



جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة نسجية فسلجية ووراثية لتأثير المستخلص المائي لثمار نبات توت
العليق *Rubus ulmifolius* في الاجهاد التأكسدي المستحث بعقار
السيكلوسبورين في ذكور الجرذان البيض

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

كُتبت بواسطة

احمد حسن هادي عبود السعدي

بإشراف

أ. د لقاء حسون صكبان

أ.د. اشواق كاظم عبيد الطائي

تموز 2025 م

محرم 1447 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَ الَّذِينَ أُوتُوا

الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَ اللَّهُ يَإِ تَعْمَلُونَ خَيْرًا﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة المجادلة [الآية:11]

الأهداء



أحمد الله وأشكره على نعمه التي غمرني بها وبأذن الله تسنى لنا إنهاء عملنا فاللهم لك الحمد والشكر كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك وأدم نعمك علينا واحفظها من الزوال آمين .

الى حافظ سرّ الله ومهبط وحيه الرسول الكريم (صلى الله عليه واله وسلم وأهل بيته الطيبين الطاهرين)

إلى التي أسكنتني القلب قبل أن تحملني وسقتني الحب قبل أن ترضعني و أعطتني الرضى قبل أن تتشأني إلى من غرست في نفسي الصبر والإحسان إلى التي بفضل دعواتها بارك الله لي خطواتي إلى

.....أمي الحبيبة الغالية أهدي ثمرة نجاحي و تخرجي.....

إلى من حملني صغير و تحملني شاباً وسأحمل جميله إلى آخر عمري

..... إلى أبي الغالي أهدي رحيق جهدي

إلى من دام في القلب ذكراهم أخوتي واخواتي

✍️ احمد

الشكر والتقدير

الحمد لله الواحد الاحد الفرد الصمد الذي له العزة و الجبروت الذي افاض العلم من معدن الكرم وفتح أبواب رحمته الواسعة بالقلم وعلم الانسان مالم يعلم، والصلاة والسلام على اشرف الخلق أبي القاسم محمد وعلى آل بيته وصحبه الطاهرين...

يسرني أن اتقدم ببالغ شكري وتقديري إلى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لأتاحها الفرصة لإكمال دراستي.

ويشرفني ان اعبر عن شكري وتقديري وامتناني الفائق الى الأستاذة الفاضلة الدكتورة اشواق كاظم عبيد الطائي والدكتورة لقاء حسون صكبان لاقتراحها لعنوان الرسالة ، ولما قدمته لي من توجيهات علمية ولأشرافها المستمر على اعداد هذه الرسالة ودعائي لها بدوام التوفيق .

كما اقدم شكري الجزيل الى الاستاذة الدكتورة نيبال مطير طراد لما قدمته لي من مساعدة طيلة مدة الدراسة والبحث فجزاها الله عني الف خير .

يسعدني أن أتقدم بجزيل الشكر و وافر الامتنان إلى أ.د ياسمين خضير خلف ؛ لما قدمته من إرشادات وتوجيهات سديدة وأتقدم بالشكر والامتنان لكل من ساعدني لإتمام هذا البحث فجزاهم الله خير جزاء .

واتقدم بالشكر والامتنان إلى زميلتي في الدراسات العليا رشا فاضل موسى لمساعدتها في تقديم الارشادات لأتمام هذا البحث، وكما أتقدم بالشكر والتقدير إلى كل من غاب اسمه وحضر فضله وعمله وفقهم الله جميعا لما فيه خير وعافية.

احمد

إقرار المشرف على الرسالة

نشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة: (دراسة نسجية فسلجية ووراثية لتأثير المستخلص المائي لثمار نبات توت العليق *Rubus ulmifolius* في الاجهاد التاكسدي المستحث بعقار السيكلوسبورين في ذكور الجرذان البيض) للطالب (احمد حسن هادي السعدي) قد جرى تحت اشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة .



التوقيع:

الاسم : د. لقاء حسون صكبان

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة-جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2025



التوقيع:

الاسم : د. اشواق كاظم عبيد الطائي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2025

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .



التوقيع:

الاسم : د. علاء حسين مهدي الصافي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد دكتور

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : ٢٠٢٥ / ٧ / ١٥

﴿إقرار المقوم اللغوي﴾

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة نسجية فسلجية ووراثية لتأثير المستخلص المائي لثمار نبات توت العليق *Rubus ulmifolius* في الاجهاد التأكسدي المستحث بعقار السيكلوسبورين في ذكور الجرذان البيض) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة/ جامعة كربلاء التي قدمها الطالب (احمد حسن هادي عبود) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.


التوقيع:

الاسم: د. سرمد عادل صاحب حوبي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد دكتور

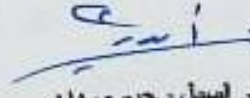
العنوان: جامعة كربلاء / كلية العلوم الإسلامية قسم اللغة العربية

التاريخ: ١٤ / ٧ / ٢٠٢٤

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (دراسة نسجية فسلجية ووراثية لتأثير المستخلص المائي لثمار نبات توت العليق *Rubus ulmifolius* في الإجهاد التأكسدي المستحث بعقار السيكلوسبورين في ذكور الجرذان البيض) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء التي قدمها الطالب (أحمد حسن هادي عبود) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير، وبعد إجراء المناقشة العلنية وجد أنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير امتياز.

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع: 

الاسم: د. أسيل رحيم مردان

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة القادسية / كلية التربية

عضو اللجنة

التوقيع: 

الاسم: د. شيماء مالك ياسر

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

عضو اللجنة

التوقيع: 

الاسم: د. علاء حسين مهدي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

عضواً ومشرفاً

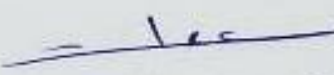
التوقيع: 

الاسم: د. اشواق كاظم عبيد

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

عضواً ومشرفاً

التوقيع: 

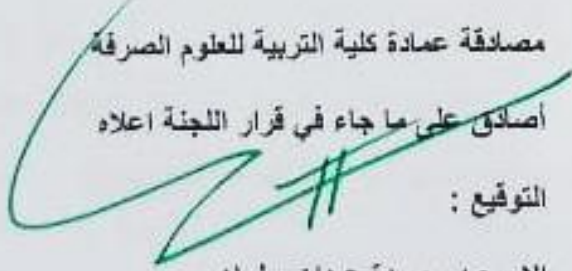
الاسم: د. لقاء حسن صكبان

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع: 

الاسم: د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى معرفه التأثير الوقائي للمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في ذكور الجرذان البيض المعاملة بعقار Cyclosporine (CsA) عن طريق دراسة بعض التغيرات النسجية والفسلجية والوراثية.

حيث بينت الدراسة المحتوى الكيميائي للمستخلص المائي لفاكهة توت العليق و شخصت المركبات بتقنية Gas Chromatography Maas Spectrometry (GC-MS) ، وقد تبين وجود تسع مركبات كيميائية وهذه المركبات هي Hexadecanoic / 9,12- Octadecadienoic acid 2-Chloroethyl linoleate / Methyl trans-9-octadecenoate /acid,cyclohexyl ester / Pentanedinitrile, 2-methyl / 2- Ethylimidazole / 4,4 Dimethylcyclohexene / 2-Amino-2-oxoethyl acetate / 1,3- Dioxolane, 2-pheny-

أجريت الدراسة في محافظة كربلاء المقدسة خلال المدة الممتدة بين منتصف شهر تشرين الأول 2024 إلى نهاية شهر شباط 2025، ونفذت الدراسة في البيت الحيواني التابع لكلية الصيدلة / جامعة كربلاء وفي مختبرات كليه التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة

استخدم 48 جرذاً ذكراً بالغاً تراوحت أوزانها بين (230-250 غم) وأعمارها بين (12- 14) أسبوعاً قسمت الى تجربتين التجربة الأولى هي اختبار الجرعة المؤثر للمستخلص المائي لنبات توت العليق تضمنت تحديد تركيز المستخلص المائي لنبات توت العليق الأكثر فعالية من بين ثلاث تراكيز تصاعدية (200, 300, 400 ملغم/كغم) إذ تم اختبار دورها الوقائي ضد الاجهاد التأكسدي الناجم عن المعاملة بعقار السيكلوسبورين لمدة 30 يوماً , واستخدم (24) من ذكور الجرذان البيض وقسمن بشكل منتظم على أربع مجاميع بواقع (6) حيوانات لكل مجموعة الاولى مجموعة السيطرة السالبة ماء اعتيادي ومجموعة الوقاية الأولى جرعت فموياً بالمستخلص المائي لنبات توت العليق بتركيز (200 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم ومجموعة الوقاية الثانية جرعت فموياً بالمستخلص المائي لنبات توت العليق بتركيز (300 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم.و مجموعة الوقاية الثالثة حيوانات هذه المجموعة جرعت فموياً بالمستخلص المائي لنبات توت العليق بتركيز (400 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم.

بعد 24 ساعة من آخر جرعة, سحبت عينات الدم عن طريق طعنة القلب وتركت لمدة 30 دقيقة لحين تخرها ثم نقلت إلى جهاز الطرد المركزي (3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة) لفصل المصل الذي استعمل لتقدير نشاط أنزيم السوبرأوكسيد ديسميوتاز (SOD) والذي تم اعتماده كمؤشر لتحديد كفاءة المستخلص ضد التأثير التأكسدي الذي ينتج عن المعاملة بعقار السيكلوسبورين.

التجربة الثانية واستخدم (24) من ذكور الجرذان البيض وزعت عشوائياً إلى أربع مجاميع (6 جرذان لكل مجموعة) تركت الأولى بدون معاملة وعدت مجموعة سيطرة السالبة (G1) ، المجموعة الثانية (G2) جرعت بين يوم وآخر بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم ولمدة (30) يوم وعدت مجموعته سيطرة موجبه ، المجموعة الثالثة (G3) تجرع يومياً بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق بتركيز (400) ملغم/ كغم من وزن الجسم ولمدة (30) يوم ، اما المجموعة الرابعة (G4) جرعت يومياً بالمستخلص المائي لفاكهة التوت العليق وبتركيز (400 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها فمويًا بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2 ملغم/كغم) بين يوم وآخر لمدة 30 يوم .

جمعت عينات الدم للمجاميع اعلاه بعد مرور شهر من التجريع ، وتم أخذ المقاطع النسجية للكبد والكلية والخصيه لغرض دراسة التغيرات النسجية عليها والتي تشمل: قياس اقطار كل من الخلايا الكبدية (hypatocytes) وأقطار الجيبانيات (sinusoids) وأقطار الوريد المركزي (central vein) ، وقياس أقطار الكبيبة (glomerulus) والنبيب الملتوي الداني (proximal convoluted tubule) والنبيب الملتوي القاصي (distal convoluted tubule) ، وتم اخذ مصل الدم لغرض قياس المعايير الكيموحيوية الآتية: مستويات انزيمات الكبد (Aspartate transaminase (AST) و Alanine (ALT) Alkalinephosphatas (ALP) transaminase وتقدير معدل تركيز البروتين الكلي (Total protein) والالبومين Albumin والكلوبيولين Globulin واليوريا Urea والكرياتنين Creatinine والمالون ثنائي الايديهايد (MDA) Malondialdehyde والكلوتاثيون (GSH) Glutathione وتقدير فعالية انزيم سوبرأوكسيد ديسميوتاز (SOD) Superoxide dismutase وتركيز انزيم الكاتليز (CAT) Catalase وقياس مستوى هرمونات الخصيه والتي تشمل هرمون الشحوم الخصوي (T) testosterone وهرمون اللوتيني (LH) luteinizing وهرمون المحفز لجريب (FSH) follicle-stimulating hormone في مصل الدم. كما تم اجراء اختبار comet assay يسمى اختبار المذنب في الكبد لقياس نسبه تحطم الحامض النووي DNA .

أدى تجريع حيوانات التجربة بعقار السيكلوسبورين (Csa) إلى حدوث تغيرات نسجية في الكبد متمثلة بأحتقان وتوسع في الوريد المركزي وعدم انتظام شديد للحبال الكبدية واحتقان وتوسع في الوريد البابي

وارتشاح شديد للخلايا الالتهابية مع توسع في الجيبانيات الكبدية وتنكس وتنخر الخلايا الكبدية، كما لوحظ وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل أقطار كل من الخلايا الكبدية والجيبانيات والوريد المركزي مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة. أما التغيرات النسجية للكلية تمثلت بضمور في الكبيبة وزيادة فسحة بومان وتحطم في جدران النبيبات البولية مع وجود احتقان للاوعية الدموية بين النبيبات الكلوية وانسلاخ ظهارتها المبطنة وارتشاح الخلايا الالتهابية مع وجود نزف بين النبيبات الكلوية مع تنكس خلايا النبيبات البولية وتنخر في بطانة النبيبات ، مع حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل اقطار كل من الكبيبة ،النبيب الملتوي الداني والنبيب الملتوي القاصي، أما بالنسبة للتغيرات النسجية الخاصة بالخصية، تمثلت بوجود مسافات بينيه بين النبيبات المنوية وكانت النطف قليلة في تجاوزيف النبيبات ، مع اختزال النسيج البيني وتفككه وقله خلايا لايدك ، وانخفاض حجم طبقه الخلايا الظهارية الجرثومية ، وتنكس الطبقة الجرثومية وتفكك خلاياها ، مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة (G1). كما لوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل مستوى انزيمات الكبد (AST، ALP، ALT) وفي مستوى اليوريا والكرياتنين و MDA وبينما لوحظ حصول انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدل مستوى البروتين الكلي والالبومين والكلوبيولين وGSH، CAT, SOD ومستوى هرمون (testosterone) (LH) (FSH) .

ولم يظهر التجريع الفموي للجرذان بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في المجموعة الثالثة (G3) اي تغيرات نسجية لأنسجة الكبد والكلى والخصية مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (G1) ، وعدم وجود فروق معنوية لمعدل أقطار كل من الكبد والكلى في المجموعة الثالثة (G3) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة . كما لوحظ حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في مستوى البروتين الكلي والكلوبيولين والالبومين وGSH و SOD ومستوى هرمون (FSH) (LH) (testosterone) للمجموعة (G3) مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2). كما حصل انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مستوى الانزيمات AST (ALT، ALP)، ومستوى اليوريا والكرياتنين و في مستوى MDA في المجاميع (G3) مقارنة مع (G2) .

اما في المجموعة الرابعة (G4) ان النسيج اقرب للطبيعي مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (G1) أما معدل الأقطار فقد لوحظ وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في المجموعتين لمعدل أقطار كل من الخلايا الكبدية والوريد المركزي والجيبانيات مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2). اما فيما يخص نسيج الكلية تمثلت التغيرات النسجية في المجموعة الرابعة (G4) فلا يوجد ضرر واضح الكبيبة والنسيج اقرب الى الطبيعي ووجود محفظة بومان وفسحة بومان مع البنية الطبيعية للنبيبات البولية القاصي والداني مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2)، ووجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في معدل قطر كل من الكبيبة

والنبيب الملتوي الداني والنبيب الملتوي القاصي مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) وعلى التوالي ، اما التغيرات النسجية لنسيج الخصية في المجموعة (G4) يلاحظ فيها النسيج اقرب للطبيعي حيث تظهر الخلايا المولدة للحيوانات المنوية وتجاويفها ممتلئة بالنطف مع وجود خلايا لايدك في النسيج البيني وزيادة عدد طبقات الخلايا الظهارية الجرثومية المكونة للنطف. كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة التوت بتركيز (400) ملغم/كغم مع عقار السيكلوسبورين حدوث انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في مستوى انزيمات الكبد (ALT، AST، ALP) واليوريا والكرياتينين وMDA وارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في مستوى البروتين الكلي والكلوبيولين والالبومين و SOD و CAT GSH ومستوى هرمون (FSH) (LH) (testosterone) مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة (G2) .

اما في الجانب الوراثي لنسيج الكبد لوحظ حدوث ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في نسبة تحطم جزيئة DNA في المجموعة الثانية (G2) المجرعة بعقار السايكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (G1)

بينما كان هنالك انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في نسبة تحطم DNA في المجموعة الثالثة (G3) التي جرعت بالمستخلص المائي لفاكهة التوت وكذلك في المجموعة (G4) التي جرعت بالمستخلص المائي لفاكهة التوت قبل اربع ساعات من تجريعها بعقار السيكلوسبورين مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة (G2) .

نستنتج من الدراسة الحالية مدى فعالية المستخلص المائي لفاكهة التوت بتركيز (400 ملغم/كغم) في كبح نشاط الجذور الحرة وتقليل الاجهاد التأكسدي المستحث بعقار السيكلوسبورين في نسيج الكبد والكلية والخصية وبعض المعايير الوظيفية والوراثية في ذكور الجرذان البيض.

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع	ت
I	الخلاصة	
V	قائمة المحتويات	
IX	قائمة الجداول	
X	قائمة الاشكال	
XI	قائمة الصور	
XIII	قائمة المختصرات	
1-3	الفصل الأول/المقدمة	
1	المقدمة introduction	1
2	الهدف من الدراسة Aim of this study	1.2
4-22	الفصل الثاني / استعراض المراجع Literature Review	
4	النباتات الطبية Medicinal plants	1.2
5	النبات المستخدم في الدراسة	2.2
5	التصنيف العلمي لنبات التوت العليق	1.2.2
5	جنس نبات Rubus	2.2.2
6	وصف وموطن نبات توت العليق Rubus ulmifolius	3.2.2
7	المكونات الفعالة لفاكهة توت العليق	4.2.2
8	الاستعمالات الطبية لفاكهة توت العليق	5.2.2
10	الأدوية المثبطة للمناعة Immunosuppressive Drugs	3.2
11	السيكلوسبورين Cyclosporine	4.2
14	آلية عمل السيكلوسبورين Mechanism of Cyclosporine	1.4.2
15	الاثار الجانبية للسيكلوسبورين Side Effects of Cyclosporine	2.4.2
15	الاثار الجانبية للسيكلوسبورين على الكبد و الكلية	3.4.2
17	الإجهاد التأكسدي Oxidative Stress	5.2
18	مضادات الأكسدة Antioxidant	6.2
19	الكبد The liver	7.2
20	الكلية Kidney	8.2
21	التركيب النسيجي للخصية Histological structure of testis	9.2

53-23	Materials and Methods الفصل الثالث/ المواد وطرائق العمل	
23	الأجهزة والمواد والادوات المستعملة	1.3
23	المواد الكيميائية المستعملة	1.1.3
24	الادوات المستعملة	2.1.3
25	الاجهزة المستعملة	3.1.3
25	طرائق العمل Methods	2.3
25	حيوانات التجربة Experimental animals	1.2.3
26	جمع النبات المستخدم	2.2.3
26	تحضير المستخلص المائي لثمار نبات التوت العليق	3.2.3
27	حساب جرعه عقار السيكلوسبورين	4.2.3
27	تصميم التجربة Experience Design	5.2.3
30	جمع عينات الدم Blood sample collection	6.2.3
30	جمع عينات الأنسجة Collection of tissue samples	7.2.3
30	فصل وتشخيص المركبات الكيميائية بتقنية GC-MS	8.2.3
32	الدراسة النسيجية Histological Study	3.3
32	الانكاز Dehydration	1.3.3
32	الترويق Clearing	2.3.3
32	التشريب Infiltration	3.3.3
33	الطمر Embedding	4.3.3
33	التقطيع Sectioning	5.3.3
33	التصبغ والتحميل Staining and Mounting	6.3.3
33	التصوير المجهرى Microphotography	7.3.3
33	القياسات النسيجية morphomtry Histological	4.3
34	قياس بعض المعايير الكيموحيوية	5.3
34	قياس فعالية الانزيمين الناقلين لمجموعة الامين Alanine (transaminase(ALT) & Aspartate transaminase(AST	1.5.3
35	قياس فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase ALP	2.5.3
36	تقدير مستوى البروتين الكلي Total protein في الدم	3.5.3
36	قياس مستوى الألبومين Albumin في المصل	4.5.3
37	قياس مستوى الكلوبولين Globulin في مصل الدم	5.5.3
37	قياس مستوى الكرياتينين Creatinine في مصل الدم	6.5.3

38	قياس مستوى اليوريا Urea في مصل الدم	7.5.3
39	قياس مستوى الكلوتاتيون (GSH) في المصل	8.5.3
42	قياس تركيز المألون ثنائي الديهايد malondialdehyde في مصل الدم	9.5.3
44	تقدير فعالية انزيم سوبر اوكسايد دسيموتاز SOD	10.5.3
45	تقدير فعالية الكاتليز Catalase Activity Estimation	11.5.3
47	تقدير مستوى هرمون الشحمون الخصوي Estimation of Testosterone hormone levels	12.5.3
48	تقدير مستوى الهرمون اللوتيني Estimation of LH levels	13.5.3
49	قياس مستوى الهرمون المحفز للجريبات Estimation of FSH level	14.5.3
51	الدراسة الوراثية Genetic study	6.3
51	اختبار المذنب Comet assay	1.6.3
52	اختبار تحلل المذنب Comet Assay	2.6.3
53	التحليل الإحصائي Statistical analysis	7.3
	الفصل الرابع/ النتائج والمناقشة	
54	الكشف عن المركبات الكيميائية الفعالة في المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i>	1.4
59	تحديد التركيز الأكثر فعالية لمستخلص نبات توت العليق	2.4
60	الدراسة النسجية Histological Study	3.4
60	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على نسيج الكبد وعلى قياسات معدل أقطار الخلايا الكبدية والجبيانيات الكبدية والأوردة المركزية لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	1.3.4
69	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على نسيج الكلية و قياسات معدل أقطار الكلية والنبيب الملتوي الداني والقاصي لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	2.3.4
76	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على نسيج الخصية لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	3.3.4
83	الدراسة الفسلجية	4.4
83	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> في معدل مستوى بعض إنزيمات الكبد لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	1.4.4
87	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> في معدل مستوى البروتين الكلي و الكلوبولين و الالبومين لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	2.4.4
90	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على مستوى اليوريا والكرياتين لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	3.4.4

