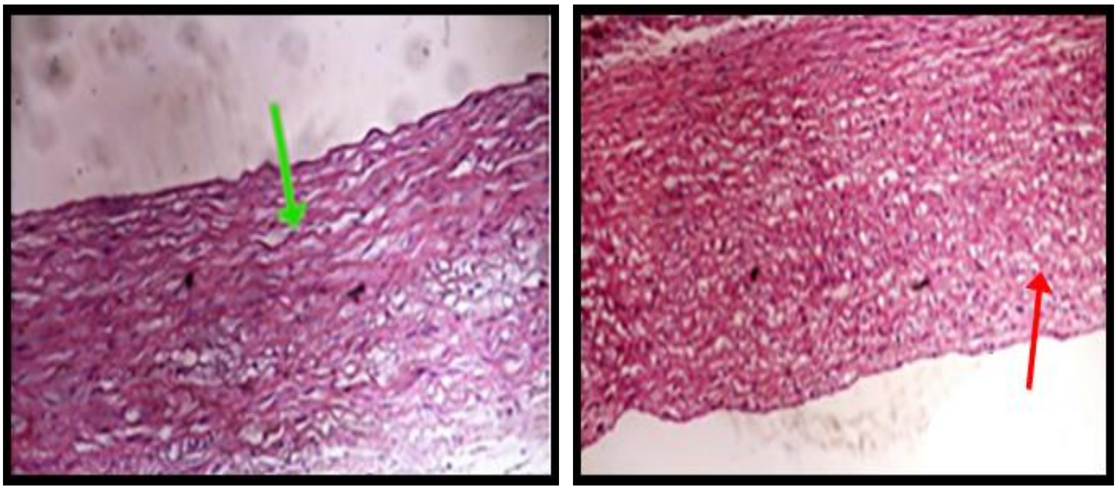
والغلالة الخارجية (I)
(H&E 40X)



صورة رقم (1-2) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5 غم/ 100غم من الغذاء، ظهر فيها عدم انتظام البطانة الداخلية (السهم اسود) وظهور الخيوط الدهنية (السهم الأصفر)
(H&E 200X)

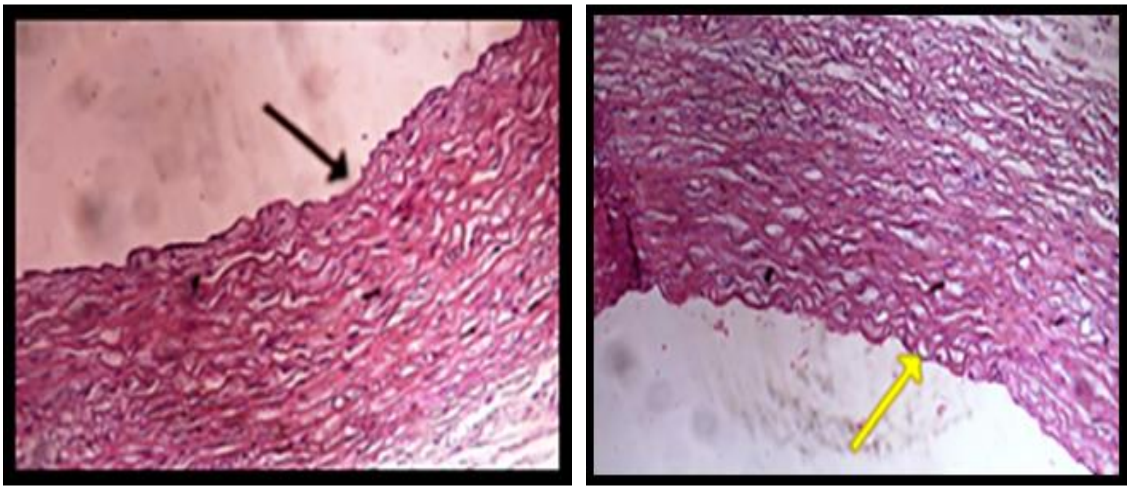


صورة رقم (1-2) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5 غم/ 100غم من الغذاء، ظهر فيها تراكم الدهون (السهم الأحمر) وظهور الخلايا الرغوية foamy cell (السهم الأزرق)
(H&E 40X)



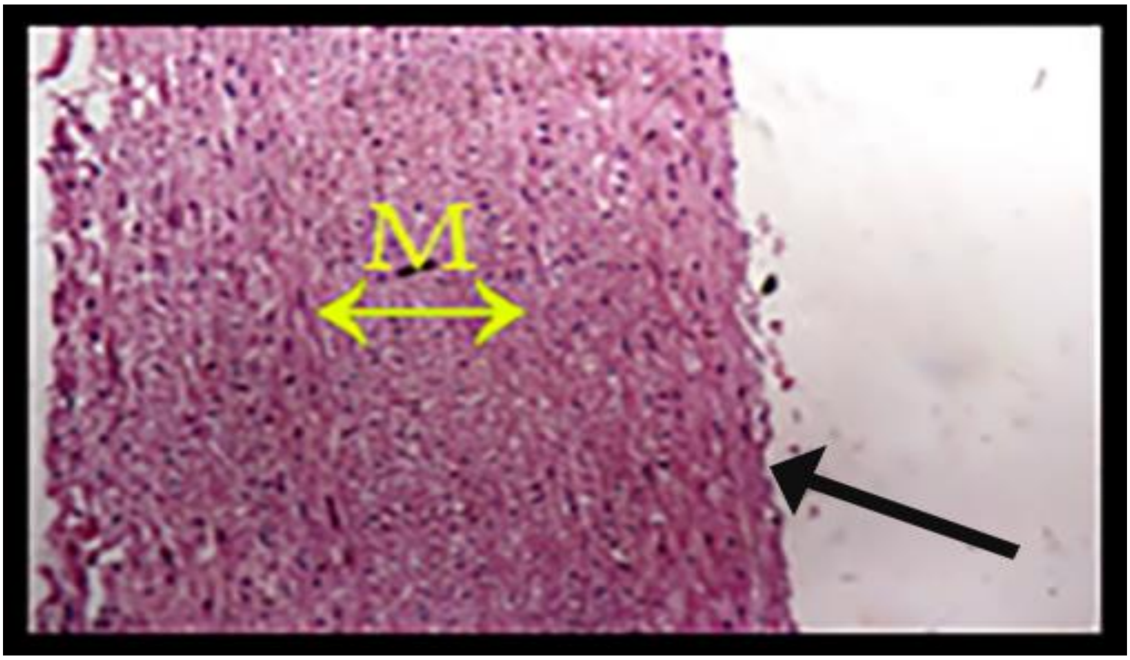
صورة رقم (3-1) مقطع نسيجي للشريان الابهر لمجموعة اناث الارانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5 غم/ 100غم من الغذاء مع الهرمون بـ 2 غم /كغم، ظهر فيها وضوح الغشاء المطاطي (السهم الأخضر) وظهور عدد قليل من الخلايا الرغوية (السهم الأحمر)

(H&E 20X)

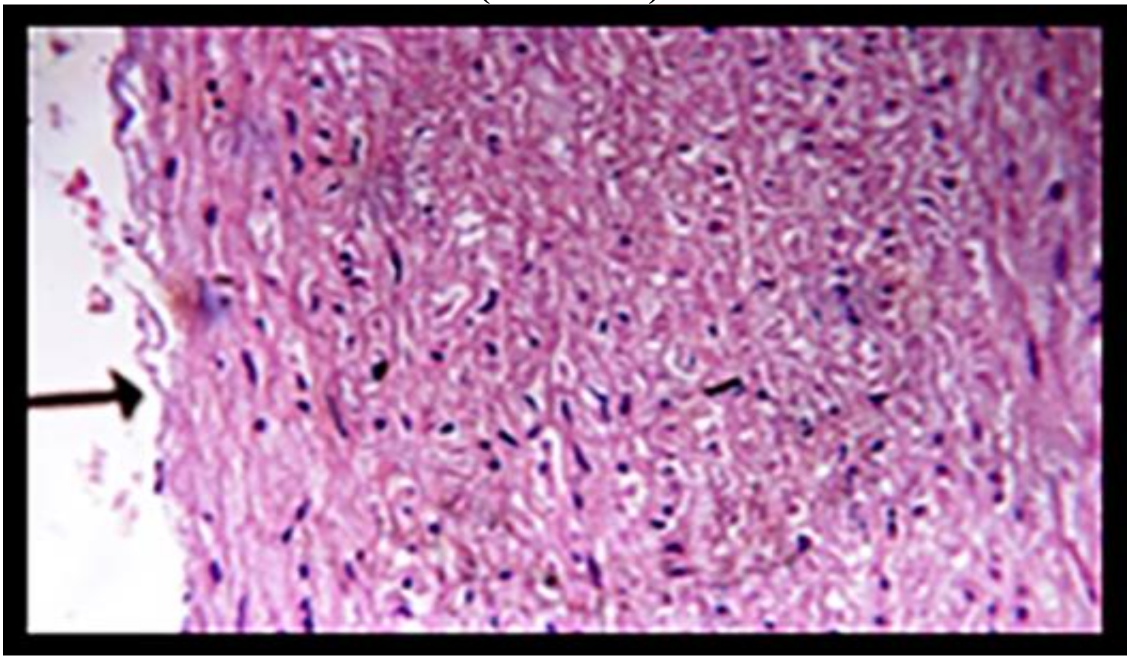


صورة رقم (3-1) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5 غم/ 100غم من الغذاء مع الهرمون بـ 2 غم /كغم، ظهر فيها وعدم انتظام البطانة الداخلية (السهم اسود) وتراكم قليل للخلايا الدهنية (السهم الأصفر)

(H&E 40X)



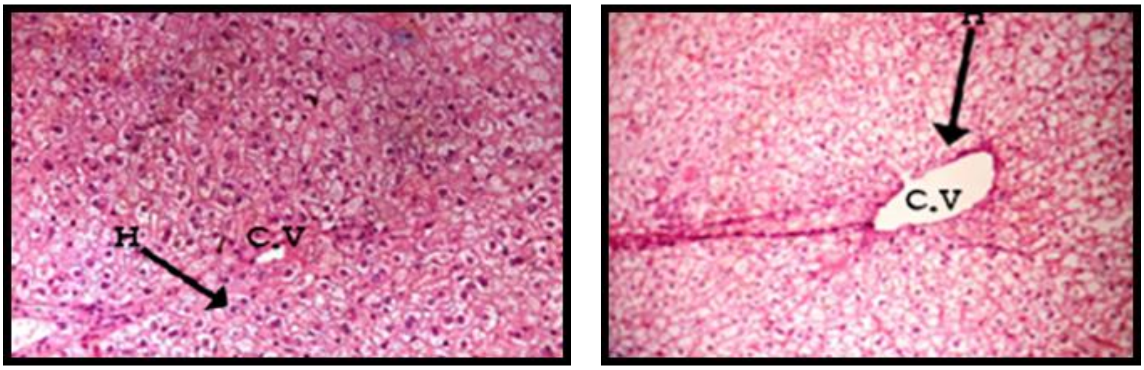
صورة رقم (1-4) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالهرمون بـ 2 غم/ كغم، وضوح طبقات الشريان النسيجية (اقرب الى النسيج الطبيعي) وعدم ملاحظة تغيرات واضحة في النسيج (السهم الأصفر M) (مع السهم الأسود)
(H&E 20X)



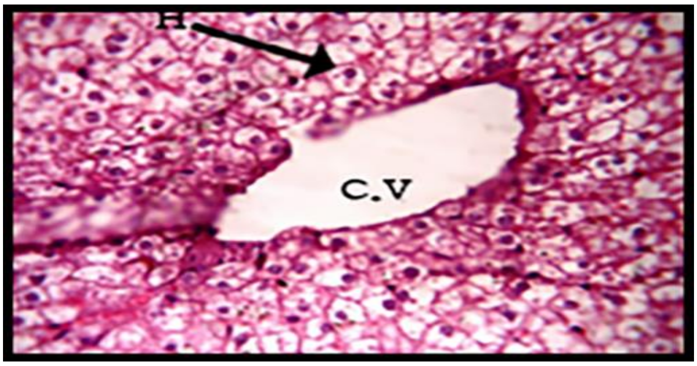
صورة رقم (1-4) مقطع نسيجي للشريان الابهر في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالهرمون بـ 2 غم/ كغم، وضوح طبقات الشريان النسيجية (اقرب الى النسيج الطبيعي) وعدم ملاحظة تغيرات واضحة في النسيج (السهم الأصفر M) (مع السهم الأسود)
(H&E 40X)

4-1-2-2 تأثير غذاء الكوليسترول والهرمون على نسيج الكبد

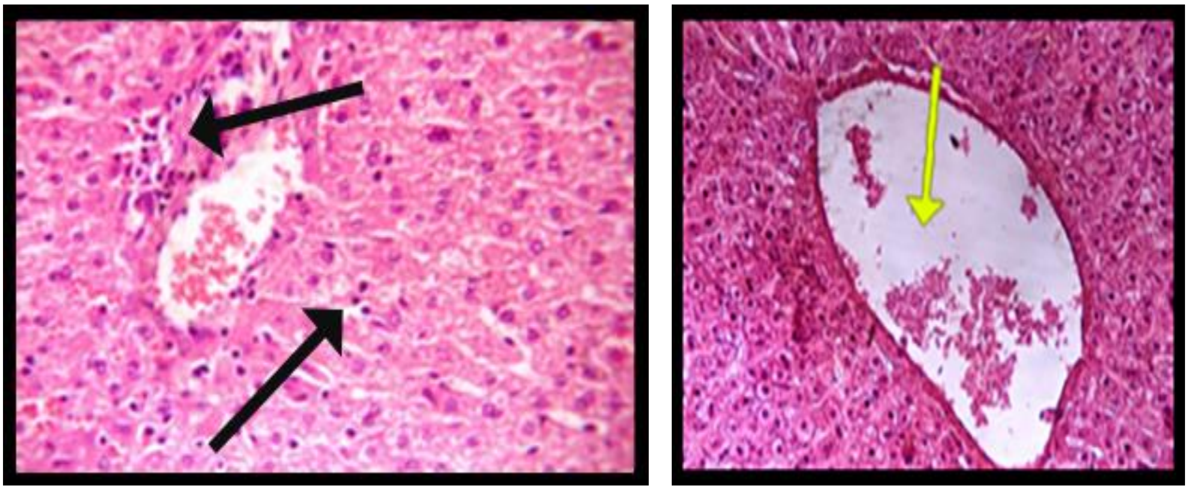
يلاحظ من الصورة مجموعة السيطرة الصورة (1-5) التي تمثل نسيج الكبد الطبيعي والصورة (1-6) تأثير غذاء الكوليسترول على نسيج الكبد حيث يلاحظ فيها توسع الجيبانيات الدموية ، واحتقان الوريد المركزي، وارتشاح الخلايا الالتهابية ،مقارنة اما الصورة الرقم (6-2) تمثل نسيج الكبد في مجموعة الحيوانات المعرضة لغذاء الكوليسترول حيث يلاحظ ظهور حويصلات دهنية او قطيرات دهنية ، وتنكس دهني واضح ، واحتقان الوريد المركزي ، وارتشاح الخلايا الالتهابية ، اما الصورة (1-7) يلاحظ فيها تنكس دهني قليل داخل النسيج ، واحتقان خفيف حول الوريد المركزي ، ، وتوسع للجيبانيات الدموية ، وظهور الخلايا الرغوية . والصورة (1-8) يلاحظ فيها احتقان خفيف حول الوريد المركزي ، وارتشاح خفيف حول الوريد المركزي .