93	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على مستوى SOD و GSH و MDA و CAT لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	4.4.4.
98	تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> في معدل مستوى هرمون الشحمون Testosterone (T) والهرمون اللوتيني Luteinizing hormone (LH) وهرمون المحفز الجريبات النامية Follicles stimulating hormone (FSH) لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	5.4.4.
103	الدراسة الوراثية	5.4.
103	تأثير تجريع المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> وعقار السيكلوسبورين على نسبة تحطم جزيئة الحامض النووي الـ DNA Come Assay في خلايا الكبد لذكور الجرذان البيضاء.	1.5.4.
	الاستنتاجات والتوصيات	5
112	الاستنتاجات	
113	التوصيات	
	المصادر	6
114	المصادر الأجنبية	
a	الخلاصة باللغة الإنكليزية	

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1-3	المواد الكيميائية المستعملة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ	23
2-3	الأدوات المستعملة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ	24
3-3	الأجهزة المستعملة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ	25
4-3	قياس مستوى فعالية إنزيمي ALT, AST	34
5-3	تقدير مستوى البروتين الكلي	36
6-3	قياس مستوى الألبومين Albumin	37
7-3	الكواشف قياس مستوى الكرياتينين Creatinine في مصل الدم	37
8-3	قياس مستوى الكرياتينين Creatinine في مصل الدم	38
9-3	الكواشف قياس مستوى اليوريا Urea في مصل الدم.	39
10-3	قياس مستوى اليوريا Urea في مصل الدم.	39
11-3	الكواشف المستعملة في تقدير مستو GSH في المصل	41
12-3	تقدير فعالية الكاتليز	46
1-4	المركبات الفعالة التي تم فصلها من المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> باستخدام تقنية GC-Mass.	55
2-4	تأثير ثلاثة تراكيز من المستخلص المائي لنبات توت العليق على مستوى نشاط أنزيم SOD في مصل الدم لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز 0.2 ملغم / كغم لمدة 30 يوماً.	59
3-4	يبين معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على معدل أقطار كل من الخلايا الكبدية والجبيانيات الكبدية والوريد المركزي في نسيج الكبد لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	66
4-4	يبين معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على معدل أقطار كل من الكبيبة والنيبيب الملثوي الداني والنيبيب الملثوي القاصي في نسيج الكلية لذكور الجرذان لمدة 30 يوم	74
5-4	يبين معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على مستوى انزيمات الكبد في مصل ذكور الجرذان البيض لمدة 30 يوم	84
6-4	يبين معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> مستوى معدل مستوى البروتين الكلي و الكلوبولين و الألبومين في مصل ذكور الجرذان البيض لمدة 30 يوم	88
7-4	يبين معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> مستوى اليوريا والكرياتينين في مصل ذكور الجرذان البيض لمدة 30 يوم	91

94	يبين معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على مستوى المألونديالديهيد (MDA) وبعض مضادات الأكسدة في مصل ذكور الجرذان البيض لمدة 30 يوم	8-4
99	يبين معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> على مستوى التستوستيرون و LH و FSH في مصل ذكور الجرذان البيض لمدة 30 يوم	9-4
105	مقارنة لتأثير المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> وعقار السيكلوسبورين على قياسات اختبار المذب لخلايا الكبد Come Assay	10-4

قائمة الاشكال

رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
13	التركيب الكيميائي للسيكلوسبورين	1-2
28	مخطط تصميم التجربة الاولى	A1-3
29	مخطط تصميم التجربة الثانية	B1-3
40	يوضح التفاعل بين الكلوتاثيون والـ DTNB	2-3
42	المنحنى القياسي لحساب تركيز الكلوتاثيون	3-3
43	تفاعل محلول الثايوباربيتوريك مع المألونديالديهيد	4-3
45	المنحنى القياسي لانزيم SOD	5-3
48	المنحنى القياسي لتقدير تركيز هرمون الشحمون الخصوي T	6-3
49	المنحنى القياسي لتحديد تركيز الهرمون اللوتيني LH	7-3
51	المنحنى القياسي لتحديد تركيز الهرمون المحفز للجريبات FSH	8-3
56	المركبات الفعالة في المستخلص المائي لنبات <i>Rubus ulmifolius</i> .	1-4
56	Octadecadienoic acid-9,12	a2-4
56	Hexadecanoic acid, cyclohexyl ester	b 2-4
57	Methyl trans-9-octadecenoate	c2-4
57	Chloroethyl linoleate-2	d2-4
57	4,4-Dimethylcyclohexene	e2-4
58	Ethylimidazole-2	f2-4

58	Pentanedinitrile, 2-methyl-	g2-4
58	1,3-Dioxolane, 2-phenyl-	h2-4
59	2-Amino-2-oxoethyl acetate	y2-4

قائمة الصور

رقم الصفحة	عنوان الصورة	رقم الصورة
7	ثمار توت العليق	1-2
14	عقار السيكلوسبورين	2-2
26	فاكهة نبات توت	1-3
26	فاكهة التوت بعد تجفيفها وطحنها	2-3
32	صورة لجهاز كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة	3-3
62	مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ لمجموعة السيطرة السالبة	1-4
62	مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ لمجموعة السيطرة السالبة	2-4
63	مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في مجموعة المعاملة بالسيكلوسبورين	3-4
63	مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في مجموعة المعاملة بالسيكلوسبورين	4-4
64	مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في مجموعة المعاملة بالسيكلوسبورين	5-4
64	مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق	6-4
65	مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق مع السيكلوسبورين	7-4
71	مقطع عرضي من نسيج كلية جرذ لمجموعة السيطرة السالبة	8-4
71	مقطع عرضي من نسيج كلية جرذ في المجموعة المعاملة بعقار السيكلوسبورين	9-4
72	مقطع عرضي من نسيج كلية جرذ في المجموعة المعاملة بعقار السيكلوسبورين	10-4
72	مقطع عرضي من نسيج الكلية في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i>	11-4
73	مقطع عرضي من نسيج كلية الجرذ في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> مع عقار السيكلوسبورين	12-4

77	مقطع نسجي مستعرض في خصية جرد من مجموعة السيطرة	13-4
78	مقطع نسجي مستعرض في خصية جرد في المجموعة المعاملة بالسيكلوسبورين	14-4
78	مقطع نسجي مستعرض في خصى جرد في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i>	15-4
79	مقطع نسجي مستعرض في خصى جرد في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> مع عقار السيكلوسبورين	16-4
107	نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان لمجموعة السيطرة السالبة	17-4
107	نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان المجموعة المعاملة بعقار السيكلوسبورين	18-4
108	نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i>	19-4
108	نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> مع عقار السيكلوسبورين	20-4

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ALP	Alkaline phosphatase
AST	Aspartate transaminase
CAT	Catalase
CsA	Cyclosporine
DNA	Deoxyribonucleic acid
D.P.X	Dextrin Plasticizer Xylen
ELISA	Enzyme Link Immunosorbent Assay
FSH	Follicles stimulating hormone
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
GSH	Glutathione
H and E	Hematoxyline and Eosin
ALT	Alanine transaminase
L.S.D	Least Significant Difference
LH	Luteinizing hormone
MDA	Malondialdehyde
μL	Microliter
μmol	micromole
mg	Milligram
ml	Millimeter
nm	Nanometer
NFAT	Nuclear Factor of Activated T
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxide dismutase
T	Testosterone
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trichloro Acetic acid
U	Unit

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1. المقدمة Introduction:

ان النباتات الطبية واحدة من أهم مصادر الطب ويعتمد الملايين من الناس على الأدوية العشبية لعلاجهم. منذ العصور القديمة يعتمد أكثر من نصف سكان العالم على النباتات الطبية لعلاج أمراض بشرية مختلفة وتحظى باهتمام كبير في مجال الصحة العالمية. تعد النباتات الطبية مصادر جيدة للمواد الكيميائية مثل التربينويدات والفينولات والستيرويدات والفلافونويد (Pant et al., 2021).

ان نبات فاكهة التوت *Rubus* هو أحد أكثر الفواكه طلبًا، حيث يحتوي على مستويات أعلى من مضادات الأكسدة والبوليفينول والمعادن والمكونات النشطة بيولوجيًا مما يجعله جزءًا أساسيًا من نظام غذائي صحي للبشر وله دور في تقليل الأنشطة الميكروبية والاضطرابات الالتهابية وخاصة السرطان بالإضافة إلى خفض مؤشر نسبة السكر في الدم عن طريق تقليل السمعة والإجهاد التأكسدي لدى مرضى السكري من النوع 2. كما يقلل التوت *Rubus* من خطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية عن طريق تخفيف مستويات الكوليسترول في الدم وبالتالي تقليل حدوث تصلب الشرايين لدى البشر (Shah et al., 2023).

يتم تصنيف أنواع جنس *Rubus* في جميع أنحاء العالم إلى 12 جنسًا فرعيًا بالإضافة إلى ذلك، فإن النكهة اللطيفة لفاكهة *Rubus* الطازجة، ووظائفها الطبية بسبب الفوائد الصحية لمحتواها العالي جدًا من المستقبلات الثانوية وتنوعها الجيني العالي وتطورها المعقد جعلها مناسبة للدراسات العلمية (Meng et al., 2022).

ان توت العليق يعرف باسم *Rubus ulmifolius* يستخدم كمصدر للغذاء وكذلك في المربي والعصائر وما إلى ذلك لفوائده الطبية المزعومة. كما تم التحقيق فيه على نطاق واسع لمعرفة مكوناته الغذائية والحيوية النشطة، والتي قد تكون مسؤولة عن هذه الفوائد بشكل عام، يعد توت العليق غنيًا بالكربوهيدرات والدهون والفيتامينات والمعادن. الكربوهيدرات الأساسية هي الجلوكوز والسكروز؛ بينما أن حمض الأسكوربيك هو الفيتامين الأساسي، مما يساهم في الطبيعة الحمضية للفاكهة، تشمل المركبات النشطة بيولوجيًا التي تم تحديدها في أجزاء نبات توت العليق المختلفة البوليفينول مثل الأحماض الفينولية والفلافونويد والأنثوسيانين ومواد كيميائية أخرى. تم التحقيق في خصائص مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات لأجزاء مختلفة من نبات توت العليق. وقد عُزي التأثير المضاد للأكسدة إلى وجود حمض الأسكوربيك وكذلك المركبات البوليفينولية الأخرى. كما ان لتوت العليق نشاط مضاد للميكروبات ضد مسببات الأمراض البشرية الشائعة (Chauhan and Chauhan, 2022).

ان ادوية مثبطات المناعة Immunosuppressants هي الأدوية التي يساعد تركيبها على تثبيط استجابة الجهاز المناعي وتستهلك لمنع رفض الجسم للأعضاء او الأنسجة الجديدة المزروعة مثل نخاع العظم والكبد والكلية. فعندما يحدد الجهاز المناعي أي مادة غريبة في جسم الكائن الحي فإنه ينشط الاجسام المضادة لمهاجمتها وتدميرها (Salinas_Carmona et al., 2009).

ان السيكلوسبورين Cyclosporine(CsA) هو احد ادوية مثبطات المناعة تم اكتشافه في مختبر ساندوز في سويسرا عام 1972، ومنذ ذلك الحين أحدث ثورة في طب زراعة الأعضاء. تم اكتشافه في البداية أثناء البحث عن عوامل مضادة للفطريات جديدة ، ووجد أنه يتمتع بالعديد من الخصائص المناعية التي جعلته عاملاً جذاباً لقمع المناعة بعد عمليات زرع الكلى وغيرها من الأعضاء الصلبة(Tedesco and Haragsim, 2012). وتم عزله من فطر التربة Tolypocladium influm (Borel et al., 1976). وعمله الرئيسي هو تثبيط وظيفة وفعالية الخلايا اللمفاوية التائية T-lymphocytes دون التأثير على وظيفته البلعمية Phagocytes والخلايا الجذعية المكونة للدم (Bari et al., 2025). التثبيط المناعي الناتج عن استخدام السيكلوسبورين يؤدي بشكل واضح إلى زيادة خطر الإصابة بالعديد من الأمراض والعدوى، مثل عدوى فيروسية او بكتيرية وكذلك يسبب سرطان الجلد وايضا ارتفاع الكرياتين واليوريا وانخفاض معدل الترشيح الكبيبي (Barbarino et al., 2013).

الهدف من الدراسة The Aim of this study

هدفت الدراسة الحالية الى معرفه التأثير الوقائي النسيجي والوظيفي للمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في ذكور الجرذان البيض المعاملة بعقار Cyclosporine (CsA) من خلال دراسة المحاور التالية :

أولاً : محور الدراسة النسيجية ويشمل :

- 1- دراسة التغيرات النسيجية الناتجة من تأثير عقار ال Cyclosporine في أنسجة الكبد والكلية والخصية ومعرفة التأثير الوقائي للمستخلص المائي لنبات توت العليق على هذه التغيرات النسيجية .
- 2- دراسة القياسات النسيجية للكبد وتشمل معدلات اقطار كل من الخلايا الكبدية والجيبانيات والوريد المركزي.
- 3- دراسة القياسات النسيجية للكلية وتشمل معدلات اقطار كل من الكبيبة الكلوية والنيبيب المتلوي الداني والنيبيب المتلوي القاصي.

ثانيا: محور الدراسة الفسلجية ويشمل :

- 1- دراسة التغيرات في مستوى إنزيمات الكبد والتي تشمل : مستوى تركيز انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase (ALP) والانزيمين الناقلين لمجموعة الامين Aspartate transaminase (AST) و Alanine transaminase (ALT).
- 2- دراسة التغيرات في بعض المعايير الكيموحيوية في المصل والتي تشمل البروتين الكلي Total protein و الكلوبولين Globulin و الالبومين Albumin و مستوى اليوريا Urea الكرياتينين Creatinine .
- 3- قياس تركيز المألون ثنائي الديهايد Malondialdehyde (MDA) ومضاد الاكسدة الكلوتاثيون Glutathione (GSH) وسوبراوكسيد الفائق Superoxide dismutase (SOD) وتركيز انزيم الكاتليز Catalase (CAT) في مصل الدم .
- 4- دراسة التغيرات في مستوى هرمونات الخصى والتي تشمل هرمون الشحوم الخصوي (T) testosterone وهرمون اللوتيني (LH) luteinizing وهرمون المحفز لجريب (FSH) follicle-stimulating hormone في مصل الدم .

ثالثا: محور الدراسة الوراثية Genetic Test

اجراء اختبار تحلل الحامض النووي DNA ويسمى اختبار المذنب comet assay

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

2. استعراض المراجع Literature Review

1.2. النباتات الطبية Medicinal plants

تم استخدام النباتات الطبية منذ العصور القديمة ويمكن اعتبارها أصل الطب الحديث حيث اذ كانت المركبات ذات الأصل النباتي ولا تزال مصدرًا مهمًا للمركبات المستخدمة في الأدوية (Salmerón-Manzano *et al.*, 2020) ، و بحث الناس عن العقاقير في الطبيعة لعلاج أمراضهم. كانت بدايات استخدام النباتات الطبية غريزية، إن الوعي باستخدام النباتات الطبية هو نتيجة لسنوات عديدة من النضال ضد الأمراض التي بسببها تعلم الإنسان البحث عن العقاقير في اللحاء والبذور وأجسام الثمار وأجزاء أخرى من النباتات. وقد اعترف العلم المعاصر بفعاليتها، وأدرج في العلاج الدوائي الحديث مجموعة من العقاقير ذات الأصل النباتي (Petrovska, 2012). تحتوي النباتات الطبية على مجموعة كبيرة ومتنوعة من المركبات الكيميائية، والتي وجد في المختبر أنها تتمتع بأنشطة مضادة للميكروبات (Vaou *et al.*, 2021).

تستعمل النباتات الطبية كمورد طبي في جميع الثقافات تقريبًا ، أصبح ضمان سلامة وجودة وفعالية النباتات الطبية والأدوية العشبية مؤخرًا قضية رئيسية في البلدان الصناعية والنامية (Jamshidi-Kia *et al.*, 2017) ، لأنها تحتوي على الكثير من المواد الكيميائية الفعالة ذات الأهمية الطبية مثل الفينولات والكاروتينات والفلافونويد ولها الآثار الإيجابية على الصحة والوقاية من الأمراض (Schmelzer *et al.*, 2008; Venugopal and Liu, 2018).

وقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن النباتات الطبية كانت تستخدم لعلاج الأمراض البشرية لآلاف السنين بسبب أنشطتها المضادة للميكروبات ومضادات الأكسدة. تقلل النباتات الطبية من الإجهاد التأكسدي في الخلايا وتمنع السرطان وأمراض القلب والأوعية الدموية والالتهابات واضطرابات الجهاز الهضمي (Ozkan *et al.*, 2016). وقد أظهرت المستخلصات النباتية نشاطًا مضادًا للميكروبات ، وتتمتع النباتات الطبية بمركبات حيوية متنوعة لعلاج الميكروبات (Kebede *et al.*, 2021).

إن أهمية تطوير الطب التقليدي من منظور السلامة والفعالية والجودة يشير إلى أن هذا التطوير لا يساعد فقط في الحفاظ على التراث التقليدي، بل يعزز أيضًا استخدام الأدوية العشبية بشكل معقول في الرعاية الصحية البشرية ، كما يُبرز أهمية الطبيعة كمصدر غني بالمركبات المستخلصة من النباتات الطبية التي تتمتع بخصائص فريدة بفضل تركيبها الكيميائي والبيولوجي، ما يجعلها تحظى بقبول عالمي

باعتبارها طرقاً طبيعية لعلاج الأمراض وتحسين الصحة في النهاية، يعد التنوع الكيميائي للمصادر الطبيعية من أبرز العوامل التي تسهم في اكتشاف أدوية جديدة ونتائج علاجية مبتكرة (Mukherjee et al., 2017).

2.2. النبات المستعمل في الدراسة : جنس فاكهة توت العليق

الاسم العلمي : *Rubus ulmifolius*

الاسم الشائع : Blackberry

الاسم العربي : فاكهة توت العليق

1.2.2. التصنيف العلمي لنبات توت العليق:

تم الاعتماد على (Guest and Townsend(1966 في تصنيف نبات توت العليق

Kingdom : Planta

Division : Angiosperm

Class : Dicotyledon

Order : Rosales

Family : Rosaceae

Genus : Rubus

Species : *Rubus ulmifolius*

2.2.2. جنس نبات *Rubus*

يتألف جنس *Rubus* من 900-1000 نوع موزعة في جميع أنحاء العالم , وجد علماء الآثار أدلة على استخدام *Rubus* يعود تاريخها إلى حوالي 8000 سنة قبل الميلاد، مما افترض أن أنواع جنس *Rubus* كانت تستخدم منذ فترة طويلة كغذاء ومصدر طبي، تعد أنواع *Rubus* مصادر غنية للمركبات النشطة بيولوجيًا (Zengin et al., 2019). توت العليق من أعضاء عائلة Rosaceae، وهما مصنفان ضمن جنس *Rubus* (Martin et al., 2013). وهو جنس أصلي ، يشمل التوت الأسود والتوت الأحمر وهجائهما ويشار إليه عادة باسم العليق، وتستخدم أنواع جنس *Rubus* مصدرًا غذائيًا ودوائيًا للشعوب، وتشمل الاستخدامات الحديثة توت العليق استهلاكه كفاكهة طازجة لذينة في المربى والهلام والمعجنات ومنتجات الألبان والعصائر، تتمتع هذه الثمار الصغيرة أو اللينة بقدرة عالية على مقاومة الأكسدة ومحتوى عالٍ من الأنثوسيانين وفيتامينات عالية وسكريات بسيطة ومحتوى عالٍ من المعادن ، يحتوي جنس *Rubus* وهو أحد أكثر الاجناس تنوعًا في مملكة

النبات، على الكثير من الاجناس الفرعية تم تقسيمها إلى 12 أو 15 جنسًا فرعيًا، هذه الاجناس المتنوعة أصلية في ست قارات وتم العثور عليها من قمم الجبال إلى المواقع الساحلية عند مستوى سطح البحر، على الرغم من أن توت العليق شائع في المناطق المعتدلة الباردة في نصف الكرة الشمالي، إلا أن غالبية أنواع *Rubus* أصلية في جزر جنوب المحيط الهادئ (Hummer, 2010).

تتميز أشجار توت العليق بقدرتها على تحمل الجفاف والفيضانات ودرجات الحرارة المرتفعة، في حين تتميز أشجار التوت الأحمر بقدرتها على تحمل الشتاء البارد. بالإضافة إلى ذلك، تتميز هذه الأشجار بقدرتها على التكاثري القوي إما عن طريق الترقيع على الأطراف أو امتصاص الجذور (Graham and Woodhead, 2010).

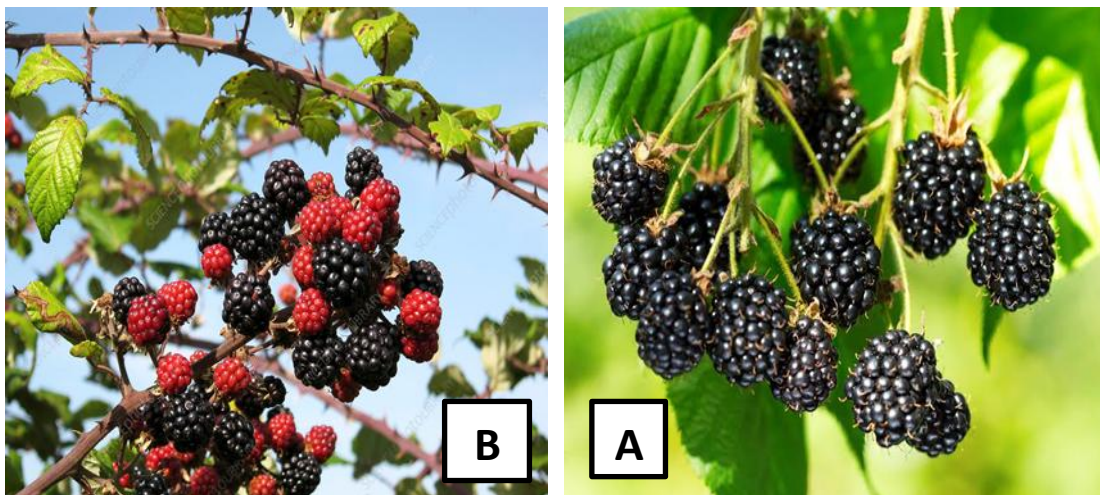
إن أشجار نبات التوت معمرة وصغيرة لها تأثيرات مضادة للبكتيريا ومضادة للالتهابات ومضادة للأكسدة ومضادة للشيخوخة وتأثيرات أخرى، ويفضلها العديد من المستهلكين في السوق يتكيف توت العليق بشكل كبير مع الظروف البيئية مثل الرطوبة والمناخ والتربة ولديها مزايا مقاومة الجفاف ومقاومة الأمراض والآفات الحشرية والنمو القوي والتكاثر السهل. في عام 1986 تم إدخال العليق لأول مرة إلى الصين من قبل معهد علم النبات، الأكاديمية الصينية للعلوم (Huang et al., 2022).

3.2.2. وصف وموطن نبات توت العليق *Rubus ulmifolius*

ينتمي توت العليق إلى عائلة الورديات (Rosaceae) و جنس *Rubus* ان الاسم العلمي لتوت العليق هو *Rubus ulmifolius* (MJ Kim et al., 2016)، وهو شجيرة معمرة تُعرف عادةً باسم التوت البري وهو منتشر على نطاق واسع في آسيا وشمال إفريقيا وأوروبا، وخاصة في شبه الجزيرة الأيبيرية. يكون موسم الإزهار بين مايو ويونيو، يليه نضج وتطور الثمار، ويتغير لون الثمار أثناء النضج من الأخضر إلى الأسود يتم استهلاك هذه الثمار طازجة أو كمنتجات مشتقة مثل المربى والعصائر والمشروبات الكحولية، بسبب نكهتها وطعمها اللذيذ وكانت مركباتها النشطة بيولوجيًا هي المحور الرئيسي للعديد من الدراسات العلمية (da Silva et al., 2019). وهي كروية الشكل، ذات نكهة حمضية ولون أسود في نهاية النضج (Schulz et al., 2019). تحمل النباتات عادة سيقانًا ثنائية الحول أو شبه خشبية تسمى قصبًا. وهي تتراوح من شجيرات مترامية الأطراف إلى شبه منتصب، منتشرة ذات أشواك وأوراق، وينمو الساق حتى طول 7 أمتار ويكون لونه أخضر أو أرجواني أو أحمر، يعتمد لون فاكهة العليق وعصيرها على الصبغات الطبيعية الموجودة فيه، تنمو الأزهار والثمار في شكل عناقيد تشبه النورات، ينمو التوت الأسود مرتين في السنة في الربيع والخريف، وهذا النوع

من النبات يكون حاوي على اشواك كثيرة (Zia-Ul-Haq et al., 2014).

بينت الدراسات السابقة انه خلال عملية نضج الثمار، تميل أصباغ الأنثوسيانين والسكريات إلى الزيادة. وعلى العكس من ذلك، تميل الحموضة القابلة للقياس ودرجة الحموضة إلى الانخفاض (Castro et al., 2022). وكذلك تحتوي الفاكهة على مستويات عالية من الفلافونويدات (Hajaji et al., 2017).



صورة (A and B 1-2) : توضح ثمار توت العليق (Martins et al., 2024)

4.2.2. المكونات الفعالة لفاكهة توت العليق

لقد تم استعمال التوت تقليدياً من قبل العديد من الثقافات لعلاج أمراض مختلفة، واثبت أن مستخلصات التوت لها أنشطة مضادة للالتهابات ومضادة للأكسدة ومضادة للسرطان ومضادة للميكروبات ومضادة للديدان (Bakar et al., 2016). لتوت العليق العديد من المكونات النشطة بيولوجيا مثل الفلافونويدات والعفص والانتوسيانين والتربينويدات والاحماض الفينولية من بين هذه المكونات تعد الانتوسيانينات مهمة بشكل خاص لأنها مسؤولة عن الألوان في التوت وهي معروفة بخصائصها المضادة للأكسدة وان توت العليق هو اكثر أنواع التوت احتوائاً على مضادات اكسدة طبيعية (Sadik et al., 2024).

اظهر التحليل الكيميائي لمستخلص توت العليق وجود العديد من المركبات النشطة، حيث أظهرت الثمار تركيزاً عالياً من الكربوهيدرات ومحتوى منخفض من الدهون، وان الجلوكوز والفركتوز أكثر السكريات الحرة وفرة التي تم اكتشافها وأظهر حمض الكينيك أعلى محتوى مقارنة بالأحماض العضوية

الأخرى (da Silva et al., 2019). وتحتوي هذه الفاكهة على العديد من المعادن منها البوتاسيوم والكالسيوم والصوديوم ومعظم المركبات الفينولية، ومن بين المركبات الفينولية التي تم تشخيصها منها كان الكيرسيتين والإيزوكيرسيتين (Schulz et al., 2019) وان المستخلص المائي لنبات توت العليق يمتلك نشاطاً لإزالة الجذور الحرة (Martins et al., 2023). وكذلك فإن الفلافونويدات والعفصات لها نشاط مضاد للأكسدة وخافض للحرارة (Akkari et al., 2016) المكونات الرئيسية للتوت هي الألياف والسكريات الأحادية (مثل الجلوكوز والفركتوز) كما يحتوي على عدد كبير من الأيونات غير العضوية منها (الزنك والمغنيسيوم والنحاس والمنغنيز والسيلينيوم، والفوسفور) كما إنها غنية بالفيتامينات، مثل فيتامينات E، C، A، المعروفة بنشاطها المضاد للأكسدة، يحتوي توت العليق على العديد من المكونات النشطة بيولوجياً، مثل البوليفينولات، والتوكوفيرولات، والكاروتينات، والأحماض الدهنية. تشمل مجموعة البوليفينولات الفلافونويدات (الأنثوسيانين، والكامفيرول، والكاتشين)، والأحماض الفينولية (خاصةً حمض الإلاجيك)، والسيتيلينات (مثل الريسفيراترول)، الأنثوسيانين ومجموعة من الفلافان-3 مثل المالفيدين والسيانيدين والبيتونيدين والدلفينيدين والبيلاجونين وجميعها تُظهر نشاطاً قوياً مضاداً للأكسدة. (Socha et al., 2023)

5.2.2. الاستعمالات الطبية لفاكهة توت العليق

تم استخدام فاكهة توت العليق بسبب قيمتها الغذائية لعلاج مشاكل الجهاز الهضمي والأمراض الجلدية في العديد من البلدان، فقد أظهرت دراسات مختلفة الاستعمال أجزاء مختلفة من النبات في الطب العشبي لفترة طويلة لعلاج العديد من الأمراض مثل مرض السكري وارتفاع ضغط الدم واضطرابات الجهاز الهضمي وقرحة الفم وأمراض القلب وآلام الدورة الشهرية والبواسير والتهاب اللوزتين وأمراض الجلد وما إلى ذلك، يتم استهلاك ثمار توت العليق طازجة أو في المربى والعصائر (Mehiou et al., 2024). تستعمل الأوراق الطازجة في الطب الشعبي لعلاج الخراجات والدمامل والقرح؛ ويستهلك مغليات الأوراق خارجياً لعلاج احمرار العينين وغسيل المهبل والقلاع و داخلياً لعلاج الإسهال والبواسير والتهابات الأمعاء، كما ان مستخلصات فاكهة توت العليق تستعمل لخفض السكر في الدم والذي تم إثباته تجريبياً على الفئران، حيث بينت دراسات الكيمائية السابقة للأجزاء الهوائية من النبات بوجود مركبات الفلافونويد مثل الكيرسيتين والكامفيرول، والأحماض الكافيينية والكلوروجينية والأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة (Panizzi et al., 2002).

تسهم الفاكهة في اتباع نظام غذائي صحي لتأثيراتها في الوقاية من متلازمة التمثيل الغذائي على مستويات مختلفة مثل أمراض القلب والأوعية الدموية ومرض السكري من النوع الثاني

(Triggiani and Franconi, 2018) تحظى الفاكهة بتقدير كبير بسبب مزيج من لونها الجذاب ونكهتها وطعمها المرغوبين، فضلاً عن فوائدها الكثيرة على صحة الإنسان (مضادات الأكسدة ومضادات السرطان ومضادات الالتهابات) تستعمل أوراق وبراعم *Rubus ulmifolius* الصغيرة كمضادات للالتهابات ومضادات آلام الأسنان ومضادات التشنجات المعوية وقد استنتج أن مستخلص *Rubus ulmifolius* له تأثير إيجابي كمضاد لارتفاع دهون الدم على الفئران البيضاء المصابة بمرض السكري (Akkari et al., 2016).

المواد المضادة للأكسدة هي مركبات كيميائية نباتية تساهم في تأخير الشيخوخة والوقاية من الأمراض عن طريق محاربة الجذور الحرة التي تضر الحمض النووي وتسبب تلف الخلايا والموت. يُعد الثوت من المحاصيل التجارية الهامة، حيث يُزرع على نطاق واسع في المناطق المعتدلة حول العالم. يتمتع الثوت بكمية كبيرة من مضادات الأكسدة متعددة الفينول، مثل صبغات الأنثوسيانين، التي ترتبط بفوائد صحية محتملة في الوقاية من العديد من الأمراض. كما يساهم ثوت العليق في زيادة نسبة الألياف الغذائية، مما يجعله من بين الأطعمة النباتية الأكثر غنى بالألياف، بنسبة تصل إلى 20٪. بالإضافة إلى ذلك، ان الانشطة البيولوجية التي اظهرها مستخلص نبات ثوت العليق مصدرًا غنيًا بفيتامين C، وحمض الفوليك، والمغنيسيوم، والنحاس، والحديد. ويتميز الثوت بوجود حمض الإلاجيك (المستمد من الإلاجيتانين) والأنثوسيانين، مما يجعله من أقوى الفواكه في محتواها من مضادات الأكسدة (Abdu and Majeed, 2012).

تحتوي الفاكهة على نسبة عالية من مركب الأنثوسيانين بالوان تتراوح بين الأصفر الفاتح إلى الأزرق الداكن، والمركبات البوليمرية عديمة اللون المعروفة بالبروانثوسيانيدين (أو العفص المكثف)، هي مستخلصات فلافونويدية شائعة يعد كلاهما من المنتجات النهائية لمسار الفلافونويد وقد أظهرت الدراسات أن الأنثوسيانين يساهم في تعزيز وظيفة الجهاز المناعي، كما يلعب دورًا في حماية الدماغ من الاضطرابات العصبية المرتبطة بالتقدم في العمر، بالإضافة إلى امتلاكه خصائص مضادة للسرطان، تم تعزيز تركيزه بشكل كبير في المرحلة الأخيرة من التحول من اللون الأحمر إلى الأسود، ليصل إلى ذروته في الثمار السوداء الناضجة تمامًا (Chen Qing et al., 2012). استعمل الناس أجزاء مختلفة من النبات دون أن يدركوا أن هذه الأجزاء تحتوي على مركبات يمكن أن تشفي مجموعة متنوعة من الأمراض. في الواقع، يمكن أن يساعد وجود المركبات النشطة بيولوجيًا في علاج مجموعة واسعة من الأمراض، بما في ذلك السرطان والسكري وارتفاع ضغط الدم والالتهابات (Bramki et al., 2024).

وكذلك استخدم توت العليق في الطب الصيني التقليدي، استُخدم مزيج من توت العليق الصيني (*Rubus chingii*) ومنشط "يانغ" لعلاج العقم والعجز الجنسي وآلام أسفل الظهر وضعف البصر وكثرة التبول (Hummer, 2010). يُعد التوت من بين المكونات الحيوية في النظام الغذائي الصحي. وعادةً ما تُستهلك ثماره الصغيرة ذات اللب الطري في شكل طازج ومجمد ومجفف ومنتج (Alejandro *et al.*, 2012). وقد حظيت باهتمام كبير نظرًا لفوائدها المحتملة لصحة الإنسان (Milivojević *et al.*, 2011) وقد أفادت دراسات سابقة بتأثير النضج على الخصائص الفيزيائية والكيميائية والتغذوية. والمكونات النشطة بيولوجيًا، وخصائص مضادات الأكسدة في ثمار التوت (Seraglio *et al.*, 2018 ; Schulz *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2015).

أظهرت النتائج أنه أثناء النضج، تميل أصباغ الأنثوسيانين، والقدرة المضادة للأكسدة، والمواد الصلبة الذائبة الكلية، والسكريات إلى الزيادة. في المقابل، تميل الحموضة القابلة للمعايرة ودرجة الحموضة إلى الانخفاض، بينما يُزعم أن الفينولات والمعادن غير الأنثوسيانين لا تُظهر اتجاهًا محددًا تحدث هذه التغييرات أثناء النضج بسبب سلسلة من العمليات البيوكيميائية والفيولوجية المشتركة (Schulz *et al.*, 2015).

وفقًا لأبحاث حديثة يتمتع التوت بخصائص بيولوجية إيجابية يمكن أن تساعد في الوقاية من الأمراض المزمنة، مثل السرطان والسمية العصبية والسمنة والسكري وفقدان الذاكرة (Manzoor *et al.*, 2022). يُعد استعماله في القطاعات الصيدلانية أمرًا بالغ الأهمية لتحسين الصحة بشكل طبيعي ودون آثار جانبية، لم تُلاحظ أي آثار سلبية لتناول التوت الأسود أو التوت البري، مما يجعله استراتيجية غذائية مجدية وفعالة لتحسين تشخيص الأمراض.

3.2. الأدوية المثبطة للمناعة Immunosuppressive Drugs

هي فئة من الأدوية تُستخدم لتقليل أو كبح استجابة الجهاز المناعي في الجسم، وذلك من خلال خفض إنتاج السيتوكينات أو التأثير على عملية تصنيع الحمض النووي الخلوي (DNA) المسؤول عن نقل المعلومات الوراثية (Kant *et al.*, 2009).

تعمل هذه الأدوية على الحد من إنتاج الخلايا المناعية وتقليل نشاطها، مما يمنع تكاثرها، ويستعمل هذا النوع من الأدوية بشكل أساسي لمنع رفض الجسم للأعضاء أو الأنسجة المزروعة حديثًا، مثل الكلى، القلب، أو نخاع العظم. كما تُستخدم أيضًا في معالجة أمراض المناعة الذاتية، مثل التهاب المفاصل الروماتويدي، إضافةً إلى دورها في علاج بعض الأمراض غير المرتبطة بالمناعة، مثل الربو التحسسي، وهو مرض مزمن يصيب الرئتين (Salinas-Carmona *et al.*, 2009). تتفاعل الأدوية المثبطة للمناعة مع أدوية أخرى، مما يؤثر في نشاطها وأيضها. ويمكن تقييم تأثير الأدوية

المتبطة عن طريق قياس تأثيرها على عدد الخلايا اللمفاوية في أنسجة الجسم، وذلك باستخدام تقنية "التلوين المناعي النسجي"، وهي التي تعتمد على استخدام الأجسام المضادة لاستهداف خلايا أو جزيئات معينة داخل الجسم بشكل دقيق، بهدف تعطيل نشاطها أو تدميرها، وتستخدم غالباً في علاج أمراض المناعة الذاتية وبعض أنواع السرطان (Gillett and Chan, 2000). فيما يلي أنواع مثبطات المناعة مصنفة حسب آلية عملها، مع أمثلة على كل نوع (Chen et al., 2014).

- مثبطات المناعة من نوع الستيرويدات القشرية (Corticosteroids) تعمل على تثبط الالتهاب وتقلل من نشاط الجهاز المناعي مثل بوديسونيد (Budesonide) و بريدنيزون (Prednisone).
- مثبطات المناعة من نوع كابتات إنزيم (Janus kinase inhibitors) تعمل على إعاقة إشارات السيتوكينات التي تحفز الاستجابة المناعية مثل Tofacitinib
- مثبطات المناعة من النوع كابتات انزيم mTOR هذه تثبط نمو وتكاثر الخلايا المناعية مثل Everolimus , Sirolimus
- مثبطات المناعة من نوع كابتات الانزيم نازع الهيدروجين من الانوسين أحادي الفوسفات (Inosine monophosphate dehydrogenase inhibitors) تمنع تخليق الحمض النووي وتكاثر الخلايا اللمفاوية مثل Azathioprine ، Mycophenolate
- مثبطات المناعة من نوع المستضدات أحادية المنشأ (Monoclonal antibodies) تستهدف مكونات محددة في الجهاز المناعي لتعطيلها أو منع نشاطها مثل Daclizumab ، Basiliximab
- مثبطات المناعة من نوع كابتات الكالسينيورين (Calcineurin inhibitors) تمنع تنشيط الخلايا التائية وتقليل إفراز السيتوكينات مثل Cyclosporine

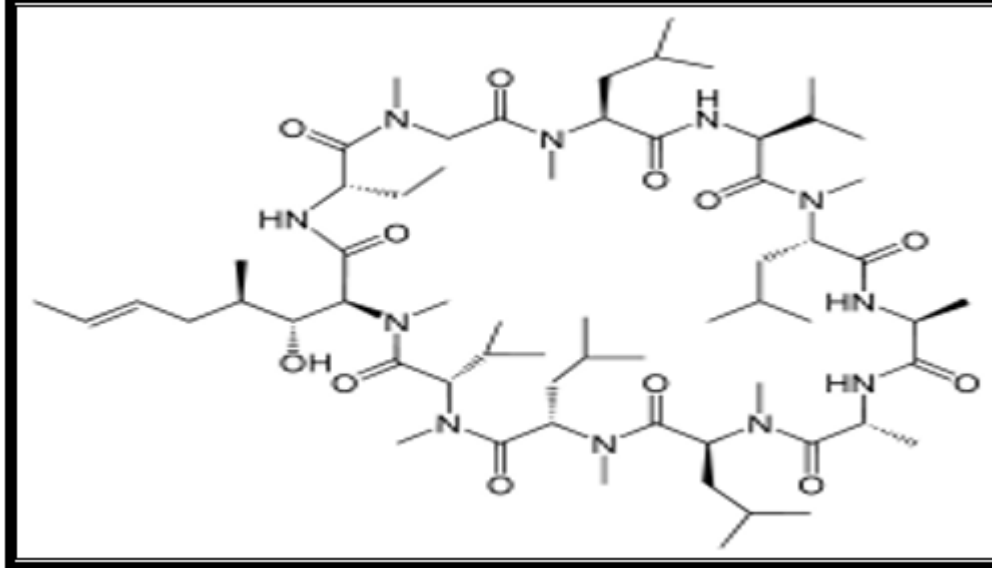
4.2. السيكلوسبورين (CsA) Cyclosporine :

السيكلوسبورين هو ببتيد حلقي يتميز بخصائص قوية كمثبط للمناعة، ويستعمل بشكل رئيسي كعامل مثبط للمناعة في حالات زراعة الأعضاء. تُعد الطريقة المفضلة لتناوله هي عن طريق الفم، إلا أن من أبرز عيوبه عند تناوله فمويًا هو ضعف الامتصاص، الذي قد يكون بطيئًا وغير منتظم، مما يؤثر على فعاليته السريرية. (Holt et al., 1994) يتكوّن عقار السيكلوسبورين من ببتيد حلقي (cyclic peptide) يتألف من 11 حمضًا أمينيًا شكل (1-2). ويتميز بكونه كارهاً للماء (hydrophobic)، مما يجعله ذو قابلية عالية للذوبان في الدهون ومن بين أهم المذيبات التي يمكن أن يُذاب فيها السيكلوسبورين زيت الخروع وزيت الذرة، إذ يُستخدمان في تحضير صيغ دوائية مناسبة للامتصاص

(Forsythe and Paterson, 2014). الصيغة الكيميائية لعقار السيكلوسبورين هو $(C_{62}H_{111}N_{11}O_{12})$ وهو عامل مناعي قوي ومضاد حيوي يتم انتاجه بواسطة الفطريات (Hall et al., 2003). تم اكتشاف السيكلوسبورين لأول مرة عام 1970 على يد العالم جان بوريل (Jean Borel) وزملائه في مختبرات ساندوز (Sandoz Laboratories) في سويسرا، حيث تم استخلاصه من فطر *Tolypocladium inflatum*.