صورة رقم (1-5) مقطع طولي لنسيج الكبد في مجموعة السيطرة في اناث الارانب البالغة توضح الوريد المركزي (C.V)، والخلايا الكبدية (H) مرتبة بشكل شعاعي حول الوريد المركزي (H&E 10X 20X)

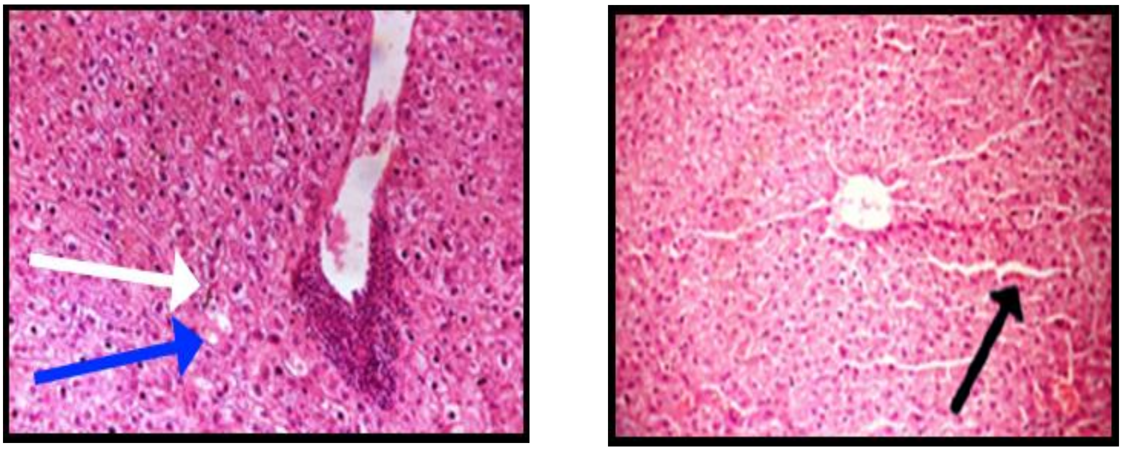


صورة رقم (1-5) مقطع طولي لنسيج الكبد في مجموعة السيطرة في اناث الارانب البالغة توضح الوريد المركزي (C.V)، والخلايا الكبدية (H) مرتبة بشكل شعاعي حول الوريد المركزي (H&E 40X)



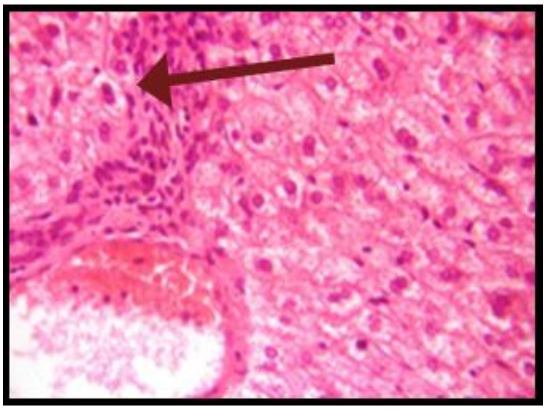
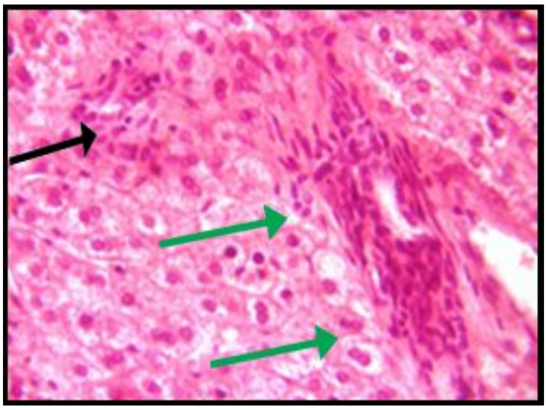
صورة رقم (6-1) مقطع طولي لنسيج الكبد في مجموعة اناث الارانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100غم من الغذاء، ظهر فيها ارتشاح وتغلظ الأنوية و ارتشاح واضح جدا (السهمين الأسود) واحتقان الوريد المركزي (السهم الأصفر)

(H&E 20X)



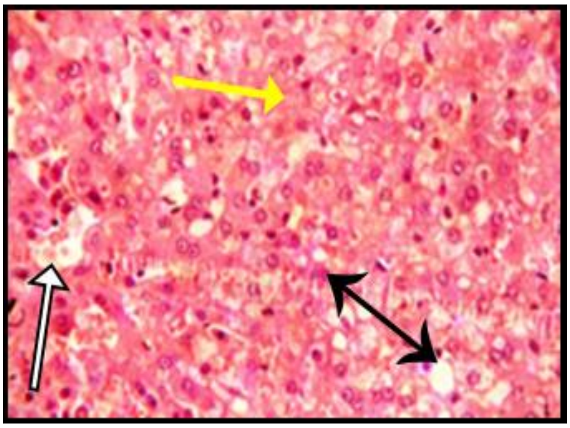
صورة رقم (6-1) مقطع طولي لنسيج الكبد في مجموعة اناث الارانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100غم من الغذاء، ظهر فيها تنكس الخلايا الكبدية (السهم الأزرق) عدم انتظام الحبال الكبدية (السهم الأبيض) وتوسع للجيبانيات الدموية (السهم الاسود)

(H&E 40X)

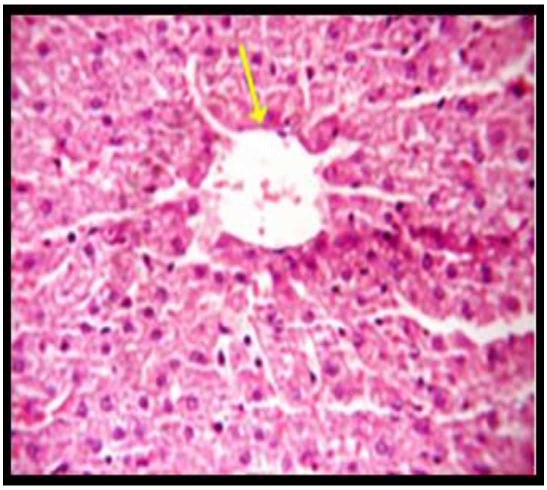
صورة رقم (6-2) مقطع عرضي لنسيج الكبد في مجموعة إناث الأرانب التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100غم من الغذاء، ارتشاح شديد (السهم الأسود) وتنخر واضح للخلايا (السهم الأخضر) وارتشاح شديد للخلايا الالتهابية (السهم البني)

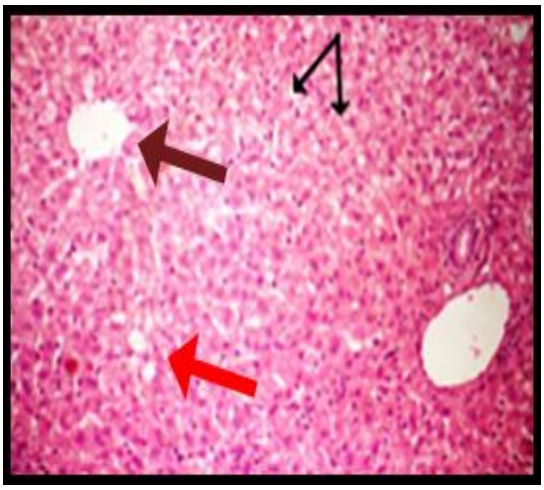
(H&E 20X)



صورة رقم (6-2) مقطع طولي لنسيج الكبد في مجموعة إناث الأرانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100غم من الغذاء، عدم انتظام الحبال الكبدية (السهم الأصفر) وتوسع واحتقان الجيبانيات (السهم الأبيض) تنكس دهني (السهم الأسود ذو الرأسين)

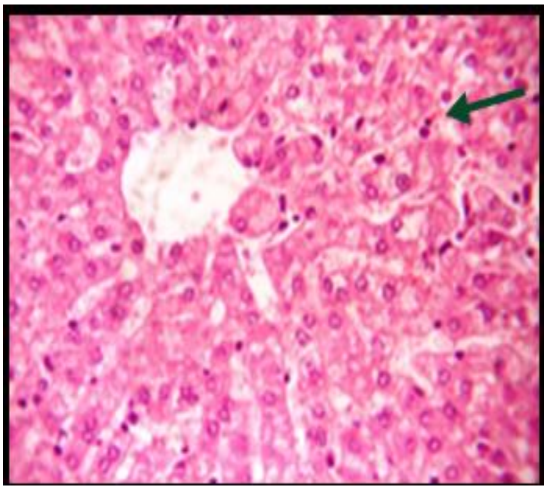
(H&E 40X)





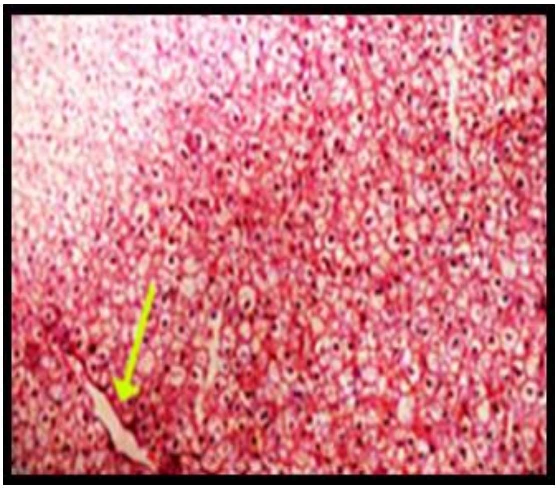
صورة رقم (7-1) مقطع طولي لنسيج الكبد في إناث الأرانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100غم من الغذاء مع الهرمون 2غم /كغم، ظهر فيها تنكس دهني قليل داخل النسيج (السهمين الأسود) وعدم احتقان الوريد المركزي (السهم الأصفر) ووضوح الوريد المركزي (السهم البني) وتنكس دهني (السهم الأحمر)

(H&E 20X)



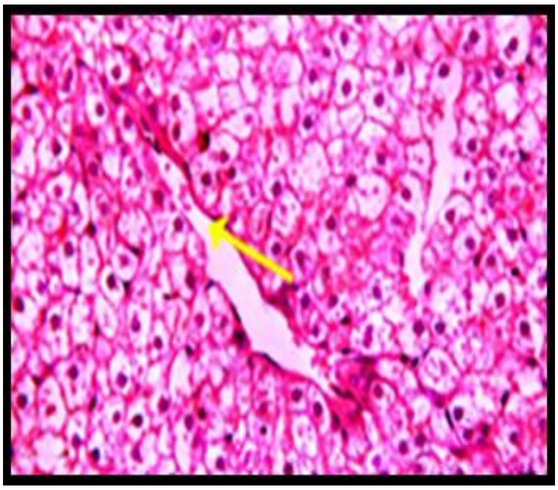
صورة رقم (7-1) مقطع طولي لنسيج الكبد في إناث الأرانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/100غم من الغذاء مع الهرمون 2غم /كغم، ظهور خلايا (Kuffer Cell) (السهم الأخضر)

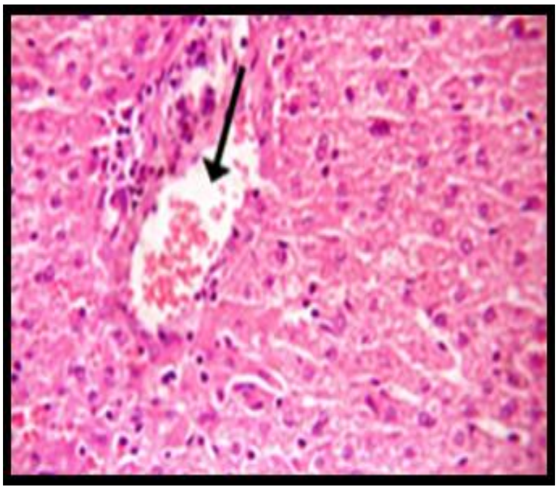
(H&E 40X)



صورة رقم (1-8) مقطع طولي لنسيج الكبد في مجموعة اناث الارانب البالغة التي جرعت بالهرمون فقط 2غم /كغم ، ظهر فيها ارتشاح خفيف حول الوريد المركزي (السهم الأصفر)

(H&E 20X)



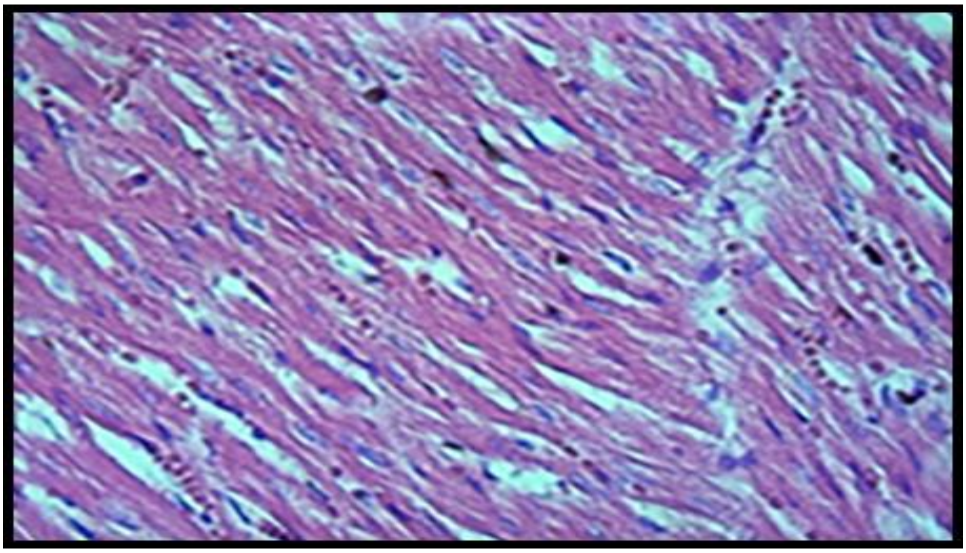


صورة رقم (1-8) مقطع طولي لنسيج الكبد في مجموعة اناث الارانب البالغة التي جرعت بالهرمون فقط 2غم /كغم ، ظهر فيها احتقان الوريد المركزي (السهم الأسود) وارتشاح خفيف حول الوريد المركزي (السهم الأصفر)

(H&E 40X)

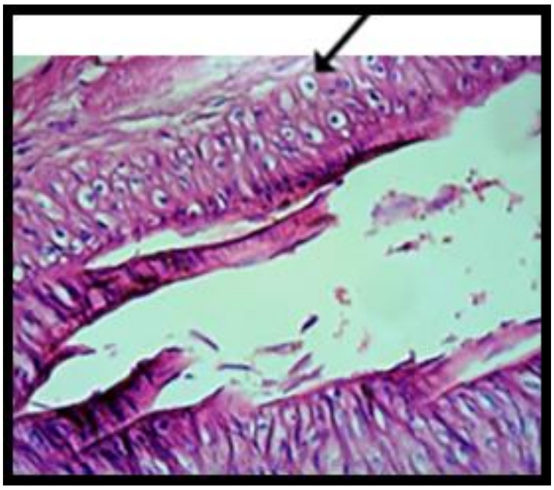
3-2-1-4 تأثير غذاء الكوليسترول والهرمون على نسيج القلب

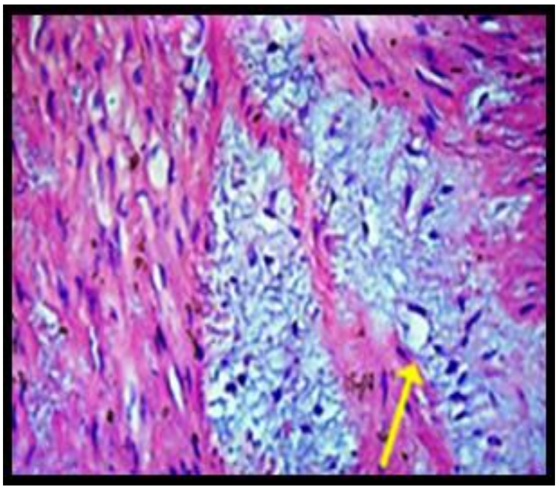
يلاحظ في الصورة مجموعة السيطرة(1-9) والصورة (1-10) تأثير تجريع الكوليسترول عن طريق الفم ل 1.5 غم/ 100غم من الغذاء على نسيج القلب حيث يلاحظ فيها وضوح الخلايا الرغوية ، وترسب لمادة الكوليسترول ، ووضوح احتقان الاوعية الدموية ، وتغيرات في جدار الوعاء الدموي وترسب الخلايا الدهنية ،اما الصورة (1-11) يلاحظ فيها ارتشاح الخلايا الالتهابية ، وتجمعات دهنية خفيفة ، مع وجود تليف في خلايا العضلة القلبية . والصورة (1-12) فتمثل نسيج عضلة القلب يلاحظ فيها ارتشاح قليل للخلايا الالتهابية ، وتليف في الخلايا القلبية .



صورة رقم (1-9) مقطع عرضي لنسيج القلب في مجموعة اناث الارانب البالغة مجموعة السيطرة

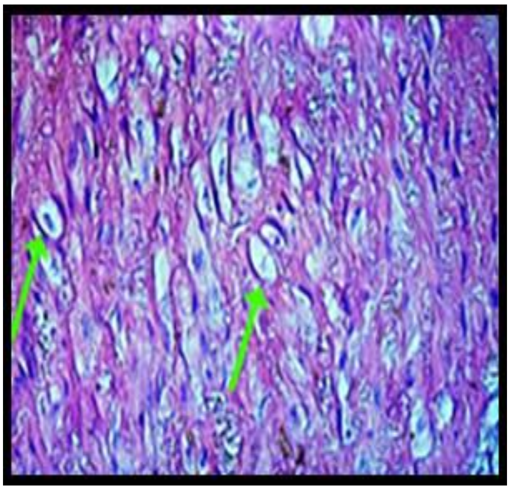
(H&E 20X)





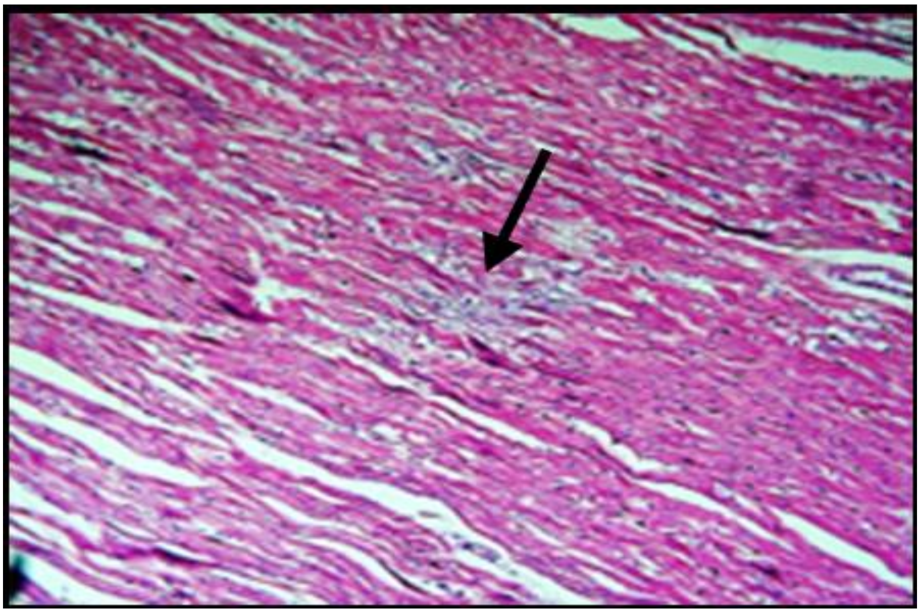
صورة رقم (1-10) مقطع عرضي لنسيج القلب في مجموعة اناث الارانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/ 100كغم من الغذاء ظهر فيها ، وضوح الخلايا الرغوية (السهم الأسود) وترسب بمادة الكوليسترول (السهم الأصفر)

(H&E 20X)



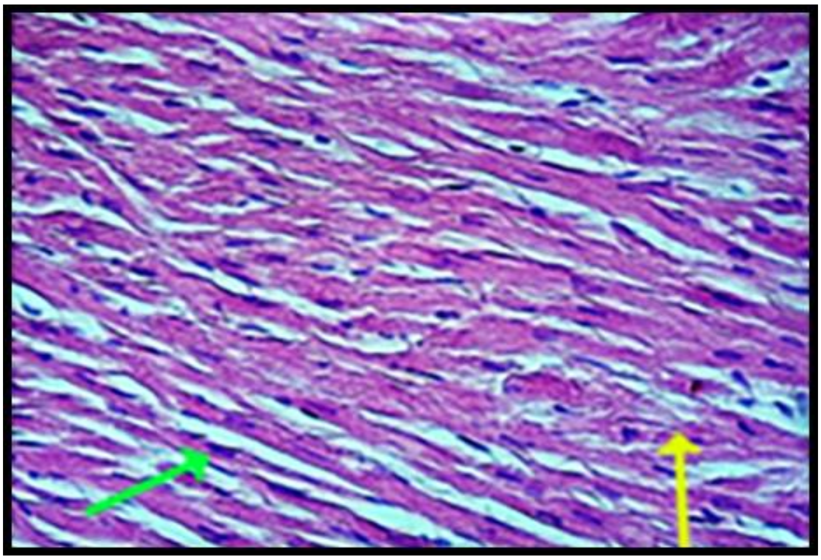
صورة رقم (1-10) مقطع عرضي لنسيج القلب في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/ 100غم من الغذاء ظهر فيها تغيرات في جدار الوعاء الدموي وترسب الخلايا الدهنية (السهم الأخضر)

(H&E 40X)



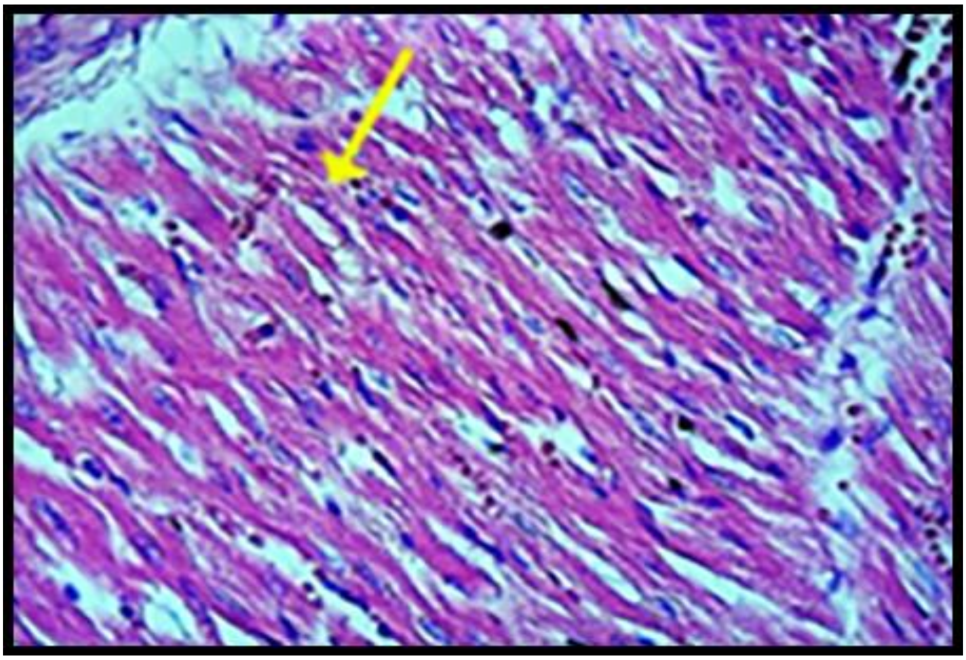
صورة رقم (1-11) مقطع عرضي لنسيجي القلب في مجموعة اناث الارانب البالغة التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/ 100غم من الغذاء مع الهرمون 2غم /كغم ظهر فيها ، ارتشاح الخلايا الالتهابية (السهم الأسود)

(H&E 20X)



صورة رقم (1-11) مقطع عرضي لنسيج القلب في اناث الارانب لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالكوليسترول بـ 1.5غم/ 100غم من الغذاء مع الهرمون 2غم /كغم ظهر فيها وتجمعات دهنية خفيفة (السهم الاخضر) مع وجود تليف في الخلايا (السهم الاصفر)

(H&E 40X)



صورة رقم (1-12) مقطع عرضي لنسيجي القلب في اناث الارانب البالغة لمجموعة الحيوانات التي جرعت بالهرمون

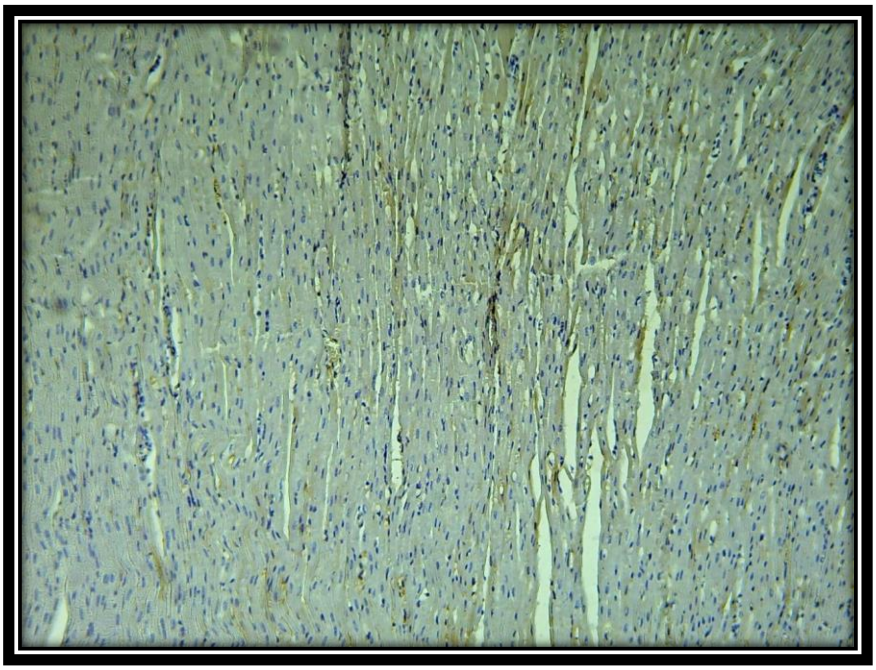
فقط 2غم /كغم

(H&E 40X)

4-2-1-4 التعبير الكيميائي النسجي المناعي IHC لمستقبل الاستروجين على عضلة القلب -Immunohistochemistry of estrogen receptor Alpha(ER&)on Cardial muscle cell (Myocardia cyte)

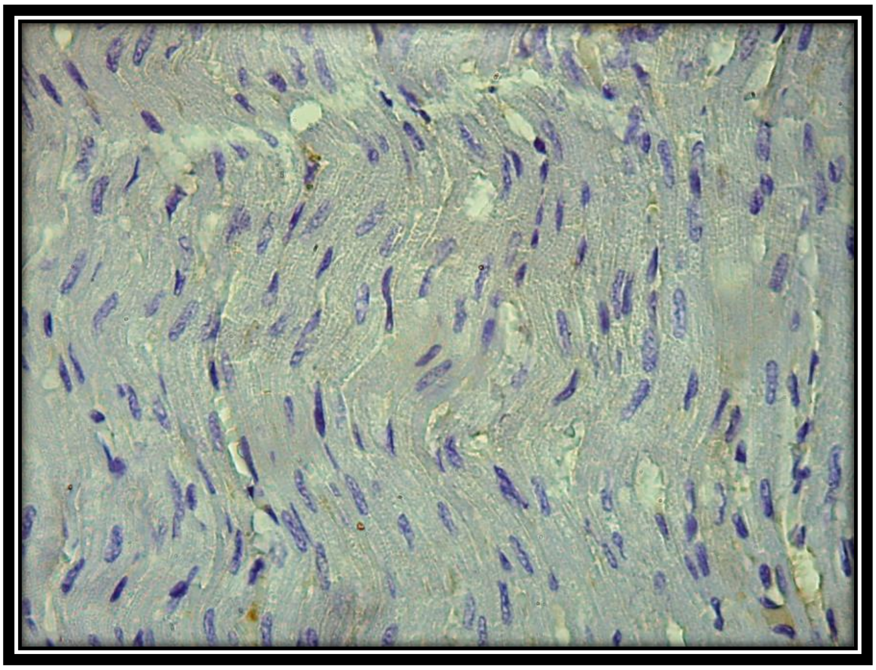
تأثير الكوليسترول على عضلة القلب على التعبير الكيمائي النسجي لمستقبل الاستروجين .