وقد شكّل هذا الاكتشاف نقلة نوعية في مجال زراعة الأعضاء، إذ استُخدم السيكلوسبورين لأول مرة كمثبط مناعي فعال لمنع الرفض الحاد لدى المرضى متلقي زراعة الأعضاء الصلبة مثل الكبد، الكلى، والقلب، ما ساعد بشكل كبير على تحسين نجاح عمليات الزراعة (Amor et al., 2010). اهم نشاط للسيكلوسبورين هوة تثبيط الاستجابة المناعية ويعد السيكلوسبورين مُنشِط للخلايا التائية، يمنع إنتاج الخلايا التائية للسيتوكينات الالتهابية (Bari et al., 2025). يتم استقلاب السيكلوسبورين على نطاق واسع في الكبد بواسطة إنزيم CYP3A، كما تشارك الأمعاء والكلى بدرجة أقل في هذا الاستقلاب. ويتم التخلص من السيكلوسبورين ومستقبلاته بصورة أساسية عبر العصارة الصفراوية، مع إخراج ضئيل عبر البول (Tedesco and Haragsim, 2012). السيكلوسبورين هو عامل مثبط للمناعة يُستخدم على نطاق واسع في علاج أمراض المناعة الذاتية مثل التهاب المفاصل الروماتويدي والصدفية وبعد عمليات زراعة الأعضاء وان استعمل السيكلوسبورين في التطبيقات الطبية والتجريبية قد يكون محدودًا بسبب بعض الآثار الجانبية، مثل السمية الكلوية، ارتفاع ضغط الدم، والسمية الكبدية، لكن لا يزال السيكلوسبورين أحد أكثر العوامل المثبطة للمناعة استخدامًا نظرًا لفعاليتها العلاجية القوية في تحسين معدلات النجاح بعد زراعته الأعضاء (Duttgupta et al., 2016). ان لعقار السيكلوسبورين دورا كبير في علاج الالتهابات الفطرية والبكتيرية والفايروسات (Gumus et al., 2009). كما للعقار دور في علاج الالتهابات متعددة مثل التهاب الحبل الشوكي والمفاصل والتهاب المجاري البولية والتنفسية (Tugwell, 1995). تم استعمال السيكلوسبورين في المجال السريري لأول مرة في أواخر السبعينيات، حيث قام Calne وزملاؤه (1979) بتجربته لمنع رفض الأعضاء المزروعة، وقد مثّل هذا الحدث نقطة تحول في مجال زراعة الأعضاء، إذ أدى إلى تحسّن كبير في معدلات نجاح الزرع بفضل التأثير المناعي الانتقائي للسيكلوسبورين مقارنةً بالعلاجات السابقة (Calne et al., 1979). لتحقيق نتائج مثلى في زراعة الأعضاء باستخدام السيكلوسبورين، من الضروري الحفاظ على توازن دقيق بين التثبيط المناعي الكافي لمنع رفض العضو، وتجنّب الكبت المناعي المفرط الذي قد يؤدي إلى آثار جانبية خطيرة في حالة قصور التثبيط المناعي، يرتفع خطر

رفض العضو المزروع وفشل عملية الزرع. أما في حالة فرط التنشيط المناعي، فيزداد احتمال التعرض لمضاعفات مثل العدوى الانتهازية والأورام الخبيثة، بالإضافة إلى التأثيرات السامة للسيكلوسبورين (Alqadi et al., 2024).



شكل (1-2) التركيب الكيميائي للسيكلوسبورين (Duttagupta et al., 2016)

يُعد السيكلوسبورين من الأدوية التي تتميز بمجال علاجي ضيق، أي أن الفرق بين التركيز العلاجي والتركيز السمي صغير نسبيًا. كما أن التوافر الحيوي للسيكلوسبورين بعد الإعطاء الفموي متفاوت بشكل كبير بين المرضى، مما ينعكس على اختلاف تراكيز الدواء في الدم. ونظرًا لهذه التباينات الفردية، تُعد المراقبة العلاجية لمستويات السيكلوسبورين Therapeutic Drug Monitoring (TDM) ذات أهمية بالغة. فهي تهدف إلى ضبط تركيز الدواء ضمن النطاق العلاجي المثالي، مما يساعد في تحقيق الفعالية المثلى للدواء، وفي الوقت ذاته الحد من خطر السمية، خاصة بعد عمليات زراعة الأعضاء حيث تكون جرعة الدواء الحساسة عاملاً حاسماً في نجاح العلاج (Morris, 2003).



صورة (2-2) عقار السيكلوسبورين

1.4.2. آلية عمل السيكلوسبورين Mechanism of Cyclosporine

يعمل السيكلوسبورين كمثبط للمناعة من خلال تثبيط الإشارات المنقولة إلى مستقبلات الخلايا التائية (T-cells)، والتي تُعد أساسية في تفعيل الاستجابة المناعية، يحدث هذا التأثير عبر ارتباط السيكلوسبورين ببروتين cyclophilin داخل الخلية (Ghosh *et al.*, 1996). ويكون معقدًا يثبط إنزيم الكالسينيورين (calcineurin)، هذا التثبيط يمنع عملية إزالة الفسفرة (dephosphorylation) من عامل النسخ NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)، وبالتالي لا يتمكن NFAT من الانتقال إلى نواة الخلية. ونتيجة لذلك، لا يحدث تنشيط للجينات المسؤولة عن تخليق العديد من السيتوكينات، وعلى رأسها الإنترلوكين-2 (IL-2)، الذي يلعب دورًا محوريًا في تنشيط وتكاثر الخلايا التائية. بالإضافة إلى ذلك، يُثبط السيكلوسبورين إنتاج عدة ليمفوكينات أخرى، مثل IL-3 و IL-4 و TNF- α ، كما يُثبط التعبير عن بعض البروتينات المرتبطة بالموت الخلوي المبرمج، مما يعزز تأثيره المثبط للمناعة (Elrod *et al.* 2010). حيث يمنع السيكلوسبورين تنشيط الخلايا التائية من خلال تثبيط إنتاج الإنترلوكين-2 (IL-2)، وهو السيتوكين الأساسي لنمو وتكاثر الخلايا التائية. فعندما يتم تثبيط إنزيم الكالسينيورين، لا يستطيع عامل النسخ NFAT دخول النواة لتنشيط الجينات المسؤولة عن تخليق IL-2. وبالتالي، تفشل الخلايا التائية في إنتاج IL-2، مما يؤدي إلى إعاقة تنشيطها وتكاثرها، ويُضعف بذلك الاستجابة المناعية، وهو ما يُعد محور فعالية

السيكلوسبورين في الوقاية من رفض العضو. (Brabletz *et al.*, 1991) لا يقتصر تأثير السيكلوسبورين على الخلايا التائية (T-cells)، بل يشمل أنواعاً أخرى من الخلايا المناعية المشاركة في الاستجابة المناعية، مثل الخلايا البائية (B-cells)، والعدلات (Neutrophils). حيث يتمثل التأثير العام للسيكلوسبورين في تثبيط إنتاج السيتوكينات وتقليل تكاثر وتفعيل الخلايا المناعية، مما يؤدي إلى انخفاض عدد ونشاط هذه الخلايا في موقع الالتهاب. وبذلك، يساهم السيكلوسبورين في تقليل شدة الاستجابة الالتهابية، وهو ما يجعله فعالاً في علاج حالات رفض العضو والأمراض المناعية الذاتية. (Forsythe and Paterson, 2014)

2.4.2. الآثار الجانبية للسيكلوسبورين Side Effects of Cyclosporine

عند استخدام السيكلوسبورين، قد تحدث العديد من الآثار الجانبية نتيجة تأثيره المباشر على أجهزة مختلفة في الجسم، وأهمها السمية الكلوية والسمية العصبية كذلك يؤدي الى ارتفاع ضغط الدم وزيادة مستوى السكر في الدم واضطرابات في الجهاز الهضمي (Tapia *et al.*, 2018). تعتمد التأثيرات الجانبية لعقار السيكلوسبورين على عدة عوامل، بما في ذلك الجرعة، مدة الاستخدام، مستوى الدواء في الدم، الحالة الصحية للمريض، التداخلات الدوائية، العمر، والنمط الجيني (Baughman *et al.* 2012). التثبيط المناعي الناتج عن استخدام السيكلوسبورين يؤدي بشكل واضح إلى زيادة خطر الإصابة بالعديد من الأمراض والعدوى، مثل عدوى فيروسية أو بكتيرية وكذلك يسبب سرطان الجلد وايضا ارتفاع الكرياتين واليوريا وانخفاض معدل الترشيح الكبيبي (Barbarino *et al.*, 2013). يؤثر السيكلوسبورين بشكل ملحوظ على الخصية من الناحيتين الشكلية والوظيفية (Abdelkader *et al.*, 2021). تشمل الآليات التي يسببها السيكلوسبورين سمية في الخصيتين عن طريق زيادة إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية Reactive Oxygen Species وتحفيز إفراز السيتوكينات الالتهابية، بالإضافة إلى تنشيط عملية موت الخلايا المبرمج (Apoptosis) في الخلايا المسؤولة عن إنتاج الحيوانات المنوية. تؤدي جميع هذه التغيرات إلى تلف بالغ في الغدد التناسلية، مما ينعكس سلباً على خصوبة الذكور (Drobnis and Nangia 2017).

3.4.2. الآثار الجانبية للسيكلوسبورين على الكبد و الكلية

يُعتبر تلف الكبد الناجم عن التسمم الكبدي مصدر قلق صحي عالمي خطير. ومن بين الأسباب المختلفة للتسمم الكبدي، يُعد التسمم الكبدي الناجم عن الأدوية أكثر خطورة، ويحد من استخدام الأدوية (Attia *et al.*, 2022). ونتيجةً لذلك، أصبح علاج التسمم الكبدي الناجم عن الأدوية والوقاية منه مطلباً ملحاً. يُعد السيكلوسبورين من مثبطات الكالسينيورين يُستخدمان بفعالية لقمع المناعة

بعد جراحة زراعة الأعضاء. ومع ذلك، يجب حقن المرضى بالسيكلوسبورين لفترة طويلة جدًا لتجنب حدوث استجابة مناعية ذاتية. ولسوء الحظ، يُسبب هذا الاستخدام الطويل العديد من المشاكل الصحية، وخاصةً التسمم الكلوي والتسمم الكبدي. وقد أفادت العديد من الدراسات التي أُجريت على الحيوانات أن إعطاء السيكلوسبورين أثر على وظائف الكبد وبنيته (Elmoslemany *et al.*, 2021; Vangaveti *et al.*, 2021). في الإجهاد التأكسدي، والالتهاب، وموت الخلايا المبرمج هي ثلاث آليات رئيسية وان لها دور كبير في سمية الكبد الناجمة عن السيكلوسبورين (Serrya *et al.*, 2016; El-Sherbeeney and Nader, 2016).

يمكن أن يزيد السيكلوسبورين أيضًا من تلف الحمض النووي وتجزؤه في الخلايا الكلوية والحيوانات المنوية (Elmoslemany *et al.*, 2021; Pan *et al.*, 2018).

يُعد تنشيط إجهاد الشبكة الإندوبلازمية آلية أخرى أُجريت عليها أبحاث مؤخرًا، ويمكن أن يمارس CsA من خلالها تأثيره السام للكلية (Yilmaz *et al.*, 2022). يتضمن مسار إجهاد الشبكة الإندوبلازمية العديد من الجينات، مثل انقسام بروتين ربط إكس بوكس 1 (XBP1)، وبروتين الغلوبولين المناعي المرتبط، والبروتين المتمائل (C/EBP (CHOP). ومع ذلك، لا يُعرف حتى الآن إلا القليل عما إذا كانت سمية الكبد الناجمة عن CsA ناتجة أيضًا عن تنشيط إجهاد الشبكة الإندوبلازمية. أفادت العديد من الدراسات السابقة بالتأثيرات المُحسنة الملحوظة لمضادات الأكسدة على سمية الكبد المُستحثة بالسيكلوسبورين في حيوانات التجارب (Cybulsky, 2017).

عادةً ما تكون الآثار الجانبية للسيكلوسبورين مصحوبة بتغيرات نسجية مرضية في أعضاء مختلفة من الجسم مثل الكلى والكبد والقلب (Freitas *et al.*, 2013) وأنسجة الخصية والبروستاتا (Rezzani, 2004). تشمل آليات السمية التي يسببها السيكلوسبورين زيادة إطلاق أنواع الأكسجين التفاعلية وزيادة تكوين السيتوكينات المؤيدة للالتهابات وتحريض موت الخلايا المبرمج. قد تؤدي هذه التأثيرات إلى أحداث سامة خطيرة في الأنسجة (Drobnis and Nangia, 2017). لاحظ Nair وجماعته (2002) أنه بسبب انحلال الخلايا ونخرها الذي أظهرته المقاطع النسجية المرضية نتيجة لتأثير الإجهاد التأكسدي، لذلك فإن الإجهاد التأكسدي هو الآلية الرئيسية لتلف الأنسجة في الأعضاء. (Chandra *et al.*, 2010). كما أوضح Mazzaferro وجماعته (1990) بأن عقار السيكلوسبورين له دور في بتلف الحمض النووي التأكسدي وزيادة محتوى NADPH، وأن تراكم أنواع الأكسجين التفاعلية في الأعضاء قد يؤدي إلى تلف الحمض النووي مصحوبًا بزيادة مستويات 8-OHdG في الأنسجة. في حين أن تأثير أنواع الأكسجين التفاعلية على وظائف الميتوكوندريا وتنشيط

نشاط إنزيمات ATPase ، بوساطة ROS ، قد يُسبب انكماشًا خلويًا ثانويًا (Son et al., 2010). وهذا قد يُفسر التناقص الذي يحدث في الخلايا (Abbas et al 2015) .

اختلال وظائف الكلى إلى جانب التغيرات المرضية الكلوية وارتفاع ضغط الدم الجهازية النتيجة الأكثر شيوعًا والمحملة عند استخدام علاج السيكلوسبورين ، يمكن أن يؤدي هذا التأثير الضار إلى الفشل الكلوي المزمن وحتى الفشل الكلوي في مرحلته النهائية. طوال عملية التمثيل الغذائي المكثفة، يتم استقلاب السيكلوسبورين إلى مستقبلات متعددة بواسطة إنزيمات السيتوكروم بي-450 الكبدية وأوكسيداز مختلطة الوظائف. وهذا يؤدي إلى تفاعلات دوائية ذات صلة سريرية. الأدوية التي تثبط إنزيمات السيتوكروم بي-450 تزيد من تركيز السيكلوسبورين الأصلي وقد تسبب سمية كلوية وارتفاع ضغط الدم وآثار جانبية أخرى. وعلى العكس من ذلك، فإن الأدوية التي تحفز هذه الإنزيمات تقلل من تركيز السيكلوسبورين الأصلي وتؤدي إلى انخفاض في الأدوية المثبطة للمناعة للدواء غير المتغير ومع ذلك، يرتبط استخدام السيكلوسبورين بسمية كلوية كبيرة، ومن المحتمل جدًا أن تكون نتيجة لتأثيره السام على بطانة الأوعية الدموية، وهو موثق باستمرار في الحيوانات التجريبية والبشر. تتوفر الآن أدلة على أن كل جرعة فموية من السيكلوسبورين لدى متلقي زراعة الكلى تتبعها انخفاض مؤقت في تدفق البلازما الكلوية ومعدل الترشيح الكبيبي، نتيجةً لنوع من نقص التروية الكلوية الحاد القابل للعكس (Gruev et al., 2003). أدى علاج الفئران بالسيكلوسبورين إلى أكسدة الدهون في الطحال، كما يتضح من زيادة الناتج الثانوي لأكسدة الدهون MDA (Trull et al., 2002)

5.2. الإجهاد التأكسدي (Oxidative Stress(OS)

تُنتج أنواع الأوكسجين التفاعلية (Reactive Oxygen Species(ROS من خلال عمليات داخلية في الجسم وأخرى خارجية، ويتم التحكم في آثارها الضارة عادةً بواسطة مضادات الأكسدة، سواء الأنزيمية أو غير الأنزيمية. غير أن اختلال التوازن بين إنتاج هذه الأنواع وقدرة الجسم على معادلتها يؤدي إلى حدوث الإجهاد التأكسدي (Oxidative Stress(OS ، وهو عامل رئيسي في تطور العديد من الأمراض والاضطرابات، كما يُسهم في عملية الشيخوخة التي تتميز بالتدهور التدريجي في وظائف الأنسجة والأعضاء (Hajam et al., 2022). في حالة الإجهاد التأكسدي ، يحدث اختلال في التوازن بين إنتاج المواد المؤكسدة (مثل الجذور الحرة) وبين قدرة الجسم على التخلص منها أو تحييدها باستخدام مضادات الأكسدة. عندما يختل هذا التوازن لصالح المواد المؤكسدة، تتراكم هذه الجزيئات التفاعلية وتبدأ في إحداث أضرار على مستوى الحمض النووي (DNA) والبروتينات والدهون في الأغشية الخلوية و البروتينات وعند زيادة تراكيز المركبات مثل جذر (Superoxide

(O_2^- anion radical)، يعد من أولى أشكال الأوكسجين التفاعلي إنتاجاً في الخلية يتولد بشكل طبيعي أثناء عمليات التنفس الخلوي، خاصة في الميتوكوندريا. والذي يُعد من أكثر أنواع الأوكسجين التفاعلية سمية وخطورة. كما يشمل ذلك بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وجذر الهيدروكسيل (OH^-)، وهما أيضاً من المركبات ذات التأثيرات الضارة البالغة على المكونات الخلوية (Nimse and Pal, 2015). من خلال مهاجمة Superoxide الى سلاسل الاحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة بقوة ويؤكسدها بعملية اكسدة الدهون ومن ثم تحرير المانولديهايد (Valko et al., 2007). وهو سبب لنشوء العديد من الامراض كالسرطان والشيخوخة وامراض القلب فيحدث الاجهاد التأكسدي نتيجة لزيادة في الجذور الحرة او نقص في مضادات الاكسدة مما يؤدي الى تراكم الجذور الحرة فتفشل الاليات الدفاعية في ازاله الجذور الحرة ويزداد تركيزها داخل الجسم، والاجهاد التأكسدي المصحوب بتراكيز عالية من الجذور الحرة يؤدي الى ضرر في جميع مكونات الخلية خاصة الدهون والبروتينات والحامض النووي (Sabeti et al., 2016)

6.2. مضادات الأكسدة Antioxidant

مضادات الأكسدة هي جزيئات تمتلك القدرة على تقليل أو منع الأكسدة في الخلايا، من خلال تثبيط أو إيقاف سلسلة التفاعلات التأكسدية. وتقوم بدورها الحيوي في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي، وذلك عبر عدة آليات، منها: الارتباط بالجذور الحرة كمادة مخلّبة، تثبيط عمل إنزيمات الأكسدة، منح الإلكترونات للجذور الحرة فتأكسد نفسها، ما يؤدي إلى تعطيل فعالية تلك الجذور وتعد مضادات الأكسدة جزءاً من الأنظمة الحيوية الدفاعية في الجسم، حيث تعمل كـ "مكائن حيوية" (Scavengers) تقوم بإزالة أنواع الأوكسجين الفعّالة (ROS) وأنواع النيتروجين الفعّالة (RNS)، وذلك بهدف حماية الجسم من الأضرار التي قد تُحدثها الجذور الحرة بشكل غير مسيطر عليه (Ezez, et al., 2023) تصنف مضادات الأكسدة حسب طبيعتها الى نوعين هما (Malik et al., 2022)

1- مضادات الأكسدة الإنزيمية (Enzymatic Antioxidants): وهي إنزيمات يُنتجها الجسم تعمل على تحييد الجذور الحرة بطريقة منظمة (Flieger et al. 2021) من أبرزها:

أ- إنزيم السوبر أوكسيد ديسميوتاز (SOD): يحوّل جذور الأوكسجين الفائقة (Superoxide) إلى بيروكسيد الهيدروجين.

ب - إنزيم الكاتالاز (CAT): يحوّل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأوكسجين.

ج - إنزيم الكلوتاثيون بيروكسيداز (GPx): يزيل بيروكسيد الهيدروجين والبيروكسيدات العضوية باستخدام الكلوتاثيون كمرافق.

2 - مضادات الأكسدة غير الإنزيمية (Non-Enzymatic Antioxidants): وهي مركبات طبيعية أو مكتسبة لا تعتمد على الإنزيمات في عملها، وتشمل:

الفيتامينات المضادة للأكسدة: مثل فيتامين C (حمض الأسكوربيك)، وفيتامين E (توكوفيرول)، الكلوتاثيون (Glutathione) مضاد أكسدة داخلي قوي . البيتا كاروتين والمركبات الفينولية، توجد في الفواكه والخضروات (Gaurav et al., 2023).