يلاحظ ان كثافة التصبيغ ونسبة الخلايا الايجابية positive score التي سجلت كانت عالية في مجموعة اعطاء الهرمون فقط G4 والمجموعة G3 (اعطاء الهرمون مع الكوليسترول) ايضا . وكانت ضعيفة في المجموعة G2 مقارنة مع G1 التي كانت كثافة التصبيغ فيها متوسطة.



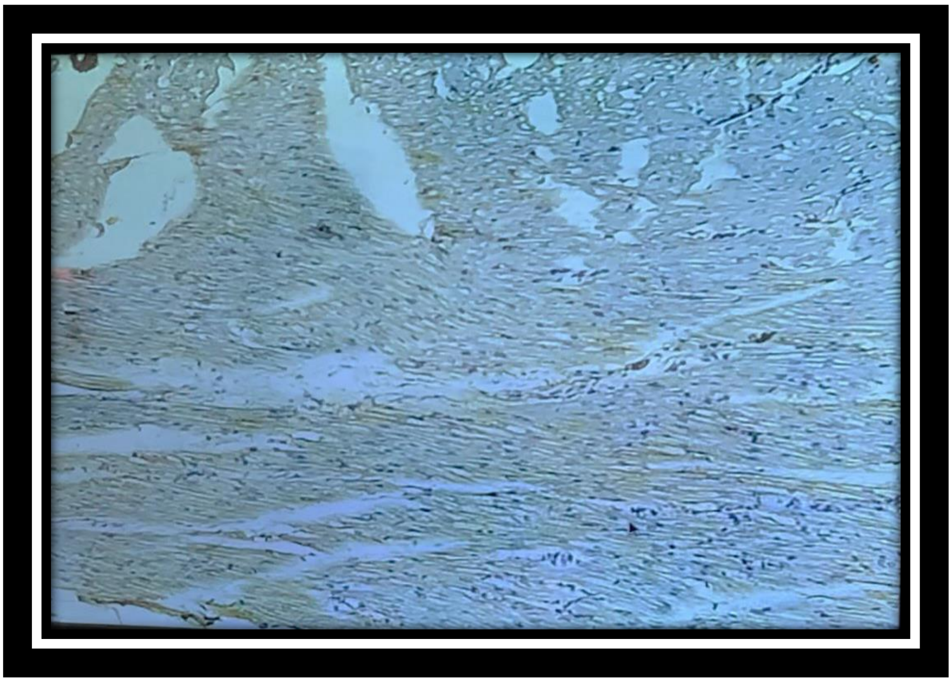
صورة رقم (1-13) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة السيطرة تظهر تعبيراً متوسطاً

(10 X)



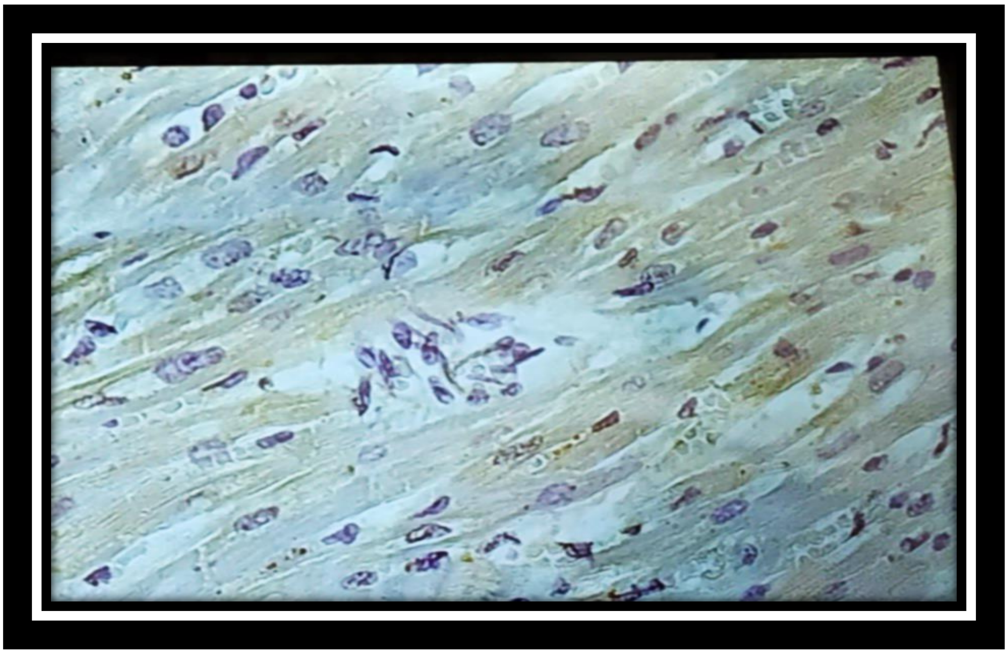
صورة رقم (1-14) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة السيطرة تظهر تعبيراً متوسطاً

(40 X)



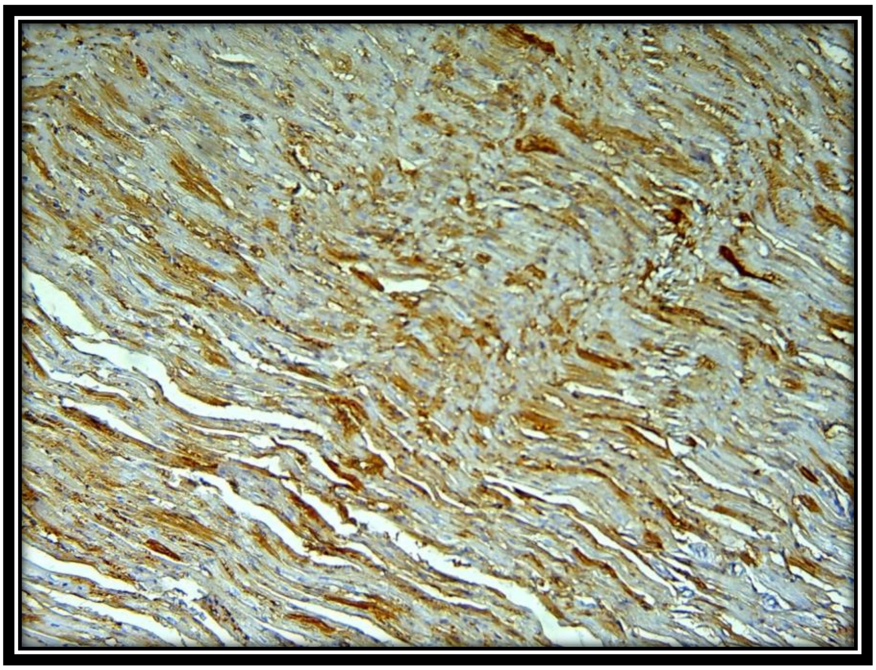
صورة رقم (1-15) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة الكوليسترول تظهر تعبيراً ضعيفا

(10 X)

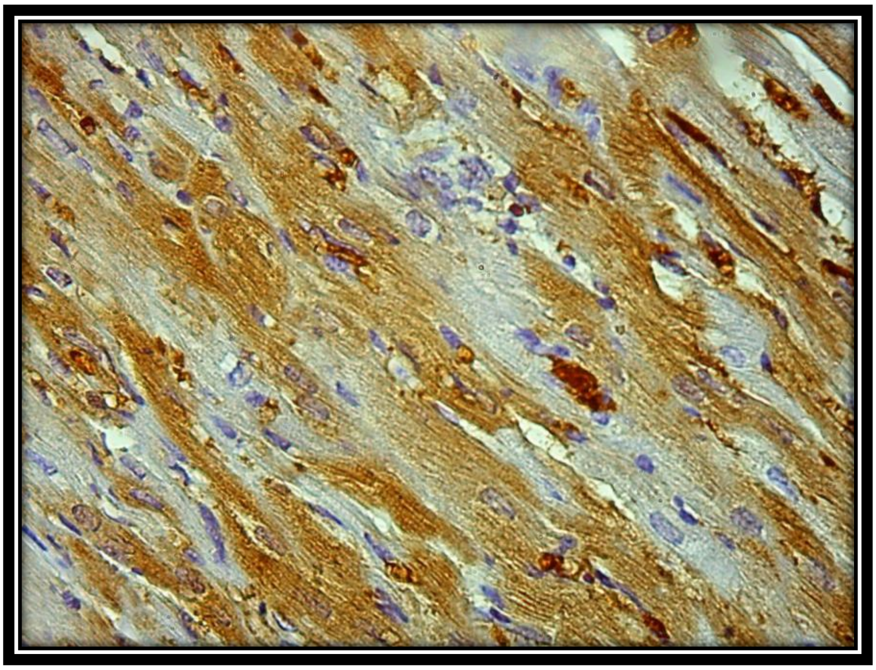


صورة رقم (1-16) مقطع نسيجي يبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين لمجموعة الكوليسترول تظهر تعبيراً ضعيفا

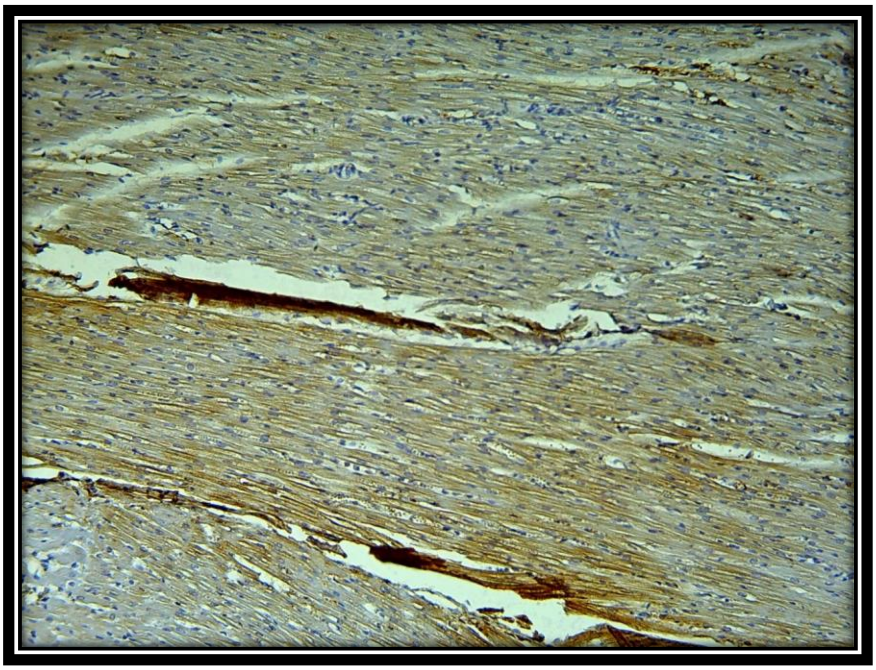
(40 X)



صورة رقم (1-17) مقطع نسيجي لمجموعة الكوليسترول مع التجريع بالهرمون بـ 2غم/كغم DHEA تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين تظهر تعبيراً عالياً (X 10)

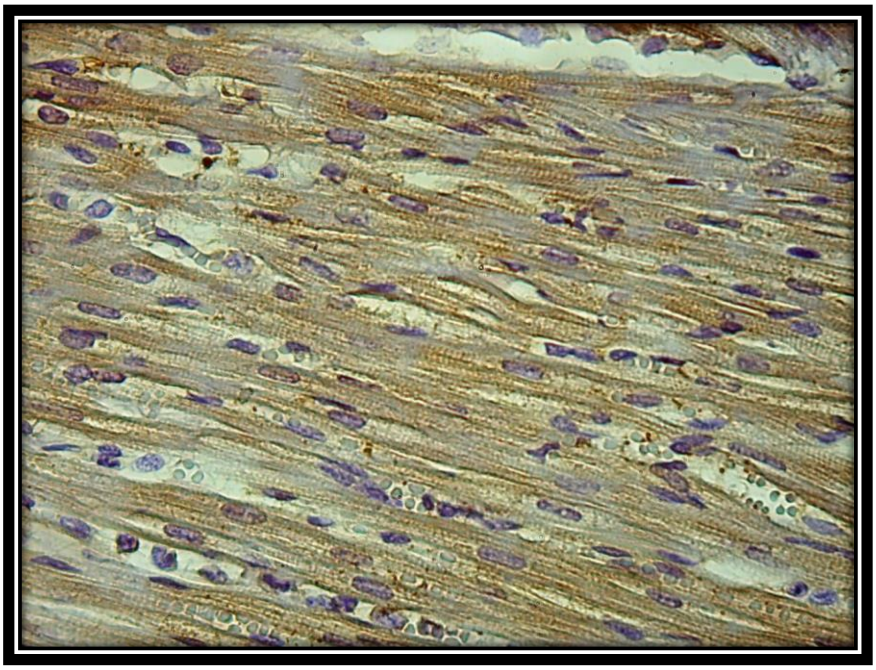


صورة رقم (1-18) مقطع نسيجي لمجموعة الكوليسترول مع التجريع بالهرمون بـ 2غم/كغم DHEA تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين تظهر تعبيراً عالياً (X 40)



صورة رقم (1-19) مقطع نسيجي لمجموعة التجريع بالهرمون بـ 2غم/كغم DHEA فقط تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين تظهر تعبيراً عالياً

(10 X)



صورة رقم (1- 20) مقطع نسيجي لمجموعة التجريع بالهرمون بـ 2غم/كغم DHEA فقط تبين التعبير الكيميائي المناعي النسجي IHC لمستقبل الاستروجين تظهر تعبيراً عالياً

(40 X)

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

5 - المناقشة Discussion

يعد تصلب الشرايين من الامراض الشائعة في العالم وتصيب عضلة القلب وجهاز الدوران الجهاز القلبي ، حيث تتميز بتضخم جدران الشرايين الكبيرة والمتوسطة والصغيرة ، ظهور افات التصلب الشرياني يعود الى اكسدة البروتينات LDL-C ، وان جزيئات ox- LDL-C من قبل الخلايا البلعمية ، مما يؤدي الى تفاعل الجزيئات الدهنية وتكوين الخلايا الرغوية والالتصاق بجدار الوعاء الدموي واختراقه من قبل الخلايا احادية النواة . يتبع ذالك تكوين السيتوكينات وعوامل النمو وهجرة وتكاثر الخلايا العضلية الملساء ، فضلا عن تكوين الآفات الوعائية المصحوبة بسدادة ليفيه وخثرة (Ross,1993) . ان التجريع الفموي للكوليسترول 1.5غم ولمده ست اسابيع ادى الى حدوث تغيرات نسيجية لبطانة الوعاء الدموي متمثلة ب ظهور عدم انتظام البطانة الداخلية وظهور الخيوط الدهنية وتراكم الدهون وارتشاح الخلايا الالتهابية وظهور الخلايا الرغوية صورة (1- 2) وهذا يتفق مع Yamakoshi *et al* ,2000; (Yip 2000;
(Amran *et al*, 2009;

ويعود سبب حدوث الاذى لبطانة الشريان الداخلية الى الاجهاد التأكسدي الناتج من الارتفاع في تراكيز العديد من جذور الاوكسجين الفعالة مثل جذور بيروكسيد الهيدروجين(H_2O_2) Hydrogen peroxide ، وجذور الهيدروكسيل hydroxyl radicle (OH) والسوبر اوكسايد Superoxidanion radical وبكميات تزيد عن قدرة الانسجة على مقاومة الجذور الحرة للتخلص منها مما يسبب تلفا وتدميرا في الانسجة (Halliwell, 1997)، حيث ان الاجهاد التأكسدي له دور مهم في تطور افات التصلب حيث تعمل انواع الاوكسجين الفعالة ROS على اكسدة المواد الدهنية LDL-c منتجة ox-LDL ولها خاصية سمية خلوية تؤدي الى انتاج كميات كبيرة من الجذور الحرة والتي تعتبر المفتاح المحفز لعملية التصلب الشرياني (Bryk *et al*., 2017) .

بينت نتائج الدراسة الحالية جملة من النتائج حول تأثير هورمون parasteron على تصلب الشرايين المستحدث على التغيرات الهرمونية والنسجية والتعبير الكيميائي المناعي النسجي ودور هورمون parasteron العلاجي في اناث الارانب البالغة .

5-1-1تأثير الكوليسترول والهرمون على معدل تركيز الكوليسترول والشحوم البروتينية عالية وواطئة الكثافة

اظهرت نتائج الدراسة الحالية كما مبين في الجداول اعلاه وجود ارتفاع معنوي تحت مستوى احتمال ($P < 0.05$) في معدل تركيز الكوليسترول TC والدهون الثلاثية TG والشحوم البروتينية واطئة الكثافة LDL-C والشحوم البروتينية واطئة الكثافة جدا VLDL-C وانخفاض معنوي تحت مستوى احتمال ($P < 0.05$) في معدل تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL-C بعد التجريع الفموي للكوليسترول 1.5 غم / 100غم من الغذاء يوميا للمجموعة G2 وهذا يتفق (Das and Ingole,2023) .

ترتبط المستويات المرتفعة من الكوليسترول والدهون الثلاثية بخطر الاصابة بأمراض القلب والاوعية الدموية حيث ان الغذاء عالي الكوليسترول يؤدي الى زيادة الاحماض الدهنية زيادة الاحماض الدهنية في الكبد فضلا عن زيادة في محتوى الكبد من الكوليستيرول ، وهذه الزيادة تؤدي الى خلل في فعالية مستقبلات LDL-C وبالتالي ارتفاع كل من LDL,VLDL,TG في مصل الدم . كما ان الارتفاع في الكوليسترول والشحوم البروتينية واطئة الكثافة ، يعود الى اضطرابات تحدث في العمليات الايضية نتيجة لخلل في عملية توازن الدهون Lipid homeostasis وهذا يؤدي الى تغير فعالية انزيم Hydroxyle-3-methylglutary -Co-enzyeme A(HMG-CoA) الذي يؤدي الى حدوث اضطرابات ل استرات الكوليسترول Cholesterol ester وهبوط فعالية انزيم Lipoprotein Lipase الذي يعمل على زيادة نسبة Free fatty acids (Kong *et al.*,2022) ، وهناك مستقبلات -LDL respecters المتواجدة في جدران الاوعية الدموية الحساسة لتجمع البروتينات الدهنية في البلازما مما يؤدي الى ارتفاع نسبة LDL-C في المصل ، وفي دراسة لوحظ ان هناك علاقة بين الكوليسترول الكليسيريدات الثلاثية وظهور افات تصلب الشريان ففي دراسة على الارانب التي اعطيت غذاء الكوليسترول لوحظ ان تجمع كبير لكميات من الشحوم في البطانة الداخلية للأوعية الدموية وبالتالي ارتشاح للخلايا احادية النواه حيث تعمل على التهام تللك الشحوم

المكونة لخلايا foamy cell ، وتكاثر في خلايا العضلات الملساء الوعائية فتنتج بذالك لويحة التصلب (Frank and Fogelman, 1989).

يمكن القول ان مستوى تركيز HDL-C في مصل الدم بينهما علاقة عكسية مع تركيز LDL-C حيث ان LDL له دور في نقل الكوليسترول العكسي وبالتالي ينقله من الانسجة المحيطية الى الكبد ومن ثم فان الزيادة في LDL-C تؤدي الى فقدان تركيز HDL-C (yang *et al*., 2019) .

اما الانخفاض في معدل الكوليسترول والشحوم البروتينية واطئة الكثافة والدهون الثلاثية التي اظهرتها الدراسة بعد اعطاء الهرمون (بعد ثلاثة وست اسابيع من التجربة) وهذه الدراسة اتفقت مع دراسة (Qin *et al* .,2020) ، ويعود السبب الى ان استخدام (DHEA) كان له تأثير كبير على مستويات الكوليسترول . حيث ان هرمون (DHEA) هو هرمون ستيرويد التي تنتجه الغدة الكظرية ويعمل بمثابة مقدمة لهرمونات اخرى بما في ذالك هرمون التستوستيرون والاستروجين حيث يعمل الاستروجين ادوارا مختلفة في تأثيره على عملية التمثيل الغذائي . وان مكملات DHEA لها تأثير على خفض الدهون من خلال تأثيره على استقلاب الدهون عن طريق تعديل نشاط الانزيمات المشاركة في تخليق الكوليسترول والتمثيل الغذائي وهذا ما اشارات اليه دراسة (Srinivasan et al .,2009). هذا بالإضافة ان DHEA يؤثر بشكل غير مباشر على مستويات الكوليسترول عن طريق تغير التوازن الهرموني ومسارات الاشارات المتعلقة بتنظيم الدهون (Igwebuike *et al* ., 2008) .

ان الدراسة الحالية متفقة مع دراسة (Hamilton *et al* ., 2017) التي اظهرت ان الزيادة في مستويات هرمون الاستروجين والذي يمكن استقلابه الى اندر وجينات وإستروجينات نشطه في الجسم ، بما في ذالك التستوستيرون والاستراديول (نوع من الاستروجين)، من خلال توفير ركيزة لتخليق هرمون الاستروجين. ويلعب دور حاسم في تنظيم العمليات الفسيولوجية المختلفة للجسم بما في ذلك الصحة الانجابية وكثافة العظام ووظيفة القلب والاوعية الدموية (Tang *et al*., 2021) ، ويتم تصنيعه بشكل اساسي في الانسجة الدهنية يتم التوسط جزئيًا في الإجراءات الوقائية للقلب والأوعية الدموية للأستروجين عن طريق التأثير المباشر على جدار الوعاء الدموي. ينشط الأستروجين في كل من العضلات الملساء الوعائية والخلايا البطانية حيث تم تحديد مستقبلات الأستروجين المختصة وظيفيًا. يعزز إعطاء الأستروجين توسع الأوعية الدموية لدى البشر وفي حيوانات التجارب، وذلك جزئيًا عن طريق تحفيز تخليق البروستاسيكلين وأكسيد النيتريك، وكذلك عن طريق تقليل إنتاج عوامل مضيقه للأوعية مثل المنتجات المشتقة من إنزيمات الأكسدة الحلقية، وأنواع الأكسجين التفاعلية، والأنجيوتنسين II، والإندوثيلين -1.

في المختبر يشارك الأستروجين تأثيرًا مثبطًا مباشرًا على العضلات الملساء عن طريق تنشيط تدفق البوتاسيوم وتثبيط تدفق الكالسيوم. فضلا عن إلى ذلك، يمنع هرمون الاستروجين تكاثر خلايا العضلات الملساء الوعائية. في الجسم الحي، و يخفف سماكة الورم بعد الإصابة بآفات التصلب التي تحدث في حالات تصلب الشرايين. كما هو الحال بالنسبة لل ستيرويدات الأخرى، فإن تأثير الأستروجين على جدار الوعاء الدموي له مكون غير جينومي سريع يتضمن ظواهر غشائية، مثل تغيير نفاذية الغشاء الأيوني وتنشيط الإنزيمات المرتبطة بالغشاء، بالإضافة إلى التأثير الجينومي الكلاسيكي الذي يتضمن تنشيط مستقبلات هرمون الاستروجين والتعبير الجيني(Barret *et al*., 1991).

5-1-2 التغيرات في معدل تركيز الكلوتاثيون و المالونديهايد في اناث الارانب

اظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي في معدل تركيز الكلوتاثيون في المجموعة التي جرعت بالكوليسترول (G2) مقارنة مع G1 ، G4 في حين لوحظ وجود ارتفاع معنوي للكلوتاثيون في G3 (مجموعة الكوليسترول والهرمون معا) بعد ست اسابيع من التجربة وهذا اتفق مع (Jakob *et al*., 2023) .

بينما اوضحت نتائج الدراسة ارتفاع مستويات بيروكسيد الدهون المالونديهايد MDA في مجموعة G2 (التي جرعت بالكوليسترول) مقارنة مع G1 ، G4 هذا اتفق مع (Olaniyan *et al*., 2020) ، بينما لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين G3 ، G4 بعد ثلاثة اسابيع من التجربة في معدل تركيز المالونديهايد وهذا اتفق مع دراسة (Abdelazeime *et al* ., 2020)

يعد الكلوتاثيون احد اهم مضادات الاكسدة الداخلية في الجسم حيث يعمل كعامل مساعد للعديد من الانزيمات المسؤولة عن ازله سمية المركبات المؤكسدة مثل انزيم Glutathione . انخفاض مستوى (الكلوتاثيون) في اناث الارانب المعرضة للإجهاد التأكسدي الى اضعاف الدفاعات المضادة للأكسدة الخلوية وزيادة التعرض الى الاضرار المرتبطة ب الاجهاد التأكسدي أما ارتفاع مستوى (المالونديهايد) ناتج من زيادة في اكسدة البروتينات الدهنية ذات الكثافة المنخفضة ، لذألك فان ارتفاع مستوى المالونديهايد يشير الى حالة الاجهاد التأكسدي الناتج عن تكون الجذور الحرة التي تهاجم الانسجة ، خاصة انسجة الكبد والقلب ، والتي تلعب دور هاما في الاصابة ب الامراض ، حيث تؤدي الى تحطيم الفوسفولبيدات الموجودة في اغشية الخلايا وتلف الانسجة وتساهم في خلل الخلايا والالتهابات وتطور الامراض المزمنة
(Ferrari *et al* ,1992) .

تؤدي الزيادة في مستوى تركيز اكسدة الدهون و تؤدي الى خلل في نفاذية الاغشية الخلوية وخاصة الخلايا البطانية فضلا عن الى التحورات التأكسدية للبروتينات الدهنية واطئة الكثافة حيث تعمل على نشوء افات التصلب الشرياني في جدران الاوعية الدموية (Jacob *et al.*, 2018)

بينما لوحظ عند اعطاء الهرمون الى وجود تحسن واضح في معايير GSH ، MDA في المجاميع G3 ، G4 حيث يلعب DHEA دور كبير في تعديل مسارات الاجهاد التأكسدي في الخلايا ويؤثر على عملية انتاجها واعادة تخليقها مثل الكلوتاثيون بالإضافة الى انه يؤثر على التعبير الجيني ومسارات الاشارات المشاركة في اليات الدفاع المضادة للأكسدة (Naelitz and Sharifi,2020) ، حيث تسبب الاجهاد التأكسدي في العديد من الامراض المزمنة بما في ذالك أمراض القلب والاوعية الدموية . ولوحظ خلال الدراسة التغيرات في معدل تركيز الكلوتاثيون بتأثير هرمون DHEA وهذا ما اشارت الية دراسة (Campbell *et al* ., 2020) التي اوضح فيها تأثير الدهون على الصحة العامة ومخاطر الامراض .

بينما اشار (Von *et al* ., 2008) وأكد ان DHEA يؤثر على الاجهاد التأكسدي في الخلايا من خلال التغيرات في مستويات الاجهاد التأكسدي وتأثيره على الاوكسجين التفاعلي (ROS) حيث يتفاعل مع المستقبلات الخلوية ويؤثر في عمليات الاصلاح الخلوي .

ويعمل هرمون DHEA على خفض انتاج بير وكسيدات الدهون MDA من خلال تعزيز انتاج النتريك اوكسايد (NO).

3-1-5التغيرات في معدل تركيز انزيم النتريك اوكسايد Nitric oxide

يلعب أكسيد النيتريك دورًا حاسمًا في تنظيم وظيفة الأوعية الدموية، وتعزيز توسع الأوعية، وتحسين تدفق الدم. زيادة مستويات أكسيد النيتريك قد تساعد في تعزيز صحة القلب والأوعية الدموية عن طريق خفض ضغط الدم، وتحسين وظيفة بطانة الأوعية الدموية، ومنع تشكيل لويحات تصلب الشرايين وهذا يتفق مع (Liu and Dillon,2004) .

حيث لوحظ وجود زيادة معنوية في معدل تركيز الانزيم في المجاميع التي اعطيت الهرمون G3 ، G4 بعد ست اسابيع مقارنه مع مجموعة السيطرة ومجموعة G2 التي جرعت بالكوليسترول حيث لوحظ انخفاض معنوي في تركيزه وهذه الدراسة اتفقت مع دراسة (Ahmed *et al* ., 2018) .

حيث ان انزيم النتريك اوكسايد هو عامل مساعد يشارك في العديد من العمليات الفسيولوجية المختلفة ، بما في ذالك توسع الاوعية الدموية ، والنقل العصبي ، والاستجابة المناعية .

حيث لوحظ وجود ارتفاع معنوي في معدل تركيز Nitric oxide بعد اعطاء الهرمون حيث ساهم DHEA في ارتفاع الهرمونات الجنسية الاستروجين والبروجسترون من خلال الدراسة ويعمل E2 على تحفيز انتاج النتريك اوكسايد NO الذي يساهم في علاج البطانة الداخلية للأوعية الدموية حيث يحفز التقريب التساهمي لمجموعة النتر وسيل – سيستيز Nitosylation-cysteine الذي يمثل طريقا رئيسيا لا نتاج NO وفي تعديل وظائف البروتين بشكل مباشر والذي يعتمد على E2 (Krol &Human, 2020).

DHEA يخفف بكفاءة الضرر المرضي المبكر لتصلب الشرايين حيث يزيد من انتاج NO في المصل وهذا ما لوحظ من خلال اعطاء الهرمون في المجموعة G3 ، G4 وايضا يعمل DHEA على تنظيم التعبير عن مستقبلات هرمون الأستروجين البطانية ER للأرانب (Lima *et al*., 2010).