7.2. الكبد : The liver

الكبد هو أكبر عضو داخلي في الجسم يقع بشكل أساسي في الربع العلوي الأيمن من البطن فوق المعدة مباشرة وينظم تراكيز معظم المواد الكيميائية في الدم ويفرز العصارة الصفراوية. (Newsome et al., 2019) الكبد عضو صلب يكون لونه بني محمر داكن ويتكون من فصين غير متساويين في الحجم والشكل ويكون وزن الكبد في الإنسان حوالي 1.5 كغم هنالك اختلاف كبير في حجمه بين الأفراد (Mantovani et al., 2020). الوحدة الوظيفية الأساسية للكبد هي فصيص الكبد الذي يكون سداسي الشكل تقريبا (Ishibashi et al., 2009). ويحتوي الكبد البشري على (50000– 100000) فص كبدي (Abou Seif, 2016). حيث يمثل الكبد 2-3% من وزن الجسم و25-30% من كمية الأوكسجين الذي يستهلكها الجسم. تعد وظيفة الكبد الطبيعية مهمة للحفاظ على التوازن الأيضي وهنالك علاقة معقدة بين الكبد والأنسجة الدهنية لتنظيم عملية التمثيل الغذائي للبروتينات والدهون والبروتينات (Williams et al., 2013 ; Diehl and Day , 2017). الكبد من الأعضاء المهمة في الجسم حيث يقع أسفل الحجاب الحاجز وينقسم إلى أربعة فصوص رئيسية الفص الأيمن والفص الأيسر والفص المذنب والفص المربع وبعد الفص الأيمن أكبر الفصوص يحتوي على حبال كبديه متصلة داخل الفص هذه الحبال مكونة من خلايا كبديه تقع حول الوريد المركزي (Yao et al., 2019). أيضا يحتوي على الجيبانيات الكبديه التي تقع بين الحبال الكبديه مبطنه من الداخل بالخلايا الطلائية والخلايا الدفاعية للكبد (Kupffer Cell) والياف شبكية ، حيث يلعب الكبد دورا رئيسيا في إزالة السموم وإفراز العديد من المركبات (Siwicki et al., 2021). تنقسم هذه الفصوص الأربعة بدورها إلى وحدات وظيفية تسمى الفصيصات وهي منتظمة حول الوريد المركزي وتتكون من الخلايا الكبديه وهي الخلايا الأساسية في الكبد يتدفق الدم إلى الكبد عبر الشريان الكبدي

والوريد البابي اللذان يحملان الدم المؤكسج ويتدفق الدم خارج الكبد عبر الوريد الكبدي ،الذي يصب في الوريد الرئيسي و يرسل الدم الى القلب (Zhang *et al.*, 2021) .

يحتوي الكبد على شبكة من القنوات الصفراوية التي تنقل الصفراء من الكبد الى المرارة والامعاء الدقيقة ، الصفراء هي سائل هضمي يساعد على تكسير الدهون وامتصاص الفيتامينات التي تذوب في الدهون (Ibraheem *et al.*, 2022). بالإضافة الى وظائفه الأيضية كذلك يلعب الكبد دورا حاسما في الجهاز المناعي تساعده خلايا Kupffer Cells هي نوع من الخلايا المناعية الموجودة في الكبد تعمل على ازاله البكتريا والمواد الضارة الأخرى من مجرى الدم (Naeem *et al.*, 2022). يلعب الكبد دورا مهما في العمليات الفسلجية مثل توازن السكر في الدم، وكذلك تصنيع الفيتامينات وتخزين الكلايوجين والاملاح وتنظيم تخثر الدم ويوفر الكبد أيضا المواد الأساسية المنتجة للطاقة وإنتاج العوامل المناعية (Eftekhari *et al.*, 2020).

8.2. الكلى Kidney

هي تركيب بيضوي يشبه حبه الفاصوليا وهو عضو حيوي مهم للحفاظ على حياة الانسان تقع على الجدار الخلفي للجهة البطنية خارج الجوف الجسمي على جانب العمود الفقري حيث تؤدي دورا رئيسيا في تنظيم مكونات وحجم السائل وبهذا تقوم الكلى في الحفاظ على توازن البنية الداخلية للجسم من خلال طرح بعض المواد في البول بكميات تلائم حالة الجسم (Hall, 2016). الوحدة الوظيفية للكلى هي الانابيب البولية والنيفرونات الكلوية (Thongboon *et al.*, 2017). يكون وزن الكلى حوالي 150 غراما ويبلغ حجمها حجم قبضة يد الانسان تقريبا (Webster *et al.*, 2017). تحصل الكليتان على كمية كبيرة من الدم الذي يضخ حوالي 20% عبر الشريان الابهر ، حيث تشكل 5% فقط من كتلة الجسم وكل كلية محاطة بكبسولة وهي كبسولة رقيقة وناعمة من النسيج الضام تعمل على حماية الكلية من المؤثرات الخارجية (Squire *et al.*, 2012). تحتوي الكلية الواحدة على اكثر من مليون نيفرون، ويعتبر النيفرون الوحدة الهيكلية والوظيفية للكلى. يحتوي كل نيفرون على مرشح يعرف باسم الكبيبة يسمح للسوائل والماء بالمرور الى الانابيب تبقى الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات وخلايا الدم في الأوعية الدموية يعرف الجزء الثاني من النيفرون ، والذي يشكل وحدة وظيفية مستقلة تعرف باسم النبيب الكلوي تكون وظيفته استخراج البول والسموم من بلازما الدم (Tortora and Derrickson, 2018) .

تقوم الكلى بالعديد من الوظائف الحيوية في الجسم من أهمها تنظيم الضغط الاوزموزي للسوائل الجسمية، تنظيم حجم السائل خارج الخلوي عن طريق السيطرة على طرح H_2O و Na^+ ، تساعد في تنظيم ضغط الدم من خلال طرح Na^+ وانتاج انزيم الرنين الذي يتحكم بمستوى ضغط الدم ، تنظيم توازن الالكترونوليتات تلعب دورا اساسيا في التوازن الحامضي القاعدي من خلال افراز H^- عندما يكون هنالك زيادة في الحامضية او اعادة امتصاص HCO_3^- عندما يكون هنالك زيادة في القاعدية ، وكلها تجعل الكلى ضرورية للتوازن الفسيولوجي نظراً لأدوارها العديدة في الجسم (Abbiss et al., 2019). النيفرون يتكون من العديد من الاجزاء تشمل الكبيبة ومحفظة بومان والنبيب الملتوي القريب وعروة هنلي والنبيبات الملتوية البعيدة والقناة الجامعة (Zhuo and Li 2013) وان الوحدة الوظيفية لترشيح الدم وتكوين البول هي الكبيبة، تتكون الكبيبة من ثلاثة انواع من الخلايا هي الخلايا البطانية والخلايا الكبيبة وخلايا mesangial cell يعتمد كل نوع من هذه الخلايا على الانواع الاخرى لضمان العمل الطبيعي للكبيبة ووظائفها (Ebefors et al., 2022). في حاله اصابه الكلى (تلف النيفرون) تتمتع الكلية في القدرة على الحفاظ على معدل الترشيح الكبيبي من خلال الترشيح المفرط للنيفرونات المتبقية غير المتضررة لفترة من الزمن ولكن اذا ستمر الضرر لفترة اطول يتم انسداد النيفرونات وبالتالي لا تتمكن النيفرونات من تصفيه الدم جيدا الذي يؤدي الى انخفاض وظائف الكلى وهذا يسمى بالفشل الكلوي الذي يؤثر على الجسم بشكل عام (Freethi et al., 2016).

9.2. التركيب النسيجي للخصية : Histological structure of testis

تحاط الخصية بثلاث طبقات نسيجية من الخارج إلى الداخل. الطبقة الأولى تُعرف بالغلالة العمدية (Tunica vaginalis)، وهي غشاء صفاقي (Peritoneum) يحيط بالخصية خلال مرحلة نشأتها. وعند إحاطته بالخصية، يُسمى بالغلالة الغمدية. أما الطبقة الثانية، فهي الغلالة البيضاء (Tunica albuginea)، وهي محفظة ليفية توفر دعماً للخصية، وتحتوي على شرايين وأوردة الخصية. يمتد من السطح الداخلي لهذه الغلالة حواجز تُسمى حويجزات الخصية (Testicular septa)، التي تلتقي في وسط الخصية مكونة منصف الخصية (Mediastinum testis)، وهي كتلة ليفية تحتوي على نبيبات دقيقة تسمى بالشبكة الخصوية (Treuting et al., 2018) تعمل حويجزات الخصية على تقسيم نسيج الخصية إلى العديد من الفصيصات (Lobules)، حيث يحتوي كل فصيص على أربعة نبيبات ناقلة للمني، وبين هذه النبيبات توجد مجموعة من الخلايا والألياف مثل خلايا الأرومات الليفية، وخلايا لايدك، والألياف الغروية والمرنة، بالإضافة إلى الأوعية الدموية والخلايا العضلية التي تحيط بالنبيبات الناقلة للمني. يُعرف هذا

النسيج بمسمى النسيج البيني (Interstitial tissue).
أما الطبقة الثالثة، فهي الغلالة الوعائية (Tunica vasculosa)، وتتكون من شبكة من الأوعية الدموية المتماسكة مع بعضها بواسطة نسيج ضام. تحاط الخصية من جميع أسطحها الأمامية والجانبية، باستثناء السطح الخلفي، بغشاء مصلي يُسمى الغلالة الغمدية (Tunica Vaginalis). تتكون هذه الغلالة من طبقتين: طبقة أحشائية داخلية (Inner Visceral Layer) وطبقة جدارية خارجية (Outer Parietal Layer). تحت هذه الغلالة، توجد محفظة من نسيج ضام كثيف تحتوي على بعض الألياف العضلية الملساء، وتُسمى الغلالة البيضاء (Tunica albuginea). تتخذ هذه الغلالة في السطح الخلفي للخصية، حيث تُشكل طبقة داخلية من نسيج ضام رخو غني بالأوعية الدموية، وهذه تُعرف بالغلالة الوعائية (Tunica Vasculosa). من الجزء الخلفي المنتخن للغلالة البيضاء تمتد حواجز ليفية داخل الخصية، تقسمها إلى حوالي 250-300 فصيص أو ردة هرمية الشكل، تُسمى القصيصات الخصوية (Testicular lobules)، يحتوي كل فصيص على 2 إلى 5 من النبيتات الملتوية بكثرة، والتي تُسمى النبيتات ناقلة المني (Seminiferous tubules). تمثل هذه الأنبيبات حوالي 70%-90% من وزن الخصية عند البالغين، وتعد المواقع الأساسية لتكوين الحيوانات المنوية (Schlegel and Katzovitz, 2020).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3. المواد والأجهزة المستعملة

1.1.3. المواد الكيميائية المستعملة

جدول (1-3) المواد الكيميائية المستعملة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ

ت	أسم المواد	الشركة المصنعة	المنشأ
1	أكسيد الزئبق الأحمر Mercuric Oxide	Fluka	Switzerland
2	إيثانول مطلق 99%	CARLO ERBA	France
3	حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic acid	BDH	England
4	حامض الخليك ثلاثي الكلور TCA	BDH	England
5	زايلين Xylene	Scharlau	Spain
6	شب البوتاسيوم والالمنيوم Aluminum-potassium Alum	BDH, Chem, ltd, pool	England
7	شمع البارافين Paraffin	Scharlau	Spain
8	صبغة الأيوسين Eosin	BDH, Chem, ltd, pool	England
9	صبغة الهيماتوكسولين Hemotoxyline	BDH, Chem, ltd, pool	England
10	عدة فحص الألبومين Albumin Kit	Biosystems	Spain
11	عدة فحص البروتين الكلي (Total protein)	Biobiosa	France
12	عدة فحص الكلوتاثيون (GSH Kit)	Solarbio	China
13	عدة فحص المالوندايالديهايد (MDA)	Solarbio	China
14	عدة قياس HDL و LDL	Abbott	USA
15	عدة قياس الكرياتينين (Creatinine Kit)	Biomerieux	France
16	عدة قياس اليوريا (Urea Kit)	Biomerieux	France
17	عدة قياس إنزيم الفوسفاتيز القلوي (ALP Kit)	Biomerieux	France
18	عدة قياس إنزيم ناقل أمين الاسبارتيت (AST Kit)	Randox	United Kingdom
19	عدة قياس إنزيم ناقل أمين الالانين (ALT Kit)	Randox	United Kingdom
20	عدة قياس سوبر أوكسيد الفائق (SOD)	Biomerieux	China
21	عدة قياس نشاط الكاتليز CAT Kit	Biomerieux	France

Turkey	MS pharma	عقار السيكلوسبورين	22
المملكة العربية السعودية	كيميائيات	فورمالين Formalin	23
England	BDH	كلوروفورم Chloroform	24
.....		ماء مقطر Disttled Water	25
India	Himedia Lab.	مادة (D.P.X)	26

2.1.3. الادوات المستعملة

الجدول (2-3): الادوات المستعملة تبعاً لاسم الشركة والمنشأ

ت	أسم الأداة	الشركة المصنعة	المنشأ
1	أداة تجريع	Oxford	USA
2	ادوات بلاستيكية مختلفه الاحجام	Nunclon	Denmark
3	أنابيب اختبار خالية من المادة المانعة للتخثر	Gold star	Jordan
4	جار تصبغ زجاجي	Harshman	Germany
5	حامل شرائح	Harshman	Germany
6	شاش طبي	Kardelen Hidrophile	Turkey
7	شرائح زجاجية واغطيها	MHEC	China
8	عدة تشريح	S.I.E.	Pakistane
9	قطن طبي	Papatya	Turkey
10	ماصة	SLamed	Germany
11	محاقن طبية	Medical ject-	S.A.R.
12	ورق ترشيح	Zelpa	Belgium

3.1.3. الاجهزة المستعملة

جدول (3-3): الاجهزة المستعملة تبعا لاسم الشركة والمنشأ

ت	أسم الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	ثلاجة Refrigerator	Concord	France
2	جهاز GC-Mass	Agilent Tecchnologies	Germany
3	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Bio Rad	USA
4	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hermile Lab	Germany
5	جهاز اليزا ELIZA system	Bio-tech instruments	U.S.A.
6	حمام مائي water bath	Chicago Surgical & Electrical	USA
7	صفحة الساخنة warming plat	Lassco	India
8	طاحونه كهربائية Grinder	AL-Araby	Egbt
9	فرن كهربائي	Xmta	Germany
10	كاميرا	Canon	Japan
11	مجهر ضوئي Light Microscope	Human scop	Germany
12	المشراح اليدوي الدوار	Histo-Line Lab.	Italy
13	المطياف الضوئي	Biotech	England
14	ميزان الكتروني	Sartorius	Germany
15	ميزان حساس	Sartrius	Germany

2.3. طرائق العمل Methods

1.2.3. حيوانات التجربة Experimental animals

استخدمت في هذه الدراسة 48 من ذكور الجرذان البيض البالغة تراوحت أوزانها بين (230-250) غراماً وأعمارها بين (12-14) أسبوعاً، تم الحصول عليها من حقول تربية خاصة في محافظة بغداد، تم تربيتها في البيت الحيواني التابع لكلية الصيدلة/ جامعته كربلاء، وضعت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية خاصة أبعادها (25×40×30) سم للعرض والطول والارتفاع على التوالي مغطاة بأغطية معدنية، وبظروف مختبرية ملائمة من حيث درجة حرارة ومدة الإضاءة (12 ساعة ضوء-12 ساعة ظلام) والتهوية الجيدة، فرشت أرضيتها بنشارة الخشب الناعمة وتمت العناية بنظافة الأقفاص وتبديل الأرضية باستمرار وتعقيمها بالمطهرات، وكذلك العناية المستمرة بنظافة قناني الإرواء وغرفة

الإيواء ، وزودت الحيوانات بالماء والعليقة القياسية *Ad libitum* بصورة حرة طيلة مدة التربية تركت الحيوانات لمدة أسبوعين قبل بدء التجربة للتأقلم والتأكد من خلوها من الأمراض .

2.2.3. جمع النبات المستعمل

تم استيراد ثمار نبات توت العليق من الجمهورية الإسلامية الإيرانية من محافظة اصفهان وتم تصنيفها في قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة من قبل أ.د. نيبال مطير طراد اختصاص تصنيف نبات.

3.2.3. تحضير المستخلص المائي لثمار نبات توت العليق

تم غسل الفاكهة جيداً تحت الماء الجاري لإزالة الأتربة، وجميع أنواع الملوثات، ثم تم فرشها على سطح نظيف في درجة حرارة الغرفة (حوالي 35 درجة مئوية) لتجف تماماً. بعد ذلك، جُمعت الفاكهة وجُففت وطُحنت باستخدام الطاحونة. تم أخذ 5 غرامات من مسحوق الفاكهة المطحونة وإضافتها إلى 200 مل من الماء المقطر في أوانٍ زجاجية نظيفة، وترك الخليط لمدة يومين مع التحريك المستمر بين الحين والآخر لضمان الاستخلاص الكامل للمكونات الفعالة. بعد انتهاء فترة النقع، تم ترشيح المستخلص باستخدام عدة طبقات من الشاش، ثم باستخدام ورق ترشيح للحصول على محلول صافٍ بعد ذلك، صُبَّ المستخلص في أوانٍ زجاجية معقمة، ووضِع في فرن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية حتى جفَّ تماماً. جُمع المستخلص الخام الناتج، وتم كشطه وحفظه في أوانٍ زجاجية معقمة، معقمة، ونظيفة، ثم وُضع في الثلاجة لحين استخدامه لاحقاً في التجربة ، وأُعتمد بهذا التحضير على طريقة (Abubakar and Haque, 2020).



صورة (1-3): فاكهة نبات التوت صورة (2-3): المستخلص المائي لفاكهة نبات توت العليق

4.2.3. حساب جرعة عقار السيكلوسبورين

تم الحصول على عقار السيكلوسبورين من الصيدليات على شكل (محلول) بتركيز (100 mg/ml) وهي الجرعة المستعملة في الانسان ، وتم تحضير الجرعة الدوائية المستعملة في التجربة بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم حيث تم إعطاء الجرعة بين يوم وآخر بشكل فموي لمدة 30 يوم (Chighizola et al.,2017).

5.2.3. تصميم التجربة Experience Design

التجربة الأولى: اختبار الجرعة المؤثر للمستخلص المائي لنبات توت العليق

تضمنت تحديد تركيز المستخلص المائي لنبات توت العليق الأكثر فعالية من بين ثلاث تراكيز تصاعدية (200, 300, 400 ملغم/كغم) إذ تم اختبار دورها الوقائي ضد الاجهاد التأكسدي الناجم عن المعاملة بعقار السيكلوسبورين لمدة 30 يوماً , واستخدم (24) من ذكور الجرذان البيض وقسمت بشكل منتظم على أربع مجاميع بواقع (6) حيوانات لكل مجموعة .

1- مجموعة السيطرة: مجموعة السيطرة السالبة ماء اعتيادي.

2- مجموعة الوقاية الأولى : حيوانات هذه المجموعة جرعت فموياً بالمستخلص المائي لنبات توت العليق بتركيز (200 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2 ملغم/كغم) من وزن الجسم.

3- مجموعة الوقاية الثانية: حيوانات هذه المجموعة جرعت فموياً بالمستخلص المائي لنبات توت العليق بتركيز (300 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2 ملغم/كغم) من وزن الجسم.

4- مجموعة الوقاية الثالثة: حيوانات هذه المجموعة جرعت فموياً بالمستخلص المائي لنبات توت العليق بتركيز (400 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2 ملغم/كغم) من وزن الجسم.