بينما كان انخفاض NO في مجموعة اعطاء الكوليسترول G2 وهذا اتفق مع دراسة (Srinivasan *et al* ., 2009) ويعود السبب الى الضرر للطبقة البطانية وحدوث خلل في وظيفة الاوعية الدموية من خلال حصول حالة التقلص للأوعية الدموية وتجمع في الاقراص الدموية والتصاق خلايا العدلة في بطانة الاوعية الدموية حيث لوحظ ان شرايين الارانب المعاملة بالكوليسترول في الغذاء تنتج كميات كبيرة من السوبر اوكسايد كما ان وجود التثخن في جدار الوعاء الدموي ناتج عن تكاثر الخلايا العضلية الملساء الوعائية المتمثلة بالمرحلة التكاثرية ومن ثم ظهور الترسبات الدهنية بسبب الضرر البطاني والذي يتبعه ارتشاح التهابي للخلايا احاديه

النواه المتمثلة بالبلعمات الى الفسح تحت البطانة لتلتهم جزئيات البروتين الشحمي منخفض الكثافة المؤكسدة مكونة الخلايا الرغوية Foamy cell وان الموت المبرمج لهذه الخلايا apoptosis يؤدي الى تكوين الخيوط الدهنية Fatty streak (Libby,2000) .

4-1-5 التغيرات في معدل تركيز الهرمونات (DHEA, Estrogen, Progesterone) بتأثير الكوليسترول والهرمون

حيث اشارات النتائج الحالية الى وجود ارتفاع معنوي في معدل تركيز هرمون DHEA-S بعد المعاملة ب 2 غم / كغم ولمدة ست اسابيع وهذا يتفق مع (Naelitz and Sharifi,2020) ويعزى السبب الى الارتفاع الحاصل في هرمونات الكظرية حيث تؤثر هرمونات الكظرية على مستويات DHEA في المصل من خلال تأثيرها على انزيم السيتوكروم اوكسيديز CYP 450 الذي يكون مسؤولا عن اتمام عملية تحويل الكولسترول الى هرمون Pregnelone والذي يعتبر خطوة مهمة لتصنيع جميع الهرمونات الستيرويدية ومن ضمنها هرمون DHEA .

ومن ثم فان ارتفاع الهرمون DHEA-S كان انعكاسا لارتفاع الهرمونات الجنسية الاخرى ومنها الاستروجين والبروجسترون وهذا ما سجلته الدراسة الحالية في مجاميع الهرمون وقد اتفقت هذه النتيجة مع دراسة (Tang *et al* ., 2021) التي اشارات الى ان مستويات الاستروجين في المصل ارتفعت بشكل ملحوظ في مجاميع الارانب التي جرعت بالهرمون المعاملة ب 2 غم / كغم من هرمون DHEA مقارنة مع باقي مجاميع الدراسة وهذا اتفق مع (Song *et al* ., 2010).

ان الدراسة التي اجريت من قبل (Xiao *et al* ., 2021) لتقييم التأثيرات المضادة لتصلب الشرايين حيث استخدمت فئران اكثر عرضة للإصابة بتصلب الشرايين ، ولوحظ ان حجم لوحة تصلب الشرايين وترسب الدهون في الشرايين يؤدي الى انخفاض مستويات السيتوكينات الالتهابية وتحسين ملامح الدهون باستخدام هرمون DHEA حيث لوحظ انه يقوم بتحسين وظيفة بطانة الاوعية الدموية من خلال تقليل الاجهاد التأكسدي وتقليل علامات الالتهاب مسلطا الضوء على امكانية DHEA في تحسين صحة الاوعية الدموية (Nasu *et al* ., 2019) .

كما اشارات نتائج الدراسة الحالية الى ارتفاع هرمون البروجسترون في المجاميع المعاملة بالهرمون DHEA مقارنه بمجموعة السيطرة ومجموعة الكوليسترول وقد اتفقت هذه النتيجة مع

(Forman el al ., 2015) التي اشارات الى ان الارتفاع في هرمون البروجسترون بعد التجريع لمده ست اسابيع بهرمون DHEA في مجاميع الارانب التي اعطت الهرمون . حيث يعزى السبب في ارتفاع مستويات الهرمون الى تحرير كميات كبيرة من الهرمون وفق التغذية الاسترجاعية الموجبة positive feedback mechanism (Marya ., 2003).

2-5 التغيرات النسجية Histological changes

تشير الدراسات العديدة إلى وجود علاقة بين تصلب الشرايين وأمراض القلب الوعائية من خلال التغيرات النسجية في الأوعية الدموية. وهناك سببان رئيسيان لحدوث خلل في بطانة الأوعية الدموية. السبب الأول هو زيادة ضغط الدم الانقباضي والانبساطي الناتجة عن زيادة المقاومة المحيطية للأوعية الدموية. والسبب الثاني هو ارتفاع مستويات الكوليسترول والشحوم البروتينية ذات الكثافة المنخفضة بشكل مزمن. ويؤدي هذا الخلل إلى تجمع الأقراص الدموية. وتشير الدراسات إلى ارتفاع تركيز الكوليسترول، مما يزيد من حدوث الإجهاد التأكسدي.

1-2-5 التغيرات النسجية في الاوعية الدموية

اما التغيرات النسجية للأوعية الدموية نتيجة للتجريع الفموي للكوليسترول ولمده ست اسابيع ادى الى عدم التوازن للتجهيز الدموي للقلب عن طرق اكسجة الدم Oxygenated blood والتي تؤدي الى حصول تضيق في الشرايين وانغلاقها (Tucker *et al* ., 2024) ومن ثم حدوث نقص التروية الدموية التي تؤدي الى توليد الجذور الحرة التي تعمل على اكسدة الدهون لغشاء الخلية وبالتالي تحطيم الغشاء والى موت خلايا العضلة القلبية myocardial cell بسبب نقص الاوكسجين الواصل اليها (Mote *et al* .,2010) .

2-5- 2 التغيرات النسجية للكبد

اشارت نتائج الفحص المجهري في مجاميع الكوليسترول والهرمون لنسيج الكبد الى وجود تغيرات متمثلة بظهور حويصلات دهنية وتنكس دهني واحتقان الوريد المركزي وارتشاح الخلايا الالتهابية داخل النسيج الكبدي وهذا يتفق مع (Eshraghian and Alireza., 2014 ; Sakr *et al* ., 2015) . حيث تؤثر هرمونات الكظرية على عمليات استقلاب الدهون من خلال مستقبلات هرمونات الغدة الكظرية نوع خلايا بيتا من خلايا الكبد ، وحيث يؤدي ارتفاع الكوليسترول الى زيادة مستويات الدهون الثلاثية Triglyceride (TG) يتم تقليل الدهون في الدم عن طريق تقليل نشاط انزيم اللايبيز الدهني الكبدي واشارات العديد من الدراسات الى ان ارتفاع الكوليسترول يسبب ارتفاع مستويات الدهون الثلاثية(Chhetry and Jialal *et al* ., 2024) وقد يحدث تجمع للحويصلات الدهنية نتيجة لتغيرات في بنية البروتينات الدهنية ،

وذألك بسبب اضطراب وخلل في وظيفة الكبد ، هذا التجمع يحدث عندما تتراكم القطيرات الدهنية داخل خلايا الكبد .(Hallberg *et al* ., 1984) .

اما بالنسبة لحدوث التكفف اللمفاوي حول الشرايين (او الاوردة المركزية) للكبد وارتشاح الخلايا الالتهابية نتيجة لعوامل تسبب تصلب الشرايين ، مما يؤدي الى تلف الخلايا الكبدية. وبالتالي يحدث جذب للخلايا اللمفاوية والخلايا المناعية الاخرى نحو المناطق المتأثرة في النسيج

ان تعرض الحيوان للإجهاد نتيجة تناول الكوليسترول بشكل يومي ولمدة ست اسابيع واعطاء هرمون DHEA ادى الى انتاج الجذور الحرة ، خاصه انواع الاوكسجين التفاعلية Reactive oxygen species(ROS) التي تسبب تلف الانسجة بوساطة ظهور تغيرات فيها منها الاحتقان الدموي وظهور فجوات دهنية وارتشاح الخلايا الالتهابية وتغيرات نسجيه تسببها الجذور الحرة Free radical (Ferrari *et al* .,1992).

5-2-3 التغيرات النسجية للقلب

اشارت نتائج الفحص المجهري في مجاميع الكوليسترول والهرمون لنسيج القلب الى وجود تغيرات متمثلة باحتقان الاوعية الدموية وتغيرات في جدار الوعاء الدموي وترسب الخلايا الدهنية وهذا يتفق مع (Gillum, 1982) . و تظهر على قلب الأفراد المصابين بتصلب الشرايين علامات تلف عضلة القلب بسبب انخفاض تدفق الدم. يمكن أن يشمل ذلك مناطق التليف، حيث يحل النسيج الندبي محل خلايا عضلة القلب التالفة. فضلا عن ، يمكن أن تساهم المستويات المرتفعة من الكوليسترول أيضًا في الإصابة بحالات أخرى مرتبطة بالقلب، مثل مرض الشريان التاجي وارتفاع ضغط الدم وفشل القلب (Gusev and Sarapultsev, 2023).

أي أن الاستهلاك المفرط للكوليسترول والدهون العالية يؤدي إلى تراكم الترسبات في القلب، مما يسبب تصلب الشرايين وربما يؤدي إلى مضاعفات مرتبطة بالقلب مثل الذبحة الصدرية والنوبات القلبية وفشل القلب .و التغيرات النسيجية في القلب قد تشمل التليف وتلف عضلة القلب بسبب انخفاض تدفق الدم.

4-2-5 نتائج التقنية IHC لمستقبل الاستروجين (ER).

اشارت نتائج الدراسة الحالية باستخدام تقنية IHC لمستقبل الاستروجين (ER) في خلايا العضلة القلبية تعبيرا عاليا في مجاميع التجريع بهرمون DHEA وخلال التجربة مقارنة مع مجموعة الكوليسترول ومجموعة السيطرة. التي اظهرت تعبيرا عاليا لكثافة التصبيغ وقد يعزى هذا الارتفاع المعنوي في التعبير الكيميائي المناعي النسجي لمستقبل الاستروجين الى الالفة العالية لهرمون DHEA للارتباط بمستقبلات الاستروجين .حيث يتوسط هرمون DHEA عملة من خلال الاشارات المتعددة لمستقبلات الاغشية المتخصصة عن طريق التحول الى مشتقات الاندروجين والاستروجين (Traish *et al.*,2011).

حيث وجد (Deroo *et al.*, 2006) ان التجريع بهرمون DHEA له القابلية على تنشيط مستقبلات الاستروجين Estrogen- receptor (ER) مع ثابت كيميائي Ki قيمته 1.1 (µM) و (0.5 µM) على التوالي حيث يعمل DHEA كمنبه عالي لمستقبل الاستروجين مع استجابة قصوى مماثلة او اكبر من الاستراديول ومن المعروف ان مستويات هرمون DHEA في الدم هي التي تحدد كفاية التنشيط للمستقبل الى نفس مستويات الاستراديول وهذا ما سجلته الدراسة الحالية من خلال الارتفاع بمستويات هرمون DHEA-S بعد التجريع ب2 غم/كغم من هرمون DHEA في مجاميع المعاملة.

الفصل السادس

الاستنتاجات

والتوصيات

Conclusion

&

Recommendations

الاستنتـاجـــــات

استنتج من الدراسة الحالية :

ان ارتفاع الكوليسترول ولمدة ست اسابيع أدى الى:-

1- تغيرات معنوية في مستويات الدهون ومضادات الاكسدة وانزيم النترك اوكسايد والهرمونات الجنسية وتغيرات نسجيه ومرضية واضحة في الاوعية الدموية والكبد والقلب.

2- اعطاء الهرمون بعد التجريع ب 2غم/كغم من هرمون DHEA ادى الى ارتفاع معنوي في التعبير الكيميائي المناعي النسجي لمستقبل الاستروجين لخلايا العضلة القلبية .

3- على الرغم من ان استحداث تصلب الشرايين حيث كان ذا تأثيرا سلبيا في جميع المعايير الهرمونية والتراكيب النسجية التي تم قياسها .لكن وجد ان الهرمون DHEA كان ذا فعالية ايجابية وكان استخدامه أمنا ولم يسبب اي تغيرات مرضية .

4- أن استخدام هرمون DHEA بتركيز 2 غم/كغم ادى الى حدوث تحسن واضح في نسيج القلب والكبد والاوعية الدموية .

التوصيات

اوصي بأجراء:-

1- دراسات تجريبية عن تأثير هرمون DHEA على اعضاء اخرى في الجسم مثل الجلد.

2- اوصي بإعطاء الهرمون DHEA كمكمل غذائي للنساء اللاتي تجاوزت اعمارهن سن (45) سنة بجرع منتظمة وفترات محددة .

3- اجراء دراسة لمعرفة تأثير الكوليسترول على بعض الاعضاء مثل البنكرياس والامعاء الدقيقة.

المصادر

References

المصادر

References

Abdelazeim SA, Shehata NI, Aly HF, Shams SGE. Amelioration of oxidative stress-mediated apoptosis in copper oxide nanoparticles-induced liver injury in rats by potent antioxidants. Sci Rep. 2020 Jul 2;10(1):10812

Abraham,P.A.; Kazman, J.B.; Zeno, S.A.; Poth,M. and Deuster,P.A.(2013).Age –related decline in salivary dehydroepi-androsterone sulfate and associated health risks among African Americans. Ethn Dis.23(2):149-54.

Adam, R. C., Mintah, I. J., Alexa-Braun, C. A., Shihanian, L. M., Lee, J. S., Banerjee, P., Hamon, S. C., Kim, H. I., Cohen, J. C., Hobbs, H. H., Van Hout, C., Gromada, J., Murphy, A. J., Yancopoulos, G. D., Sleeman, M. W., & Gusarova, V. (2020).

Ahmad, P., Alvi, S. S., Iqbal, D., & Khan, M. S. (2020). Insights into pharmacological mechanisms of polydatin in targeting risk factors-mediated atherosclerosis. Life Sciences, 254(May), 117756

Ahmed A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li PL, Ritter JK. Role of Nitric Oxide in the Cardiovascular and Renal Systems. Int J Mol Sci. 2018 Sep 3;19(9):2605

Aldred S, Waring RH. Localisation of dehydroepiandrosterone sulphotransferase in adult rat brain. Brain Res Bull 1999;48:291–296.

Allain.(1974).Measurement of cholesterol .Clin. Chem. 20:470-475.