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

التجربة الثانية :

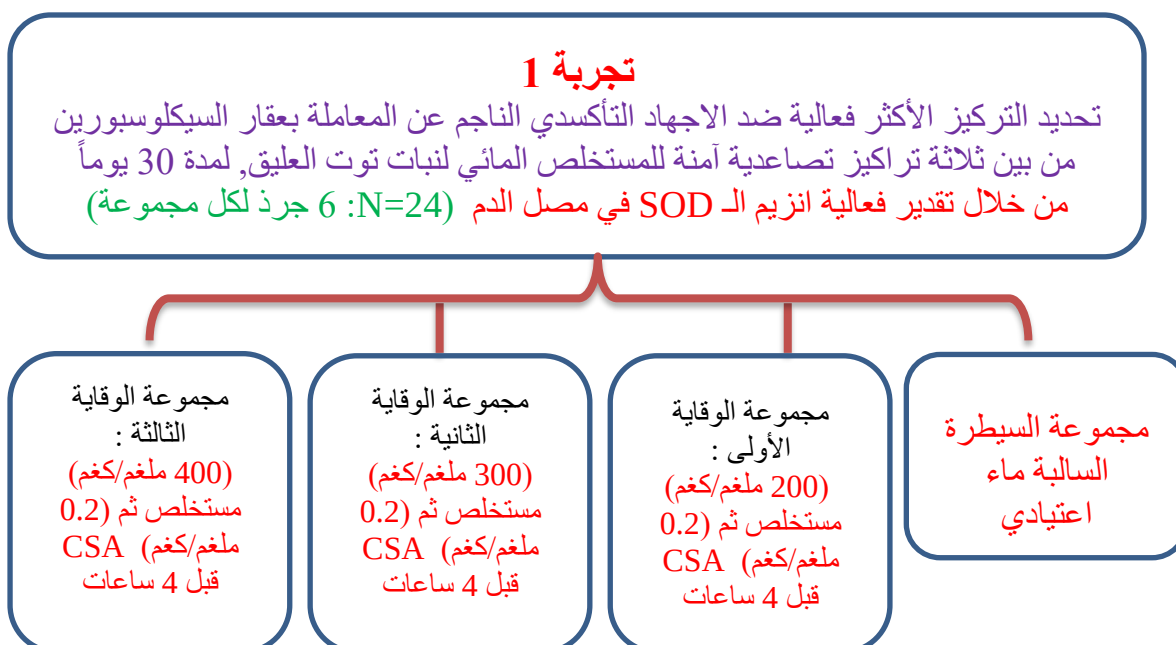
بناءً على نتائج التجربة الأولى تم اعتماد التركيز 400 ملغم/كغم من المستخلص المائي لنبات توت العليق لتقييم فعاليته ضد السمية التكاثرية الناجمة عن المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز 0.2 ملغم/كغم من وزن الجسم. استخدم في هذه التجربة 24 من ذكور الجرذان البيض حيث قسمت بشكل منتظم إلى أربعة مجاميع وبواقع ستة من الجرذان لكل مجموعة . وعلى النحو التالي:

مجموعة السيطرة السالبة (G1): حيوانات هذه المجموعة جرعت فمويًا بمحلول الماء الاعتيادي ولمدة (30) يوم

مجموعة السيطرة الموجبة (G2): حيوانات هذه المجموعة جرعت بين (يوم و اخر) بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم ولمدة (30) يوماً

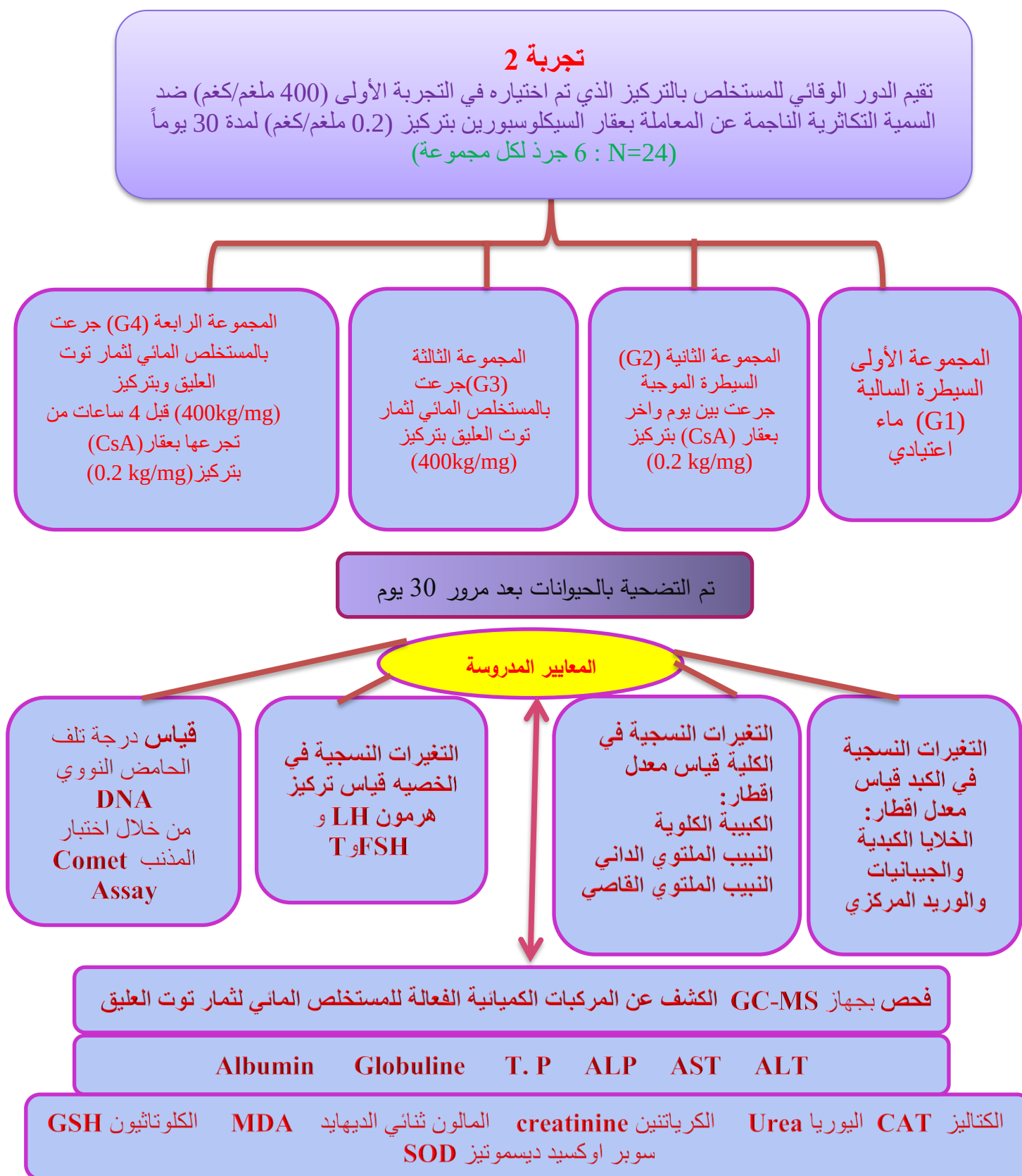
مجموعة الثالثة (G3): حيوانات هذه المجموعة جرعت يومياً بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم ولمدة (30) يوماً.

مجموعة الرابعة (G4): حيوانات هذه المجموعة جرعت يومياً بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق وبتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم قبل 4 ساعات من تجريعها فمويًا بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2 ملغم/كغم) بين يوم و اخر لمدة 30 يوم.



شكل (3-1A) مخطط تصميم التجربة الأولى

مخطط تصميم التجربة الثانية



شكل (B1-3) مخطط تصميم التجربة الثانية

6.2.3. جمع عينات الدم Blood sample collection

خدرت الحيوانات باستعمال قطعة من القطن حاوية على كمية من الكلوروفورم وضعت في علبة شفافة محكمة الغلق ثم حمل الحيوان ووضع بسرعة داخلها واعد احكام الغطاء وبعد التأكد من تخديره تم إخراجها وسحب الدم من القلب مباشرة عن طريق طعنة القلب Puncture Heart باستعمال محقنة طبية معقمة نبيذة سعة 5 مل للحصول على اكبر كمية من الدم ووضع عينات الدم مباشرة في انابيب اختبار معقمة خالية من المادة المانعة للتخثر Gel tubes ثم نقلت الأنابيب الى جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 300 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة لغرض الحصول على المصل والذي ينقل الى انابيب بلاستيكية صغيرة Eppendorf tubes نظيفة وجافة معلمة ويتم حفظ الامصال في الثلاجة Refrigerator بدرجة حرارة منخفضة - 20 درجة مئوية لحين اجراء الفحوصات الكيموحيوية عليها والتي تشمل معايير وظائف الكبد (Alkaline phosphatase (ALP), Alanine transaminase (ALT) and Aspartate transaminase (AST) وبعض المعايير الوظيفية للكلية (Urea, Creatinine), وبعض معايير الدم (Albumin, Glubulin , Total protein) قياس تركيز المألون ثنائي الديهايد (MDA) Malondialdehyde قياس تركيز الكلوتاثيون (GSH) Glutathione وانزيم السوبراوكسيد ديسموتيز (SOD) dismutase Superoxide . الكاتليز (CAT) Catalase Activity Estimation ودراسة التغيرات في مستوى هرمونات الخصى والتي تشمل هرمون الشحوم الخصوي (T) testosterone وهرمون اللوتيني luteinizing (LH) وهرمون المحفز للجريبات (FSH) follicle-stimulating hormone في مصل الدم وتم أيضا دراسة درجة تلف ال DNA باستخدام اختبار Comet assay (اختبار المذنب).

7.2.3. جمع عينات الأنسجة Collection of tissue samples

بعد سحب الدم من ذكور الجرذان شُرحت الحيوانات مباشرة عن طريق شق التجويف البطني من الأسفل باتجاه القلب وتم استئصال الكبد والكلية والخصى بعد ازالة الانسجة الدهنية الرابطة المحيطة به، ثم غسل بالماء لإزالة الدم الموجود عليه، وبعدها نُشف بوضعه على ورق النشاف ثم حفظت الاعضاء في الفورمالين بتركيز 10% في عبوات بلاستيكية نظيفة محكمة الغلق ومعلمة، لمدة 48 ساعة لحين إجراء التقطيع النسجي عليها.

8.2. 3. فصل وتشخيص المركبات الكيميائية بتقنية GC-MS

باستعمال جهاز كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS) تم فصل وتشخيص المركبات الفعالة من مستخلص ثمار نبات توت العليق.

اذ خلل المستخلص الايثانولي لثمار نبات التوت العليق بواسطة جهاز GC-MS اذ يرتبط جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC بجهاز مطياف الكتلة MS الموضح في صورة (2-3) ووفقا للظروف الآتية :

1. عمود الفصل الشعري column نوع HP-5ms Ultra L inert والذي سجل ابعاده (الطول 30 متر * القطر الداخلي 250 مايكرومتر ، السمك 0.25 مايكرومتر.
 2. استعمل غاز الهيليوم بنقاوة (99.99%) كحامل للمواد الفعالة.
 3. حقن الجهاز بما يقارب 1 مايكرو لتر من المستخلص.
 4. تم ضبط درجة حرارة الحاقن الى 250 درجة مئوية .
 5. تم برمجة درجة حرارة الفرن على 80 درجة مئوية بعد ذلك ترفع الحرارة بمعدل يصل الى 10 درجة مئوية لكل دقيقة الى أن تصل الى 180 درجة مئوية خلال 10 دقائق في المنحدر الأول ، ثم ترفع بمعدل يصل الى 10 درجة مئوية لكل دقيقة ولمدة 10 دقائق حتى تصل الى 280 درجة مئوية في المنحدر الثاني، بعدها ترفع بمعدل 5 درجة مئوية لكل دقيقة لتصل الى 300 درجة مئوية في المنحدر الثالث .
 6. نفذ طيف الكتلة بفولتية 70 بفواصل زمني للفحص مقداره 0.5 ثانية وبمعدل انشطار من 40 الى 450 دالتون.
 7. الضغط داخل الجهاز: 0.823 بار .
 8. اجمالي الوقت المستخدم لتحليل العينة هو 32 دقيقة.
- استعمل برنامج TurboMass بنسخته 5.2.0 المثبت على الجهاز لحساب ناتج الطيف الكتلي لكل مركب كمقدار نسبي لمتوسط مساحة قمته Peak Area على اجمالي المساحات Total area وكل هذه المعلومات تبرمج بشكل مباشر على الجهاز للعينة النباتية قيد الدراسة.



صورة (3-3) جهاز كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة
Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS)

3.3. الدراسة النسجية Histological Study

حفظت العينات بعد استئصالها من جسم الحيوان في محلول الفورمالين بتركيز 10% وبعد 48 ساعة استخرجت من محلول الفورمالين ووضعت على ورق ترشيح ومن ثم غسلت عدة مرات بالماء وبعدها أجريت عليها سلسلة من العمليات وحسب الطريقة الموصوفة في (Suvana et al., 2013).

1.3.3 الانكاز Dehydration

مررت العينات بسلسلة تراكيز تصاعدية من الكحول الايثيلي بدءاً بتركيز (70 % و 80% و 90% و 100% و 100%) ولمدة ساعتين لكل تركيز لغرض سحب الماء الموجود داخل النسيج بصورة تدريجية .

2.3.3 الترويق Clearing

روقت العينات بمحلول الزايلين Xylene لمدة (5-7) دقائق لجعل العينات أكثر شفافية وإزالة محلول الانكاز .

3. 3.3 التشريب Infiltration

نقلت النماذج بعد ترويقها الى خليط من الزايلين وشمع البرافين Paraffin wax المنصهر (ذي درجة انصهار 59-60 °م) والمرشح بنسبة 1:1 لمدة ساعة داخل فرن كهربائي بدرجة حرارة 60 °م وذلك لغرض بقاء الشمع منصهرا وكذلك لضمان عملية التشريب ثم بعد ذلك نقلت الى قناني حاوية على شمع البرافين لمدة ساعتين ثم الى قناني أخرى حاوية على شمع البرافين أيضا ولمدة ساعتين.

4.3.3. الطمر Embedding

تم عمل قوالب من شمع حاوية على النماذج وذلك من خلال صب الشمع في قوالب بلاستيكية خاصة طمرت فيها النماذج وتركزت لتتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم فصلت عن القالب وحفظت حتى وقت تقطيعها.

5. 3.3. التقطيع Sectioning

تم استعمال جهاز المشراح اليدوي الدوار Rotary Microtome لتقطيع النماذج والحصول على أشرطة بسماك 5µm ، ثم حملت أشرطة المقاطع على شرائح زجاجية Slides نظيفة بعد أن وضعت في حمام مائي درجة حرارته 45 م° لمدة دقيقة الى دقيقتين لضمان فرش المقاطع وتركزت بعدها على صفيحة ساخنة Hot Plate لتجف بدرجة حرارة 37 م°.

6.3.3. التصبين والتحميل Staining and Mounting

صبغت جميع المقاطع النسجية باستخدام ملون Haematoxylin- Eosin stain إذ وضعت الشرائح في الزايلين لمدة خمس دقائق للتخلص من الشمع ثم مررت بسلسلة تراكيز تنازلية من الكحول الايثيلي (100%، 100، 90%، 80%، 70%) لمدة 5 دقائق لكل تركيز بعدها صبغت الشرائح بملون الهيماتوكسيلين لمدة 4 دقائق وبعدها غسلت بالماء الجاري لمدة 10 دقائق ثم بالكحول الحامضي مرتين الى ثلاث مرات لازالة الصبغة الزائدة وبعدها صبغت بملون الايوسين لمدة 6 دقائق ونقلت بعدها الى الماء المقطر لمدة دقيقة ثم الى سلسلة تصاعدية من الكحول الايثيلي (70%، 80%، 90%)، 100%، 100% ولمدة دقيقتين في كل تركيز ماعدا التركيز الأخير وضعت فيه لمدة خمس دقائق ثم روقت بالزايلين لمرحلتين في كل مرحلة لمدة 10 دقائق بعدها أجريت عليها عملية التحميل باستعمال مادة Dibutylphthalate Polystyrene Xylene (DPX) لتثبيت غطاء الشريحة ثم تركت على صفيحة ساخنة لتجف لمدة 24 ساعة لتكون جاهزة للفحص.

7. 3.3. التصوير المجهرى Microphotography

تم تصوير المقاطع النسجية باستعمال المجهر الضوئي من النوع Olympus light microscope مزود بكامرة رقمية Digital Camera عالية الدقة نوع Olympus.

4.3. القياسات النسجية Histological morphomtry

سجلت القياسات النسجية للشرائح المحضرة من نسيج الكبد والكلى والخصى بواسطة المقياس العيني المتري الدقيق (Ocular micrometer (OM) تحت قوة 20X (Galigher and Kozloff, 1964) المثبت في المجهر الضوئي . بعد معايرة الـ Ocular على Micrometer stage لكل قوة تكبير تم قياس

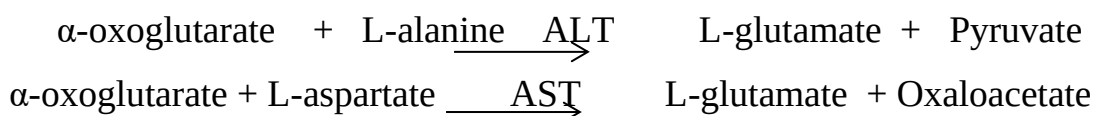
معدل اقطار الخلايا الكبدية والوريد المركزي والجيبانيات والكبيبة الكلوية والنبيب الملتوي الداني والنبيب الملتوي القاصي.

5.3. قياس بعض المعايير الكيموحيوية

1.5.3. قياس فعالية الانزيمات الناقلة لمجموعة الامين Alanine transaminase(ALT) &

Aspartate transaminase(AST)

تم قياس مستوى فعالية إنزيمي ALT, AST في دم الجرذان باستخدام عدة تقدير جاهزة Kit بأستخدام جهاز Spectrophotometer وعلى أساس التفاعلين الآتيين :



إذ يعتمد تقدير فعالية الانزيم ALT على البايروفيت المتحرر من التفاعل المحفز بواسطة تفاعل الإنزيم مع ثنائي فنيال الهيدرازين. وكذلك تم تقدير فعالية الانزيم AST من الاوكز الواسيتيت المتحرر من التفاعل المحفز بواسطة الإنزيم مع ثنائي فنيال الهيدرازين (Bergmeyer and Rej, 1985) , وأجريت التجربة و كما يأتي (جميع الحجوم محسوبة بالمليتر).

جدول (4-3) قياس مستوى فعالية إنزيمي ALT, AST

Blank المحلول الكفاء	Sample العينة	Solutions المحاليل
----- 0.5 ml	0.1 ml 0.5 ml	العينة محلول الفوسفات الدارئ
مزجت محتويات الأنابيب جيدا وحضنت لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 °م		
0.5 ml	0.5 ml	محلول ثنائي فنيال الهيدرازين العينة
مزجت محتويات الأنابيب وحضنت لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 20-25 °م		
5.0 ml	5.0 ml	محلول هيدروكسيد الصوديوم

بعد مزج محتويات الأنابيب جيدا تترك لمدة خمس دقائق في درجة حرارة الغرفة , وبعدها يتم قياس الامتصاص لها عند طول موجي 546 نانومتر.

واستعملت المحاليل في التجربة وتشمل :

1- محلول الفوسفات الدارئ

A- لإنزيم ALT ويتكون من الانين (200mM) والفاكيتوكلوتاريت (2.0 mM) المذابين في محلول الفوسفات الدارئ (pH 7.4).

B- لإنزيم AST ويتكون من حامض الاسبارتيك (100 mM) والفاكيتوكلو تاريت (2.0 mM) المذابين في محلول الفوسفات الداري (pH 7.4).

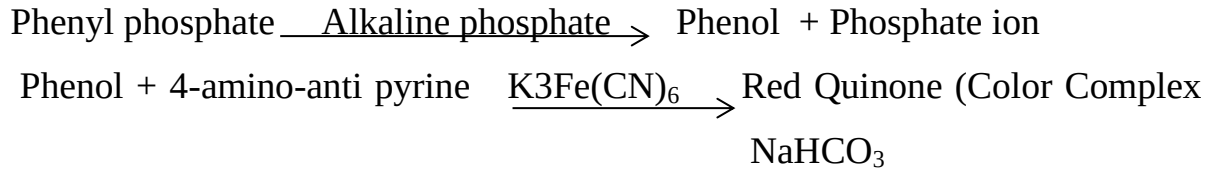
2- محلول 4.2 ثنائي نايترو فنييل هايدرازين (2.0 mM).

3- محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.4 N): خفف هذا المحلول عشر مرات بواسطة الماء المقطر قبل استعماله.

4- محلول البايروفيت القياسي (2.0 mM) .

2.5.3. قياس فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase ALP

تم تقدير مستوى فعالية إنزيم ALP باستعمال طريقة انزيمية وذلك اعتمادا على طريقة (Belfield and Golderg, 1971) استخدام جهاز Spectrophotometer وهي طريقة لونية تستند على استعمال المادة الأساس Substrate التي يعمل عليها إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase إذ يضاف محلول Phenyl phosphate للمادة الأساس إلى المصل ويحضر التفاعل لمدة ربع ساعة في درجة حرارة 37 م° فيقوم الإنزيم بتحويل المادة الأساس إلى الفينول الذي يمكن الكشف عنه وتقديره كميًا ذلك بإضافة المحلول 4-amino-anti pyrine والذي يكون معقدًا أحمر اللون يعرف بالكينون وهو ذو شدة تتناسب طرديا مع فعالية الإنزيم في المصل ويمكن قراءة الامتصاصية لمركب الكينون عند طول موجي قدره 510 نانوميتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي . ويمكن توضيح التفاعل بالمعادلات الآتية :



تم وضع (2 مليلتر) من المحلول المنظم كاربونات – بيكاربونات الصوديوم بتركيز 1-50 mmol/L وبدالة قاعدية 10 المحتوى على المادة الأساس فوسفات الفينيل الثنائية الصوديوم 5 mmol/L في أنبوبة اختبار في حمام مائي بدرجة حرارة 37 درجة مئوية مدة 5 دقائق بعد ذلك يضاف إليها 50 مايكرو لتر من مصل الدم ثم تمزج وتترك في حمام مائي مدة 15 دقيقة. بعدها يضاف 0.5 مليلتر من كاشف 4-amino-anti pyrine . 6 mmol/L وصوديوم ارسينيت 70 g/l ويمزجان جيدا, أما بالنسبة للمحلول الكافي يضاف 50 مايكرو لتر من الماء المقطر بدل المصل ثم توضع الأنابيب جميعها في مكان مظلم ولمدة 10 دقائق إذ يتكون لون وردي يميل إلى الاحمرار ذو شدة تتناسب طرديا مع تركيز الإنزيم في الدم. تقاس شدة اللون الوردي عند طول موجي 510 نانوميتر مقابل محلول الكافي ومحلول قياس 500 µl من المحلول القياسي.

تم حساب فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في العينة وفق القانون الآتي :

$$\text{Activity of enzyme} = \frac{\text{oD Serum sampl} - \text{oDserm blank}}{\text{oD standard}} \times \text{Xn(UL)}$$

3.5.3. تقدير مستوى البروتين الكلي Total protein في الدم

قدر مستوى البروتين الكلي في مصل الدم بالطريقة اللونية وفقا لطريقة البايوريت Biuret Method, والتي أشار إليها (Friedman and Young, 2001). إذ تعتمد هذه الطريقة على تفاعل أيون النحاس. الموجودة ضمن تركيب كاشف البايوريت (وهو محلول قاعدي) مع ببتيدات البروتين (الأواصر الببتيدية للحوامض الامينية) الموجودة في البروتين, في وسط قاعدي وتكوين معقد بنفسجي – أزرق اللون .

جدول (3-5) تقدير مستوى البروتين الكلي

	Blank	Sample
R(μL)	1.0	1.0
Standard(μL)	---	---
Sample (μL)	---	25

مزجت محتويات الأنابيب جيدا وحضنت لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 37 درجة مئوية أو 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة. (25) درجة مئوية.

وتم قراءة الامتصاصية للنماذج. (وهي للعينة والمحلول القياسي). بوساطة جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي قدرة 540 نانوميتر , ويقاس تركيز البروتين الكلي وفقا للمعادلة الآتية :

$$\text{Total Protein Conc} = \frac{(A)_{\text{Sample}}}{(A)_{\text{Standard}}} \times 7 \text{ (Standard Conc.)}$$

4.5.3. قياس مستوى الألبومين Albumin في المصل

يقاس مستوى الألبومين في مصل الدم بالطريقة اللونية واعتمادا على قابلية الألبومين على الارتباط مع صبغة Bromocresol Green (BCG). إذ يتغير اللون من الاصفر المخضر إلى الأزرق المخضر (Young and Friedman, 2001).

جدول (3-6) قياس مستوى الألبومين Albumin

	Blank	Standard	Sample
R(μL)	1.0	1.0	1.0
Standard(μL)	---	5	---
Sample (μL)	---	---	5

مزجت محتويات الأنابيب جيدا وحضنت لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة (15-25) درجة مئوية

الحسابات Calculations

تم قراءة الامتصاصية للنماذج (وهي للعينه والمحلول القياسي) بوساطة جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي قدرة (630) نانوميتر, وقيس تركيز الألبومين في مصل الدم حسب المعادلة الآتية :

$$\text{Albumin ConC. (g/dl)} = \frac{(A)_{\text{Sample}}}{(A)_{\text{Standard}}} \times 5 \text{ (Standard Conc)}$$

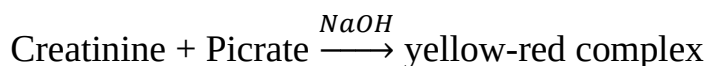
5.5.3. قياس مستوى الكلوبوليون Globulin في مصل الدم

قيس مستوى الكلوبوليون في مصل الدم بطريقة غير مباشرة وذلك بعد قياس مستوى الألبومين في المصل بعدها يطرح الناتج من ناتج قياس البروتين الكلي وحسب المعادلة الآتية :

$$\text{Globulin Concentration (g/dl)} = \text{Total protein} - \text{albumin} \quad (\text{Tietz, 1986})$$

6.5.3. قياس مستوى الكرياتينين Creatinine في مصل الدم:

تم تقييم مستوى الكرياتينين الموجود في المصل من خلال استعمال عدة اختبار تشخيصية جاهزة (Wopara et al., 2018). تم تقييم مستوى الكرياتينين في المصل بطريقة كمية وذلك بتكوين مركب معقد اصفر برتقالي ناتج عن تفاعل الكرياتينين في المصل مع Picric acid في وسط قاعدي, وهذا المركب المعقد هو بكرات الكرياتينين picrate Creatinine ومن الممكن قراءة شدة اللون الناتجة عن طريق استعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer .



جدول (3-7) كواشف قياس مستوى الكرياتينين Creatinine في مصل الدم

6.4 ملي مول/لتر	Sodium hydroxide	الكاشف الاول Base
150 ملي مول /لتر	Copper II sulfate	
0.75 ملي مول/ لتر	Soduim dodecyl sulfate	الكاشف الثاني Dye
4.0 ملي مول / لتر	Picric acid PH 4.0	
177 ملي مول/ لتر		كاشف الثالث standard

جدول (3-8) قياس مستوى الكرياتينين Creatinine في مصل الدم

المحتويات	انبوبة الكفاء Blank	الانبوبة القياسية Standard	انبوبة العينة Assay
الكواشف R1+R2	1 مل	1 مل	1 مل
ماء مقطر	10 مايكروليتر		
المحلول القياسي		10 مايكروليتر	
العينة			10 مايكروليتر

1 -خلطت الانابيب بشكل تام.

2-وبعد مرور نصف دقيقة تم تدوين الامتصاصية الأولى عند الطول الموجي 490 نانوميتر و التي تم مقارنتها مع انبوبة الكفاء او الماء المقطر .

3-تم تسجيل القراءة الثانية مباشرة بعد مرور دقيقتين من تسجيل القراءة الاولى .

و تم حساب مستوى الكرياتينين وفقا للمعادلة التالية: -

$$\text{مستوى الكرياتينين (ملغم/ديسيلتر)} = \frac{\text{امتصاصية}}{\text{Standard}} \times 2$$

7.5.3. قياس مستوى اليوريا Urea في مصل الدم.

تم تقدير مستوى اليوريا في المصل عن طريق استعمال العدة التشخيصية الجاهزة Kit وكما جاء في (Wopara et al., 2018).

تم تقييم مستوى اليوريا عن طريق الاعتماد على انزيم اليوريز Urease و الذي يعمل على تحليل اليوريا وأنتاج ايونات الامونيوم في الوسط القاعدي ، تتفاعل ايونات الامونيوم الناتجة مع الساليسيلات Salicylate والهايوكلورايت Hypochlorite لتكوين الاندوفينول الاخضر 2,2Dicarboxylindophenol ، وهذا التفاعل يحفز بنتروبروسيد الصوديوم Sodium nitroprusside.



وان كثافة اللون تتناسب مع مستوى اليوريا في العينة ، واحتمال وجود المعادن الثقيلة قد تشدب من تكوين الاندوفينول وبلغى هذا التشديد ثنائي أمين ايثيلين رباعي حامض الاسيتيك (Ethylene diamine tetra acetic acid) وتم قياس الامتصاصية عند الطول الموجي 580 نانوميتر.

جدول (3-9) الكواشف قياس مستوى اليوريا Urea في مصل الدم.

R1	Urea (0.5غم/لتر)	8.33 ملي مول / لتر
Enzymes R2	Urease	20 وحدة لتر
R3 Color reagent	PH 8 Phosphate buffer	50 ملي مول / لتر
	Sodium salicylate	62 ملي مول / لتر
	Sodium nitroprusside	3.35 ملي مول لتر
	EDTA	1 ملي مول / لتر
R4 Alkaline reagent	Sodium hydroxide (NaOH)	0.5 مول / لتر
	Sodium hypochlorite (NaClO)	24.8 ملغرام / ديسلتر

جدول (3-10) : قياس مستوى اليوريا Urea في مصل الدم.

المحتويات	انبوب الكفاء	الانبوبة القياسية	انبوبة العينة
المحلول القياسي		10 مايكروليتر	
لعينة Sample			10 مايكروليتر
محلول العمل	1 مل	1 مل	1 مل

وضعت الانابيب في الحاضنة مدة دقيقتين تحت درجة حرارة (20-25) م بعد الانتهاء من مزجها بصورة جيدة			
الكاشف الرابع	مايكروليتر 200	مايكروليتر 200	مايكروليتر 200
بعد اكمال مزج الانابيب نُقلت الى الحاضنة لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارية (20 - 25) م			

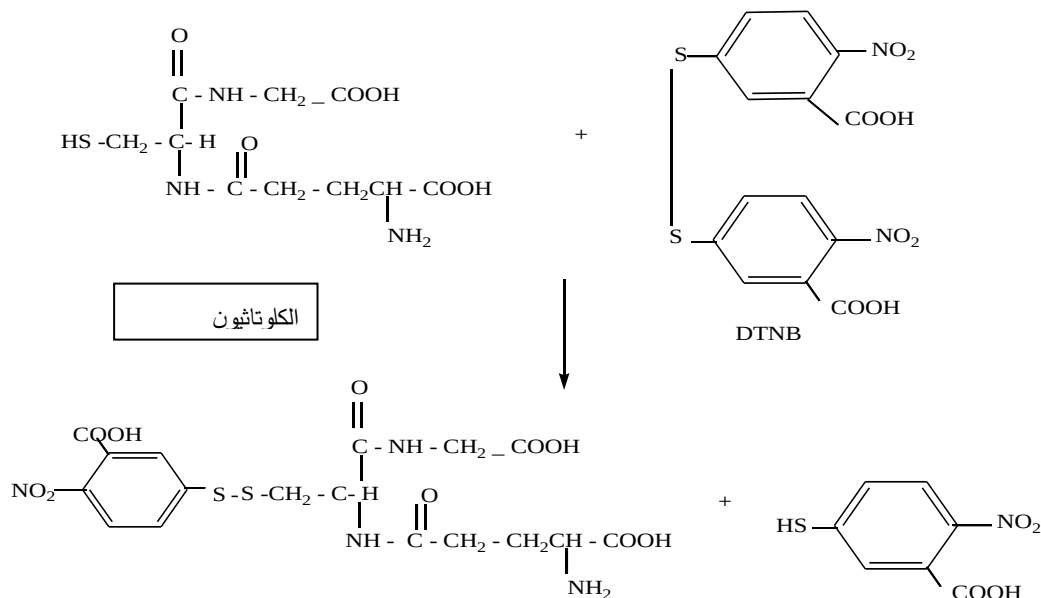
وتم حساب مستوى اليوريا حسب المعادلة التالية :

$$\text{مستوى اليوريا ملغم / ديسيلتر} = \frac{\text{امتصاصية العينة} \times \text{تركيز المحلول القياسي}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي}}$$

8.5.3. قياس مستوى الكلوتاثيون (GSH) في المصل

يعتمد أكثر من نوع واحد من الطرق التحليلية المستخدمة في تحديد الجلوتاثيون (GSH) في المصل على عمل مجموعات السلفيدريل. وبالتالي تشمل الأساليب الضوئية ، الأنزيمية ، الفلوريتيري HPLC و flourometric

مبدأ عمل الكشف يعتمد على كاشف المانز - (Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) عبارة عن مركب يمكن اختزاله بسهولة بواسطة مركبات GSH لإنتاج مركب أصفر شديد الكثافة اللونية. والذي يمتلك امتصاص أعظم عند 412 نانومتر ويتناسب طردياً مع تركيز GSH (Owens and Belcher, 1965) كما في الشكل (3-4).



شكل (3-2) يوضح التفاعل بين الكلو تاشيون والـ DTNB (Eyer and Podhradský, 1986)

اعداد الكاشف Reagents Preparation

1. محلول الترسيب: حامض ثلاثي كلورو أسيتيك 50 (TCA) % (50 غم من حامض الخليك ثلاثي الكلورايد المذاب في حجم نهائي 100 مل من الماء المقطر DDW).
- يتم إذابة إيثيلين دي أمين رباعي حمض الخليك- ثنائي الصوديوم (EDTA-Na₂) - Ethylene di amine tetra acetic acid- di sodium (0.4 M) 148.9 غم من EDTA في حجم نهائي 1 لتر من الماء المقطر DDW.

- تحضير بفر. Tris-EDTA buffer (0.4) (pH = 8) اذيب 48.458 غم من تريس في 800 مل من الماء المقطر DDW. ثم تتم إضافة 100 مل من محلول EDTA (0.4M) ويصل حجمه النهائي إلى 1 لتر من الماء المقطر. وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 8.9 بإضافة 1 M من حمض الهيدروكلوريك.

• كاشف المانز DTNB

يتم إذابة 0.099 غم من DTNB في الميثانول المطلق. ويصل حجمه النهائي إلى 25 مل (هذا الكاشف مستقر لمدة 13 أسبوعاً على الأقل عند 4 درجات مئوية).

• GSH القياسي Standard GSH

محلول قياسي ستوك (M 0.001) تم تحضيره عن طريق إذابة 0.0307 غم من GSH بحجم نهائي 100 مل من محلول (EDTA 0.4M). التخفيف في محلول EDTA إلى 2, 5, 10, 20, 30, 40 μM (يجب إعداد محلول العمل القياسي هذا يوميًا).

تم إضافة الكواشف المحضرة إلى أنابيب الاختبار , وكما في الجدول التالي يتم مزج الأنابيب بشكل متقطع لمدة (10_15 دقيقة) , وبعدها تنقل إلى الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة عند 300 دورة , ثم ينقل الراشح إلى أنابيب الاختبار كما في ادناه (Owens and Belcher, 1965)

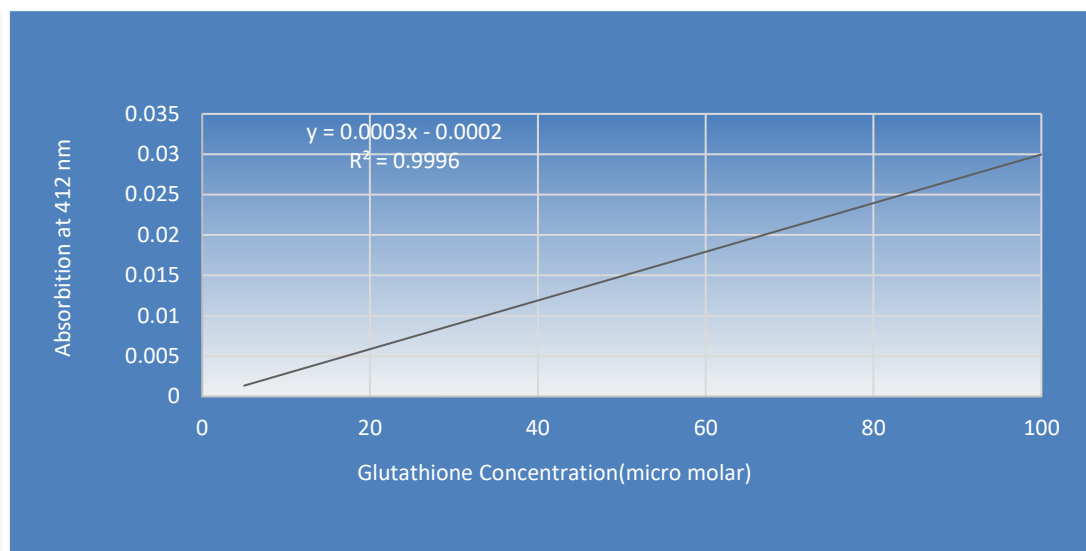
جدول (3-11) الكواشف المستعملة في تقدير مستو GSH في المصل

Reagents	Sample μL	Reagent black μL	Standard μL
Sample	100	-----	-----
Standard	-----	----	100
DDW	800	900	100
TCA	100	100	100

الكواشف المضافة	أنبوب النموذج μL	أنبوب الكفى μL
الراشح	400	400
Tris EDTA buffer	800	800
DTNB reagent	20	20

يتم مزج الأنابيب بشكل جيد بعد ذلك تقاس الامتصاصية بمقياس الطيف الضوئي باستخدام المحلول الكفئ لقراءة الامتصاص الصفري عند 412 نانومتر، ويتم قراءة امتصاص العينة في غضون خمس دقائق من إضافة كاشف المانز.

يتم الحصول على تركيز الكلوتاثيون من منحنى المعايرة في الشكل (3-5).

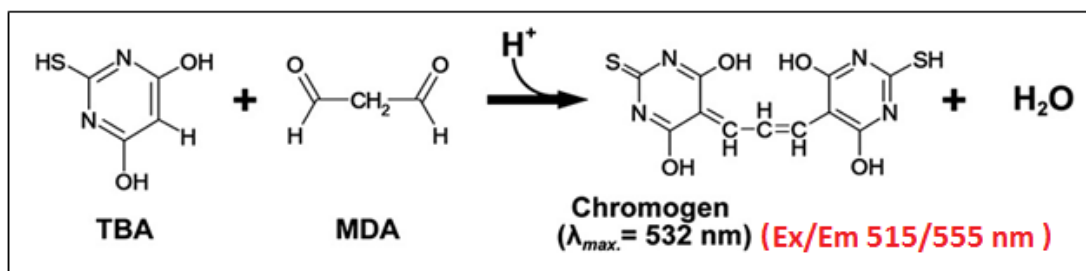


شكل (3-3) المنحنى القياسي لحساب تركيز الكلوتاثيون

9.5.3. قياس تركيز المألون ثنائي الديهايد malondialdehyde في مصل الدم

تم تقييم بيروكسيد الدهون في الأمصال عن طريق المواد المتأثرة بحمض الثيوباربيتوريك (TBARS). يعطي اختبار TBARS أداة أساسية وقابلة للتكرار وموحدة لقياس بيروكسيد الدهون في المصل. تقاس MDA-TBA adduct المصمم من خلال استجابة MDA و 1،3-داي اثيل-2-ثيوباربيتوريك أسيد (DETBA) تحت درجة حرارة عالية (90-100 درجة مئوية) في ظروف حمضية قياساً لونياً عند 530-540 نانومتر أو قياس الفلور عند درجة حرارة عالية. يبلغ طول موجة الإثارة 515 نانومتر وطول موجة الانبعاث 555 نانومتر. هذا التفاعل له حساسية أعلى بكثير عند قياسه بقياس الفلور.

يتفاعل المألونديالديهايد MDA مع حامض الثايو باربيتوريك TBARS بظروف حامضية وتسخين لينتج مركب ملون يمتص الضوء بالطول الموجي 530-540 nm . شدة اللون بالطول الموجي 532 nm تقابل مستوى بيروكسيد الدهون في النموذج والنماذج غير المعروفة تقابل بالمنحنى القياسي



شكل (3-4) تفاعل محلول الثايوباربيتوريك مع المالوندايالديهايد

الكواشف

- 1- (0.6) $\% \left(\frac{w}{v} \right)$ TBA (0.6 غم من حمض الثيوباربيتوريك في 100 مل ماء مقطر).
- 2- (17.5) $\% \left(\frac{w}{v} \right)$ TCA (17.5 غم من حمض التريكوروسيتيك في 100 مل ماء مقطر)
- 3- (70) $\% \left(\frac{w}{v} \right)$ TCA (70 غم من حمض التريكوروسيتيك ف في 100 مل ماء مقطر).

- 1 - تمت إضافة 100 ميكرو لتر من المصل إلى أنبوب الاختبار ، و 2 مل من محلول العمل الذي يتم تحضيره على النحو التالي:
- 0.514 من TBA ، 25 جم من TCA و 0.5 مل من $M HCl_1$ ممزوج مع 190 مل من DW. ثم أضفنا 1 جم من SDS وأكملنا الحجم إلى 200 مل.
- 2- تم تسخين العينة بشكل دوامي وتسخينها في حمام مائي 90 درجة مئوية لمدة 50 دقيقة ، ثم تركها لتبرد.
- 3-تم بعد ذلك الطرد المركزي للعينة لمدة 5 دقائق عند 5000 دورة في الدقيقة ثم قياس الامتصاص الطيفي الضوئي للمادة الطافية عند طول الموجة 532 نانومتر مقابل كاشف فارغ. كان تحضير الكاشف فارغاً هو نفس الإجراء أعلاه باستثناء تغيير العينة باستخدام DW(ماء مقطر).

$$serumMDA = \frac{Absorbance}{d \times X} \times D.F$$

d = عرض الخلية (1 cm وهو ثابت)

ϵ = معامل الممتصية ($1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$)

$D.F$ = معامل التخفيف (dilution factor) ويساوي 5.15 (Lefevre et al., 1998) .

10.5.3. تقدير فعالية انزيم سوبر اوكسايد دسيميو تاييز SOD

يتم تقدير فعالية حسب طريقة الامتصاص المناعي المرتبط بالانزيم Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) استعملت عدة الفحص التجارية لشركة Sonlong الصينية لقياس مستويات مضادات الأكسدة بتقنية الاليزا. (Hoseinpouran *et al.*, 2015)

يستند على طريقة السندويش Sandwich ELISA صفيحة المعايرة الدقيقة التي تم تغطيتها سابقا بجسم مضاد خاص بـ sod حيث تضاف العينات الى الحفر بعدها يضاف انزيم البيروكسيديز الجسم المضاد المرتبط بالانزيم (SOD) في كل حفرة بعدها يتم وضعه في الحاضنة ، ثم غسلها، ثم إضافة محلول المادة الأساس إلى كل حفرة تحتوي جسم مضاد يظهر باللون الأزرق ثم يتحول إلى اللون الأصفر بعد اضافة محلول الايقاف بعدها تقاس الكثافة الضوئية عند طول موجي 450 نانومتر.

وضع المحلول الاساس بأنابيب صغيرة أولاً، ثم اخذ ماصة بحجم 50 من كل أنبوب إلى صفيحة ميكروسكوبية في لوحة microelisa، ثم نترك مجموعة السيطرة فارغة دون الاضافة إليها ، ونقوم بتحميل 40 عينة من محلول التخفيف المؤقت، و 10 عينات مضافة إلى الجزء السفلي دون لمس جدار الصفيحة ثم امزجها جيداً مع طريقة العمل :

1-نقوم بتحضير (5) من انابيب الاختبار وتسميتها S1،S2،S3،S4،S5 حيث تتكون من تراكيز ووحدات ونموذج وسيطرة مختلفة في حفر الصفيحة ذات المعايير المختلفة بعدها نقوم بتخفيف المعايير وذلك بأخذ 150 مايكرو لتر من محلول Dilution of Standers من كاشف الانزيم الرابط وأضافته في أنابيب الاختبار test tubes المعروفة .

2- وفي الوقت نفسه اضافة 300 مايكرو لتر الى كل من S2،S1 وعمل Mix -S و 150 مايكرو لتر الى S3، S4، S5 من أنابيب الاختبار محلول قياسي Stander المعلوم تركيزه S-Mix

3- ثم نسحب 10 مايكرو لتر من المصل وأضافته إلى الصفيحة ذات المعايير الدقيقة بعدها يتم الخلط بدقة لمدة 30 ثانية لوضعها في الحاضنة لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 37 درجة مئوية بعد تغطيتها بغشاء لوحة الاغلاق .

4-يقوم بإزالة الخليط المحضون في الحفر بواسطة النقر بالأصبع لإزالة الخليط وغسل الصفيحة المتكونة من المعايير الدقيقة خمس مرات بالماء المقطر .