Al-Sharea, A., Lee, M. K. S., Whillas, A., Michell, D. L., Shihata, W. A., Nicholls, A. J., Cooney, O. D., Kraakman, M. J., Veiga, C. B., Jefferis, A.

M., Jackson, K., Nagareddy, P. R., Lambert, G., Wong, C. H. Y., Andrews, K. L., Head, G. A., Chin-Dusting, J., & Murphy, A. J. (2019).

Angiopoietin-like protein 3 governs LDL-cholesterol levels through endothelial lipase-dependent VLDL clearance. Journal of Lipid Research, 61(9), 1271–1286

Auda, F. M., Ali, B. M., Al-andaleb, M., Abidali, M. K., & Dhyaa, S. (2021)

Aufrere MB, Benson H. (1976). Progesterone an overview and recent advances., 65:783-800

Bansal, K. (2004). Practical approach to infertility management. 1st ed. Jaypee Brothers medical publishers. Newdelhi. P: 560-600. cardiovascular disease (ASCVD) events: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). Eur Heart J. 2018;39:2401– 8.

Barnard, S. A., Pieters, M., & De Lange, Z. (2016). The contribution of different adipose tissue depots to plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. Blood Reviews, 30(6), 421–429

Barret-Connor E & Bush TL (1991). Estrogen and coronary heart

Barrio JR, Kepe V, Satyamurthy N, Huang SC, Small G. Amyloid and tau imaging, neuronal losses and function in mild cognitive impairment. J Nutr Health Aging. 2008;12:61S–65S.

Bays HE, Taub PR, Epstein E, Michos ED, Ferraro RA, Bailey AL, Kelli HM, Ferdinand KC, Echols MR, Weintraub H, Bostrom J, Johnson HM, Hoppe KK, Shapiro MD, German CA, Virani SS, Hussain A, Ballantyne CM, Agha AM, Toth PP. Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors. Am J Prev Cardiol. 2021 Jan 23;5:100149

Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., et al. (2019). Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association. Circulation, 139(10), e56-e528 biochemistry.

Bernhard, K. ; Winfried, G. R. (2016). Hormones and the Endocrine System: Textbook of Endocrinology. Springer. pp. 264–265.

Bryk, D.; Olejarz, W.; Zapolska-Downar, D. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis. Postep. Hig. Med. Dosw. (Online) 2017, 71, 57–68.

Budoff MJ, Young R, Burke G, Jeffrey Carr J, Detrano RC, Folsom AR, et al. Ten-year association of coronary artery calcium with atherosclerotic

Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. Methods in Enzymology,52: 302-310.

Burstein, M.J (1970): measurement of HDL. Lipid Res. 11: 583.

Cadegiani F, Luiz P, Da Silva H, Abrao TPC, Kater CE, Sathavarodom N. Reproductive Endocrinology. Male reproductive health- from hormones to gametes. The Testosterone-to-Estradiol ratio, rather than testosterone or estradiol alone, is a more precise marker of metabolic-related outcomes in males: insights from a systematic r. J Endocr Soc. 2020;4:A1157. doi: 10.1210/jendso/bvaa046

Campbell B. DHEAS and Human Development: An Evolutionary Perspective. Front Endocrinol (Lausanne). 2020 Mar 3;11:101.

Chakraborty, S., Doktorova, M., Molugu, T. R., Heberle, F. A., Scott, H. L., Dzikovski, B., Nagao, M., Stingaciu, L. R., Standaert, R. F., Barrera, F. N., Katsaras, J., Khelashvili, G., Brown, M. F., & Ashkar, R. (2020).

How cholesterol stiffens unsaturated lipid membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 117(36), 21896–21905

Chapman, M. J., Ginsberg, H. N., Amarenco, P., Andreotti, F., Borén, J., Catapano, A. L., Descamps, O. S., Fisher, E., Kovanen, P. T., Kuivenhoven, J. A., Lesnik, P., Masana, L., Nordestgaard, B. G., Ray, K. K., Reiner, Z., Taskinen, M. R., Tokgözoglu, L., Tybjærg-Hansen, A., & Watts, G. F. (2011)

Chhetry M, Jialal I. Lipid-Lowering Drug Therapy. [Updated 2023 Aug 28].

Chistiakov D. A., Melnichenko A. A., Myasoedova V. A., Grechko A. V., Orekhov A. N. (2017). Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. J. Mol. Med. Berl. 95 (11), 1153–1165. 10.1007/s00109-017-1575-8

Christen, T., Trompet, S., Rensen, P. C. N., Willems van Dijk, K., Lamb, H. J., Jukema, J. W., Rosendaal, F. R., le Cessie, S., & de Mutsert, R. (2019). The role of inflammation in the association between overall and visceral adiposity and subclinical atherosclerosis. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 29(7), 728–735

Chronic sympathetic driven hypertension promotes atherosclerosis by enhancing hematopoiesis. Haematologica, 104(3), 456–467

Chunta, S., Suedee, R., Boonsriwong, W., & Lieberzeit, P. A. (2020). Biomimetic sensors targeting oxidized-low-density lipoprotein with molecularly imprinted polymers. Analytica Chimica Acta, 1116, 27–35.

Cole, T. J., Short, K. L., & Hooper, S. B. (2019, June). The science of steroids. In Seminars in Fetal and Neonatal Medicine (Vol. 24,No. 3, pp. 170-175). WB Saunders Commelina benghalensis and Lippia nodiflora. International nano

Craig M, Yarrarapu SNS, Dimri M. Biochemistry, Cholesterol. [Updated 2023 Aug 8].

Danielle N. R. ; Carol, D. R. ; and Christopher L. C. (2017). Precipitous DehydroepiandrosteroneDeclines Reflect Decreased Physical Vitality and Function. ournals of Gerontology: Biological Sciencescite as: J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 72(6): 747–753

Das P, Ingole N. Lipoproteins and Their Effects on the Cardiovascular System. Cureus. 2023 Nov 15;15(11):e48865

Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. J. Clin Invest. 2006; 116: 561–570. 10.1172/JCI27987

DHS. Circ Cardiovasc Imaging. 2020 [cited 2020 Nov 28];13.

Digiacomo, S. I., Jazayeri, M. A., Barua, R. S., & Ambrose, J. A. (2019). Environmental tobacco smoke and cardiovascular disease. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16, disease in women. Journal of the American Medical Association،

Donato, A.J .; Morgan , R.G ;Walker, A.E and Lesniews;I, L.A. (2015). Cellular and molecular biology of aging endothelia cells. J Mol Cell Cardial .2 (15) 34-6

Dutt, M., Wehrle, C.J., & Jialal, I. (2021). Physiology , adrenal gland . In era: A new paradigm. Endocrine Reviews, 36(1), 131–147 .

Eshraghian, A. and Alireza H. J (2014).Non-alcoholic fatty liver disease and thyroid dysfunction: A systematic review . World J .Gastroenterol. 7; 20(25): 8102–8109

Estimation of Hepcidin and Sexual Hormones Levels in Patients with Atherosclerosis in Al-Najaf City / Iraq. Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology, 15(3), 5235–5239

Fassati, p.; principe, L. (1982): measurement of Triglyceride. clin. Chem. .2077 :28

Ferrari, R.; Ceconi, C.; Curello, S.; Cargnoni, A.; De Giuli, F. and Visioli, O. (1992).Occurrence of oxidative stress during myocardial reperfusion. Mol. Cell. Biochem.111(1-2): 61-69.

Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span–from yeast to humans. Science (2010) 328(5976):321–6. doi: 10.1126/science.1172539

Forman EJ, Franasiak JM, Scott RT Jr. Elevated progesterone levels in women on DHEA supplementation likely represent assay interference. J Assist Reprod Genet. 2015 Apr;32(4):661

Frank, J.S. and Fogelman, A.M. (1989). The ultra-structure of the intimae in WHHL and cholesterol fed rabbit aortas prepared by ultra-rapid freezing and freezectching. J. Lipid Res. 967-78 :30

Ghodeshwar GK, Dube A, Khobragade D. Impact of Lifestyle Modifications on Cardiovascular Health: A Narrative Review. Cureus. 2023 Jul 28;15(7):e42616

Gierach, G .,Johnson, ,B., Merz, C., Kelsey, S., Bittner, V., Olson,M., Shaw, L., Mankad, S., Pepin, C., Reis, S., Rogers, W., Sharaf,B. and

Sen A Hammes SR. Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors Are Criti- cal Regulators of Ovarian Development and Function. Mol Endocrinol. 2010 Jul 1;24(7):1393–403.

Gillum RF. Coronary heart disease in black popula- tion:I.Riskfactors.Am HeartJ1982;104:852-863.

Goldstein,J.L.;Brown,M.S.(2009). The LDL receptor. Atherioscler Thromb VascBiol, 29: 431

Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J., et al: Analysis of nitrate Guyton, A.C. and Haull , J.E.(2016) . Text book of medical physiology .

Gusev E, Sarapultsev A. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. Int J Mol Sci. 2023 Apr 26;24(9):7910

Halliwell , B. (1997) . Antioxidants and human disease : a general introduction . Nutr. Rev. 55 : S44 – S49 .

Hamilton KJ, Hewitt SC, Arao Y, Korach KS. Estrogen Hormone Biology. Curr Top Dev Biol. 2017;125:109-146

Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J., & Lewington, S. (2016). Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. Circulation Research, 118(4), 535– 546 . Hill Education

Hong, W., Zimmer, V., Basharat, Z., Zippi, M., Stock, S., Geng, W., Bao, X., Dong, J., Pan, J., & Zhou, M. (2020). Association of total cholesterol with severe acute pancreatitis: A U-shaped relationship. Clinical

Nutrition, 39(1), 250– 257 Iphia. USA, p264-1003 philade

Huff T, Boyd B, Jialal I. Physiology, Cholesterol. [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024

ide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. Steroids. 2004 Apr;69(4):279-89.

Igwebuike A, Irving BA, Bigelow ML, Short KR, McConnell JP, Nair KS. Lack of dehydroepiandrosterone effect on a combined endurance and resistance exercise program in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93: 534–8

Jacob MHVM, Fernandes RO, Bonetto JHP, Mendes RH, da R Araujo AS, Belló-Klein A, Ribeiro MFM. DHEA Treatment Effects on Redox Environment in Skeletal Muscle of Young and Aged Healthy Rats. Curr Aging Sci. 2018;11(2):126-132

Janjusevic, M., Fluca, A. L., Gagno, G., Pierri, A., Padoan, L., Sorrentino, A., Beltrami, A. P., Sinagra, G., & Aleksova, A. (2022). Old and Novel Therapeutic Approaches in the Management of Hyperglycemia, an Important Risk Factor for Atherosclerosis. International Journal of Molecular Sciences, 23.

Johnson, I., & Prabu, H. J. (2015). Green synthesis and characterization of Kim, H. W., Shi, H., Winkler, M. A., Lee, R., & Weintraub, N. L. (2020). Perivascular Adipose Tissue and Vascular Perturbation/Atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 40(11), 2569–2576

Knight, J.(2021). Endocrine system 1: overview of the endocrine system and hormones. Nursing Times, *117*(5),38-42.

Knuuti, J., and Revenco, V. (2020). 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. European heart journal, 41(5), 407-477

Kołodziejczyk J, Biernacka KM, Wicik Z, et al. Dehydroepiandrosterone reduces arterial stiffness and improves endothelial function in aged rats. J Steroid Biochem Mol Biol. 2020;196:105497.

Kong, P., Cui, ZY., Huang, XF. et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. Sig Transduct Target Ther 7, 131 (2022.(

Krobath, P.D.; Salek, F.S.; Pittenger, A.L. et al. (1999). DHEA and DHEA-S: A review. J Clin Pharmacol . 39(4), 327-48

Krol M, Kepinska M. Human Nitric Oxide Synthase-Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. Int J Mol Sci. 2020 Dec 23;22(1):56

Kumar, P., Goyal. M., Agarwal, J.L. (2009). Eeffect of L.arginine on Eleetro cardio graphic changes indueed By Hypercholesterolemia and isoproterenol in Rabbits. J. Feed .9(1):45-52

Laufs, U., Parhofer, K. G., Ginsberg, H. N., & Hegele, R. A. (2020). letters, 5(1), 43-51

Lewis, G. F., Xiao, C., & Hegele, R. A. (2015). Hypertriglyceridemia in the genomic

Libby , P. (2000) . Changing concepts of atherosclerosis .J. Intern. Med.247.358, 349.

Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. Circ Res. 2010 Mar 5;106(4):633-46Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric ox

Luo, J., Yang, H., & Song, B. L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21(4),

Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):233-41 Marya, R.K. (2003). Medical physiology. 2nd ed. CBS publishers and distributors. Newdelhi. BANGLORE. Pp: 491-503..

Maninger, N. ; Wolkowitz, O.M. and Reus, V.I. (2009). Neurobiological and neuropsychiatric effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). Front Neuroendocrinol. 30(1): 65- .91

Marya, R.K. (2003). Medical physiology. 2nd ed. CBS publishers and distributors. Newdelhi. BANGLORE. Pp: 491-503.

Mechanisms in Bio systems , 10(4), 415-421 Regulatory 225–245.

Mehta A, Pandey A, Ayers CR, Khera A, Sperling LS, Szklo MS, et al. Predictive value of coronary artery calcium score categories for coronary events versus strokes: impact of sex and race: MESA and

Mehu M, Narasimhulu CA, Singla DK. Inflammatory Cells in Atherosclerosis. Antioxidants (Basel). 2022 Jan 26;11(2):233

Melaku, L., & Dabi, A. (2021). The cellular biology of atherosclerosis with atherosclerotic lesion classification and biomarkers. Bulletin of the National Research Centre, 45(1).

Moron, M.S.; Depierre, J.W. and Mannervik, B. (1979). Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. Biochim Biophys Acta., 582: 67-78.

Mote, R. N. (2010). Histological alterations in adrenal glands of rat (Ratus nor vegicus)under industrial stresses J. Biol med. Res.1(4): 287 . -

Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., et al. (2016). Heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. circulation, 133(4), e38-e360.

Naelitz BD, Sharifi N. Through the Looking-Glass: Reevaluating DHEA Metabolism Through HSD3B1 Genetics. Trends Endocrinol Metab. 2020 Sep;31(9):680-690

NaitoT, Ercan B , Krshnan L , Triebl A , Koh DHZ, Wei FY , Tomizawa K , Torta FT ,Wenk MR ,Saheki Y(2019)

Nakanishi R, Li D, Blaha MJ, Whelton SP, Darabian S, Flores FR, et al. All-cause mortality by age and gender based on coronary artery calcium scores. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2016;17:1305–14.nanoparticles by leaf extracts of Cycas circinalis, Ficus amplissima،

Nasu R, Kimura S, Harada H, et al. Dehydroepiandrosterone improves endothelial dysfunction and insulin resistance in a rat model of metabolic syndrome. J Endocrinol Invest. 2019;42(3):287-297

Nelson , D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2017). Lehninger Principles

Nicholls SJ et al. Impact of statins on progression of atherosclerosis: Rationale and design of SATURN (Study of coronary atheroma by in travascular ultrasound: Effect of Rosuvastatin versus AtorvastatiN). Current Medical Research and Opinion. 2011;27(6):1119-1129

Nieuwen hijzen-Kuseman, A.C. (1998). Structure and function of the hypothalamus and pituitary,In:Grossman A,ed. clinical Endocrinology, 2nd ed. Oxford Blackwell science. P : 83- .90

Nilsson, P., Paavilainen, L., Larsson, K of nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 126:131

Obaid, M.A. (2016).Physiological role of Dehydroepiandrosterone (DHEA) on Pituitary adrenal ovarian axis in adult female rats. Master Thesis. Veterinary Medicine. Baghdad University.

Olaniyan OT, Bamidele O, Uche S, Femi A, Ayobami D, Ayoola O, Builders M, Mali PC. Ovarian Metabolic activity in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovary in Wistar rats Treated with Aspirin. JBRA Assist Reprod. 2020 Jan 30;24(1):41-54

Pagidipati, N. J., and Gaziano, T. A. (2013). Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement. Circulation, 127(6), 749-756

Pahwa R, Jialal I. Atherosclerosis. [Updated 2023 Aug 8].

Partida, R. A., Libby, P., Crea, F., & Jang, I. K. (2018). Plaque erosion: A new in vivo diagnosis and a potential major shift in the management of patients with acute coronary syndromes. European Heart Journal, 39(22), 2070–2076.

Peng, J., Luo, F., Ruan, G., Peng, R., & Li, X. (2017). Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. Lipids in Health and Disease, 16(1) (

Piechocki, M.; Przewłocki, T.; Pieniążek, P.; Trystuła, M.; Podolec, J.; Kabłak-Ziembicka, A. A Non-Coronary, Peripheral Arterial Atherosclerotic Disease (Carotid, Renal, Lower Limb) in Elderly Patients—A Review: Part I—Epidemiology, Risk Factors, and Atherosclerosis-Related Diversities in Elderly Patients. J. Clin. Med. 2024

Poretsky L, Song L, Brillon DJ, et al. Metabolic and hormonal effects of oral DHEA in premenopausal women with HIV infection: a randomized, prospective, placebo-controlled pilot study. Horm Metab Res. 2009;41(3):244-249.

Presnell, J.K. andSchreibman, M.P. (1997).Humason's animal tissue techniques, 5thedn., John Hopkins Univ. Press, Balfimore, 546.

Qammar, N., Zain, M., and Javeed, H. M. R. (2020). Interpretation of Coronary Artery Disease through Environmental/Genetic Risk Factors and Contributing Genes: A Comprehensive Review. Acta Psychopathol, 12(6), 38.

Qin Y, O Santos H, Khani V, Tan SC, Zhi Y. Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on the lipid profile: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2020 Aug 28;30(9):1465-1475

Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. Int J Prev Med. 2014 Aug;5(8):927-46

Rahman M, Siddik AB. Anatomy, Arterioles. [Updated 2023 Jan 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024

Ramos-Vara, J.A. (2005). Technical Aspects of Immunohistochemistry. Vet Pathology. 42 (4): 405-426

Ramos-Vara, J.A. and Miller, M.A.(2014). When tissue antigens and antibody get alone :revisiting the technical aspects of immunohistochemistry-the red, brown, and blue technigue. Vet. Pathol., 51(1) : 42–87.

Ripa R, George T, Shumway KR, et al. Physiology, Cardiac Muscle. [Updated 2023 Jul 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024

Risto, E. (2006). The Menopause. Elsevier. pp. 5-. ISBN 978-0-444-51830-9.

Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., & Weil, P.

Ross , R. (1993) . The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990 . Nature (Lond.). 362 : 801 – 809

Sakr, S. A.; Abdel-Ghafar, F. R. ; Abo-El-Yazid, S. M. (2015). Selenium ameliorates carbimazole induced hepatotoxicity and oxidative stress in albino rats. Journal of Coastal Life Medicine, 3(2), 139-145.

SAS 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Institute Incorporated Cary. N.C. USA

Shah, P. K. (2019). Inflammation, infection and atherosclerosis. Trends in Cardiovascular Medicine, 29(8), 468–472

Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Sharopov, F., Docea, A. O., Karaca, A. C., Sharifi- Rad, M., Karincaoglu, D. K., Gülseren, G., Şenol, E., Demircan, E., Taheri, Y., Suleria, H. A. R., Özçelik, B., Kasapoğlu, K. N., Gültekin-Özgüven, M., Daşkaya-Dikmen, C., Cho, W. C., Martins, N., & Calina, D. (2020).

Shaw LJ, Min JK, Nasir K, Xie JX, Berman DS, Miedema MD, et al. Sex differences in calcified plaque and long-term cardiovascular mortality: observations from the CAC Consortium. Eur Heart J. 2018;39:3727–35.

silver Kelkar AA, Schultz WM, Khosa F, Schulman-Marcus J, O'Hartaigh BWJ, Gransar H, et al. Long-term prognosis after coronary artery calcium scoring among low-intermediate risk women and men. Circ Cardiovasc Imaging. 2016

Skuratovskaia D, Vulf M, Komar A, Kirienkova E, Litvinova L. Promising directions in atherosclerosis treatment based on epigenetic regulation using micrornas and long noncoding RNAs. Biomolecules 2019;9:226. Back to

Song, L. ; Tang, X. ; Kong, Y. ; Ma, H. (2010). The expression of serum steroid sex hormones and steroidogenic enzymes following intraperitoneal administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) in male rats. Steroids. 75: 213-218

Sopko,G.(2009).Hypertention menopause and coronary artery disease risk-in the wamens ischemia syndrome evaluation (WISE) study. J. Amer College.Cardial.,47 (3):50-58

Srinivasan M, Irving BA, Dhatariya K, Klaus KA, Hartman SJ, McConnell JP, Nair KS. Effect of dehydroepiandrosterone replacement on lipoprotein profile in hypoadrenal women. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Mar;94(3):761-4

Steinberg , D. (1997). Oxidative modification of LDL and atherogenesis . Circulahion. 95 : 1062 – 1071

Subczynski, W. K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., & Raguz, M. (2017). High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review. Cell Biochemistry and Biophysics, 75(3-4), 369-385

Suprarenal glands of rabbits with different types of autonomic tone . of the

Tang J, Chen LR, Chen KH. The Utilization of Dehydroepiandrosterone as a Sexual Hormone Precursor in Premenopausal and Postmenopausal Women: An Overview. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Dec 29;15(1):

Targher, G., Tilg, H., and Byrne, C. D. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease: a multisystem disease requiring a multidisciplinary and holistic approach. The lancet Gastroenterology & hepatology, 6(7), 578-588

Tellides, G., & Pober, J. S. (2015). Inflammatory and immune responses in the arterial media. Circulation Research, 116(2), 312–322

Traish, A.M. ; Kang, H.P. ; Saad, F. ; Guay, A.T.(2011). Dehydroepiandrosterone (DHEA)—A precursor steroid or an active hormone in human physiology. J Sex Med .8:2960–2982

Traish, A.M. ; Kang, H.P. ; Saad, F. ; Guay, A.T.(2011). Dehydroepiandrosterone (DHEA)—A precursor steroid or an active hormone in human physiology. J Sex Med .8:2960–2982

Tucker WD, Arora Y, Mahajan K. Anatomy, Blood Vessels. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.

Tyrrell, D. J., Blin, M. G., Song, J., Wood, S. C., Zhang, M., Beard, D. A., & Goldstein, D. R. (2020). Age-Associated Mitochondrial Dysfunction Accelerates Atherogenesis. Circulation Research, 298–3

VirmaniR,BurkeAP,FarbA,KolodgieFD.Pathologyofthe vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol. 2006;47(8 Sup- pl):C13 18.

Voet, D., & Voet, J. G. (2011). Biochemistry, 4-th Edition. New York: John Wiley& SonsInc, 492

von Mühlen D, Laughlin GA, Kritz-Silverstein D, Bergstrom J, Bettencourt R. Effect of dehydroepiandrosterone supplementation on bone mineral density, bone markers, and body composition in older adults: the DAWN trial. Osteoporos Int. 2008 May;19(5):699-707-1861-1867.: 265

Wong ND, Cordola Hsu AR, Rozanski A, Shaw LJ, Whelton SP, Budoff MJ, et al. Sex differences in coronary artery calcium and mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in adults with diabetes: the Coronary Calcium Consortium. Diabetes Care. 2020.

Xiang, A. S., & Kingwell, B. A. (2019). Rethinking good cholesterol: a clinicians' guide to understanding HDL. The Lancet Diabetes and Endocrinology, 7(7), 575–582

Xiao Y, Xu A, Xie Y, et al. Dehydroepiandrosterone attenuates atherosclerosis in Apo lipoprotein E-deficient mice by modulating lipid metabolism and inflammation. Biomed Pharmacother. 2021;138:111509

Xing Y, Lerario AM, Rainey W, Hammer GD. Development of adrenal cortex zonation. Endocrinol Metab Clin North Am. 2015 Jun;44(2):243-74

Yamakoshi, J., Piskula, M.K., Izumi, T., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Obata,A.,Kikuchi, M .(2000).Isoflavoneaglycone-rich extract without soy proteinattenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. J. Nutr, 130:1887-1893.

Yang H, Xing R, Liu S, Yu H, Li P. Analysis of the protective effects of γ-aminobutyric acid during fluoride-induced hypothyroidism in male Kunming mice. Pharm Biol. 2019 Dec;57(1):29-37

YiPS, C.L., William, W.P., Clarie, B.H.(2000). Effect of cholesterol diet on vascular function and atherogenesis in rabbits. ExpBiol Med., .224:166-171

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease— meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. Hepatology, 64(1), 73-84

Zhang, Y., Koradia, A., Kamato, D., Popat, A., Little, P. J., & Ta, H. T. (2019). Treatment of atherosclerotic plaque: perspectives on theranostics. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 71(7), 1029–1043

Zhao D, Guallar E, Ouyang P, Subramanya V, Vaidya D, Ndumele CE, et al. Endogenous sex hormones and incident cardiovascular disease in post-menopausal women. J Am Coll Cardiol 2018;71:2555-66. Back to cited text no.

Zorc-Pleskovič, R., Pleskovič, A., Vraspir-Porenta, O., Zorc, M., & Milutinović, A. (2018). Immune cells and vasa vasorum in the tunica media of atherosclerotic coronary arteries. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 18(3), 240–245

SUMMARY

Abstract The present study aimed to evaluate the histological and immunopathological changes resulting from feeding experimental animals on a high-cholesterol diet and then treating them with the hormone (Dehydroepiendesteron) (DHEA) on induced atherosclerosis and to know its effect on the heart, blood vessels and liver. The treatment period was six weeks, and (20) local adult female animals were used, aged between (8-9) months in December and weighing (1500-2000) grams. They were divided into four groups, (5/group) for a period of six weeks. The first group (G1) was the control group that was given water with the regular food, the second group ((G2 was given cholesterol 1.5) g/per 100 g of food) and the third group (G3) was given cholesterol (1.5 g/per 100 g of food) with the hormone (2 g/kg) and the fourth group was given the hormone only (2 g/kg).), and blood samples were taken at the end of the experiment to study the biochemical parameters, which included studying the concentration of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL), Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), nitric oxide (NO) enzyme concentration, Dehydroepiendesteron (DHEA), estrogen (Estrogen) and progesterone (Progesterone) hormones, and performing the IHC technique for the estrogen receptor (ER) on cardiac muscle cells. The results of the current study were as follows: -

There was a significant increase ($p<0.05$) in the concentration of TC, TG, LDL, and VLDL, and a significant decrease in the concentration of HDL and a significant increase ($p<0.05$) in the concentration of (MDA) and a significant decrease in the

concentration of GSH in the cholesterol-treated group G2 compared to the control group.

The study also showed that the use of cholesterol with the hormone G3 led to a significant decrease ($p<0.05$) in the concentration of TG, LDL, and VLDL, and an increase in the concentration of HDL, compared to the G2 group, and a significant increase ($p<0.05$) in the concentration of GSH, and a significant decrease in the concentration of MDA compared to the G2 group, and an increase in the concentration of estrogen, progesterone, and a significant increase ($p<0.05$) in the concentration of the nitric oxide enzyme rate in the G3 treatment group compared to the control group. On the other hand, there was a significant decrease ($p<0.05$) in the G2 treatment group for For the control group.

While the G4 group that was dosed with the hormone only showed a significant increase ($p<0.05$) in the concentration of the hormone Dehydroepiendesteron (DHEA) in the G3 treatment group and the G4 hormone treatment group compared to the control group.

The results of the current study in the tissue sections taken from the aorta, liver and heart of the group of female rabbits treated with cholesterol G2 showed the results of the artery, irregularity of the inner lining, infiltration of inflammatory cells, tissue congestion, accumulation of fat, and the appearance of fatty threads. As for G3, a small accumulation of fat cells was observed, and the inner elastic membrane of the artery was clear, and no inflammation or congestion of the tissue was

observed, and the artery wall was thicker, and the inner lining was irregular. In the group G4, the artery layers were clear and no clear tissue changes were observed closer to normal. In the liver, expansion of the blood sinusoids, congestion around the central vein, fatty degeneration, and the appearance of fat droplets were observed, compared to the control group. As for the group G3, slight congestion was observed around the central vein, slight fatty degeneration within the tissue, expansion of the blood sinusoids, and the appearance of Kuffer cells. As for the group G4, slight congestion was observed around the central vein. , compared to the control group.

In the heart of G2, blood vessel congestion, foam cells, and cholesterol deposition were observed.

In the G3 group, slight infiltration of inflammatory cells and slight fatty deposits with fibrosis were observed. As for G4, slight infiltration of inflammatory cells and fibrosis were observed, compared to the control group.

As for the results of immunohistochemical expression, they did not show high expression of estrogen receptor in the cholesterol-exposed groups G2 compared to the control groups, and a significant increase appeared in the groups treated with parasteron hormone (DHEA) G3 and G4 compared to the other group

University of Kerbala
Collage of Education for pure sciences
Department of biology

Histological and biochemical study of the protective role of Dehydroepiendesteron in suppressing cholesterol-induced atherosclerosis in adult female rabbits

A thesis submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences / University of Kerbala as part of the requirements for obtaining a Master's degree in biology

by
Ghfran Adnan Abdel Amir Halbous

Supervised by
Asst. Prof. Dr. Batool Abbas Hussein Aljabri

2024 A.D 1446 A .H