5- بعدها لإزالة قطرات الماء المتبقية تدق الصفيحة ذات المعايير الدقيقة بعد تكرار واعادة تعبئته بمحلول الغسيل على ورق مجفف أو ممتصة paper towels or absorbent.

6- التلوين نضيف 50 مايكرو لتر من المادة الأساس محلول الكروموجين A 50 مايكرو لتر من المادة الأساس محلول الكروموجين B و مع الخلط والهز بدقة لمدة 30 ثانية بعدها وضعها في الحاضنة وفي مكان مظلم لمدة 15 دقيقة لمدة 37 درجة مئوية مع اطفاء الضوء أثناء التلوين

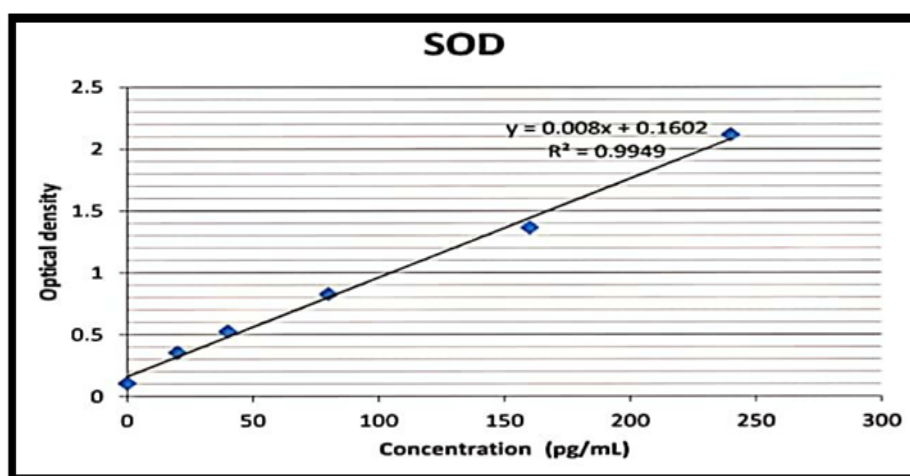
7-نقوم بوضع 50 مايكرو لتر من محلول الإيقاف H2SO4 IN Stop solution لأنها التفاعل

8 - نقوم بعملية الخلط لمدة 30 ثانية اذ تعد هذه الخطوة مهمة جدا وعملها يكون بدقة ليتم تغير اللون من اللون الازرق الى اللون الاصفر.

9- نقوم بقراءة الامتصاصية على طول موجي 450 نانو متر حيث تعتبر قيمة OD لبئر التحكم الفارغ على أنها صفر وخلال 15 دقيقة بعد اضافة محلول الإيقاف.

10- يتم رسم علاقة بين الامتصاصية والتراكيز القياسية ذات الدلالة وبوحدات معينة.

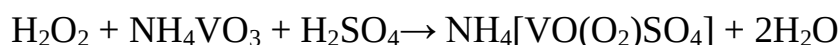
11_ يتم استخراج قيمة كل مستوى من المنحني القياسي كما في الشكل شكل (3-7).



شكل(3-5) المنحني القياسي لانزيم SOD

11.5.3. تقدير فعالية الكاتليز Catalase Activity Estimation

تم اختبار قياس لوني جديد وبسيط ودقيق لتقييم نشاط إنزيم الكاتليز حسب الطريقة المتبعة من الباحثين (Hadwan and kadhun, 2018) ويستند مبدأ الفحص على تفاعلات الأمونيوم ميتا فناديت مع بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ ويعتمد على اختزال Vanadium (V) إلى Vanadium (III) بواسطة H₂O₂ ينتج عن ذلك مركب بيروكسوفاناديوم أحمر برتقالي تقاس شدة الامتصاصية له بواسطة جهاز Spectrophotometer عند طول موجي 452nm، كما في التفاعل التالي:



اعداد الكاشف Reagents Preparation

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

2 تم تحضير محلول الأمونيوم ميتا فناديت (0.01) بإذابة 0.2925 غم من الأمونيوم ميتا فناديت في 200 مل من حامض الكبريتيك المحضر في الخطوة ..

3- تم تحضير محلول الفوسفيت المنظم Phosphate buffer بتركيز mM50 في وسط متعادل pH = ويتكون من:

A-محلول (A) يتكون من KHPO إذ وزن (6.81 غم من المحلول وتم إذابته في لتر ماء مقطر.
B- محلول (B) يتكون من Na₂HPO₂H₂O إذ وزن (8.90 غم) من المحلول وتم إذابته في لتر ماء مقطر.

وحضر محلول الفوسفيت المنظم عن طريق خلط المحاليل A و B بنسبة 1: 1.5

4- محلول بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ القياسي (10)

(0.1134) (مل) من بيروكسيد الهيدروجين بتركيز (30) مع (100) ml من الفوسفيت المنظم.

جدول (3-12) تقدير فعالية الكاتليز

الكواشف	العينة	الانبوب القياسي	بلانك
مخفف المصل	100µl	-----	-----
محلول الفوسفيت المنظم	900µl	1000µl	3000µl
بيروكسيد الهيدروجين	2000µl	2000µl	-----
بعد الخلط ، تحضن أنابيب الاختبار لمدة دقيقتين عند 37 درجة مئوية			
كاشف الامونيوم فناديت	2000µl	2000µl	2000µl
بعد ذلك، تحفظ الانابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة عشر دقائق، ثم تقرأ الامتصاصية عند طول موجي 452nm			

تم حساب نشاط إنزيم الكاتليز من المعادلة التالية:

$$\text{Catalase Activity of test kU} = \frac{2.303}{t} * \log \frac{S^0}{S} \quad \text{--- (1)}$$

إذ إن:

K: معدل سرعة التفاعل

امتصاصية الأنبوب القياسي S:

امتصاصية أنبوب العينة S:

الوقت : t

12.5.3. تقدير مستوى هرمون الشحمون الخصوي Estimation of Testosterone hormone levels

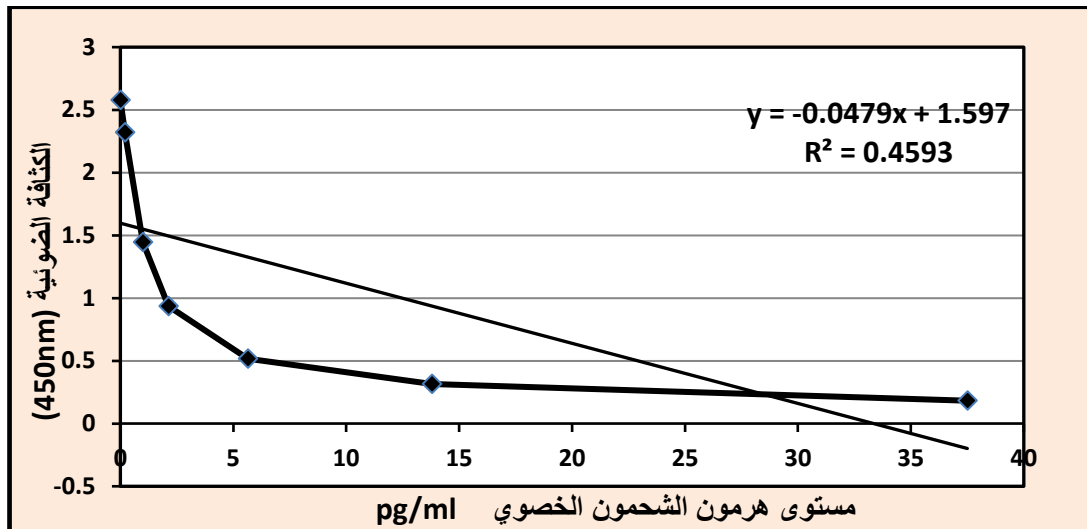
تم قياس مستوى التركيز للهرمون وفق طريقة (Tietz, 1995).

يقوم مبدأ الاختبار على الارتباط بين المستضدات والاحسام المضادة فعند إضافة كاشف الأنزيم Enzyme Reagent وكاشف البيوتين Biotin Reagent (الجسم المضاد) إلى الحفر الحاوية على المحاليل القياسية أو عينات المصل فإن الأخير يتفاعل مع هرمون الشحمون الخصوي ومع كاشف الأنزيم كل على حدة كما أنه يتفاعل بعد ارتباطه بهذه المستضدات مع مركب الـ Streptavidin المرتبط بالحفر لتكوين معقد سندويج مرتبط بالطور الصلب ، وأخيراً تضاف المادة الأساس وتقرأ الامتصاصية عند طول موجي 450 nm.

- 1- يثبت العدد المناسب من الحفر على المسند الخاص بها، والمجهز مع طقم الهرمون .
- 2- يؤخذ 20 µl من المحلول القياسي أو عينات المصل وتوضع في الحفر المخصصة لها.
- 3- يضاف 50 µl من الكاشف الأنزيمي للهرمون إلى كل حفرة.
- 4- ترج الحفر بلطف لمدة 20-30 ثانية لغرض المزج.
- 5- يضاف 50 µl من كاشف البيوتين إلى كل حفرة.
- 6- ترج الحفر بلطف لمدة 20-30 ثانية لغرض المزج.
- 7- تغطى الصفيفة وتحضن لمدة 60 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
- 8- تزال محتويات الحفر بالنقر أو باستخدام ورق ماص.
- 9- تغسل الصفيفة بوساطة بفر الغسيل خمس مرات.
- 10- يضاف 100 µl من محلول المادة الأساس إلى كل حفرة.
- 11- تحضن في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة.
- 12- يضاف 50 µl من محلول الايقاف إلى كل حفرة ويمزج بلطف لمدة 15-20 ثانية.
- 13- تقرأ الامتصاصية في كل حفرة عند طول موجي 450 nm خلال 30 دقيقة من إضافة محلول الايقاف.

يتم رسم منحنى المعايرة بين قيم التراكيز للمحاليل القياسية (على المحور السيني) وما يقابلها من قيم الكثافة الضوئية (Optical Density (OD) (على المحور الصادي) ثم يرسم افضل خط مستقيم يمر

على اغلب النقاط لكي يستخدم في تحديد تركيز الهرمون في عينات المصل بالاعتماد على قيم امتصاصيتها, أو تستخرج معادلة المستقيم باستخدام الكمبيوتر ثم تعتمد تلك المعادلة في استخراج تركيز الهرمون بعد ادخال قيمة الكثافة الضوئية للعينة, كما في الشكل (3-8).



شكل (3-6) المنحنى القياسي لتقدير تركيز هرمون الشحمون الخصوي T

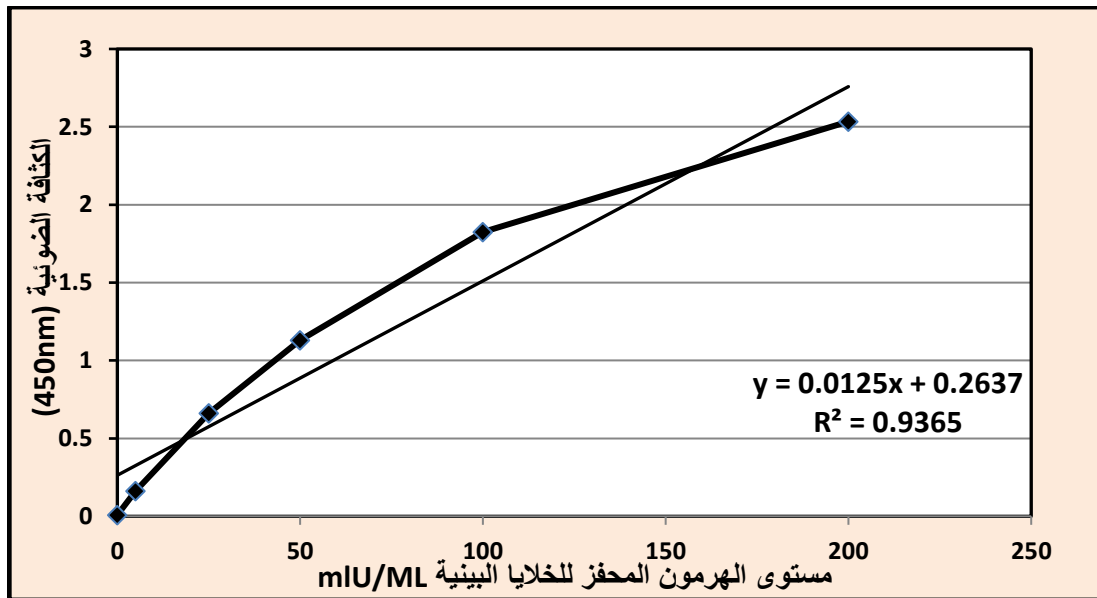
13.5.3. تقدير مستوى الهرمون اللوتيني Estimation of LH levels

تم قياس الهرمون وفق الطريقة (Kosasa,1981) .

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

- 1- يثبت العدد المناسب من الحفر على المسند الخاص بها والمجهز مع طقم الهرمون .
- 2- تؤخذ 50µl المحاليل القياسية أو عينات المصل وتوضع في الحفر المهيأة لها.
- 3- تضاف 100µl من محلول الكاشف الأنزيمي للهرمون اللوتيني LH -Enzyme Reagent لكل حفرة .
- 4- يتم الخلط بدقة لمدة 20-30 ثانية .
- 5- تحضن الحفر لمدة 60 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.
- 6- يُزال الخليط المحضون من الحفر بواسطة النقر بالأصبع أو بجهاز خاص لسحب الخليط .
- 7- تغسل الصفيحة بواسطة بفر الغسيل خمس مرات .

- 8- تضرب الصفيحة ذات المعايير الدقيقة بشدة على ورق مجفف لإزالة قطرات الماء المتبقية.
 - 9- تضاف 100µl من محلول المادة الأساس لكل حفرة ثم ترج برفق لمدة 10 ثوانٍ.
 - 10- تحضن الصفيحة بمحتوياتها عند درجة حرارة الغرفة لمدة 15 ثانية .
 - 11- تضاف 50µl من المحلول الموقوف لكل حفرة وتمزج المحتويات بدقة لمدة 20-15 ثانية.
 - 12- تقرأ الامتصاصية لكل حفرة عند طول موجي 450nm بواسطة جهاز ELISA Reader.
- يتم رسم منحنى المعايرة بين قيم التراكيز للمحاليل القياسية (على المحور السيني) وما يقابلها من قيم الكثافة الضوئية OD (على المحور الصادي), ثم يرسم افضل خط مستقيم يمر على اغلب النقاط لكي يستخدم في تحديد تركيز الهرمون اللوتيني في عينات المصل بعد تحديد قيم امتصاصيتها, أو تستخرج معادلة المستقيم باستخدام الكمبيوتر ثم تعتمد تلك المعادلة في استخراج تركيز الهرمون بعد ادخال قيمة الكثافة الضوئية للعينة كما في الشكل(3-9).



شكل (3-7) المنحنى القياسي لتحديد تركيز الهرمون اللوتيني LH

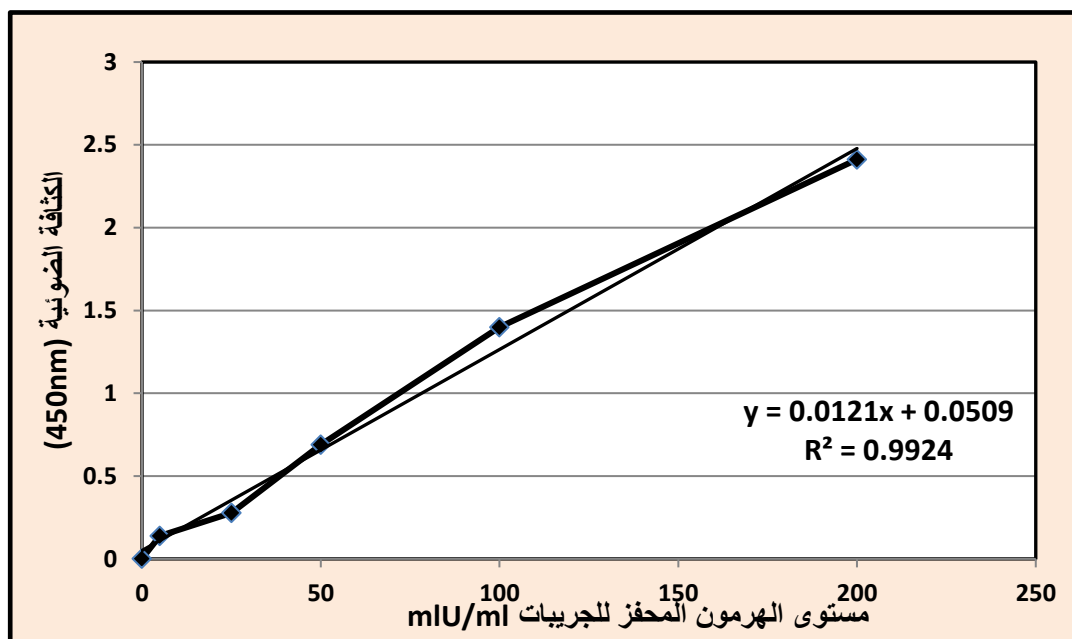
14.5.3. قياس مستوى الهرمون المحفز للجريبات Estimation of FSH level

تم قياس مستوى تركيز الهرمون FSH بطريقة (Simoni et al., 1997).

يقوم مبدأ الاختبار على أساس التفاعل بين المستضد Antigen (الهرمون في المحلول القياسي أو المصل) وبين الأنزيم والجسم المضاد (Biotinylated monoclonal antibody) الموجودان ضمن محلول الكاشف الأنزيمي للهرمون المحفز للجريبات FSH-Enzyme Reagent (مجهز

ضمن عدة القياس) لتكوين معقد يشبه السندويج, وفي ذات الوقت يتفاعل الجسم المضاد ايضاً مع مركب Streptavidin المرتبط بالحفر فيصبح المعقد مرتبط بالطور الصلب (الحفر) ، واخيراً يضاف محلول المادة الاساس وتقرأ الامتصاصية عند طول موجي 450nm.

- 1- يثبت العدد المناسب من الحفر على الحامل الخاص بها والمجهز مع طقم الهرمون.
 - 2- يؤخذ 50µl من المحاليل القياسية أو عينات المصل وتوضع في الحفر المهيأة لها.
 - 3- تضاف 100µl من محلول الكاشف الأنزيمي للهرمون المحفز للجريبات FSH-Enzyme Reagent لكل حفرة.
 - 4- تخلط المحتويات بدقة لمدة 20-30 ثانية.
 - 5- تحضن لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة.
 - 6- يزال الخليط المحضون من الحفر بواسطة النقر بالأصبع أو بجهاز خاص لسحب الخليط.
 - 7- تغسل الصفيحة بالماء المقطر خمس مرات.
 - 8- تضاف 100µl من محلول المادة الاساس للأنزيم الكاشف إلى كل حفرة.
 - 9- تحضن عند درجة حرارة الغرفة لمدة 15 ثانية.
 - 10- تضاف 50µl من المحلول الموقّف لكل حفرة ، ثم تمزج المحتويات لمدة 15-20 ثانية.
 - 11- تقرأ الامتصاصية لكل حفرة عند طول موجي 450nm بواسطة جهاز ELISA Reader
- يتم رسم منحنى المعايرة بين قيم التراكيز للمحاليل القياسية على المحور السيني وما يقابلها من قيم الكثافة الضوئية OD على المحور الصادي ثم يرسم افضل خط مستقيم يمر على اغلب النقاط لكي يستعمل في تحديد تركيز الهرمون المحفز للجريبات في عينات المصل بالاعتماد على قيم امتصاصيتها، أو تستخرج معادلة المستقيم باستخدام الكمبيوتر ثم تعتمد تلك المعادلة في استخراج تركيز الهرمون بعد ادخال قيمة الكثافة الضوئية للعينة، كما موضّح في الشكل (3-10).



شكل (8-3) المنحنى القياسي لتحديد تركيز الهرمون المحفز للجريبات FSH

6.3. الدراسة الوراثية Genetic study

1.6.3. اختبار المذنب Comet assay

اختبار المذنب Comet assay يستخدم هذا الاختبار لقياس مقدار الضرر في الـ DNA حيث استخدمت العدة oxiselect comet assay kit لأجراء هذا الاختبار كما استخدم برنامج Comet score لأجراء قياسات مختلفة لكل عينة (Speit and Olive and Banáth, 2006 ; Rothfuss, 2012).

اعداد الكاشف Reagents Preparation

يجب أن تكون الكواشف المحضرة عليها علامات تميزها عن غيرها، فقد حضر (PBS) Phosphate buffered saline من مزج PBS10 مع الماء الأيوني لتجهيز هذا المركب وحفظت بدرجة حرارة الغرفة وكان التحضير بقية المحاليل كالتالي:

1 - Lysis solution محلول التحلل لتحضير أكثر من عشرة شرائح زجاجية نمونجين في كل شريحة ويحضر من إضافة كل من:

a. محلول حل الخلايا Lysis solution (40 ml)

b. DMSO (اختياري) 4 مل تم التبريد على درجة حرارة 4 درجة مئوية أو في الثلج لمدة 20 دقيقة على الأقل قبل الاستعمال أما إضافة DMSO فهي اختيارية وهي فقط في حالة الخلايا الحاوية على مادة الحديد كالدم والأنسجة .

2- هلام المذنب Comet LMAgarose يحضر الهلام الخاص بالفحص وهو صالح للاستعمال مرة واحدة عند إذابته ويتم إذابة الهلام بوضع العلبة في حمام مائي من 90-100 مئوية لمدة خمس دقائق أو حتى ذوبان الهلام مع ازالة غطاء العلبة من أجل السماح للهلام بالتمدد نتيجة الحرارة بعد ذلك تم وضع الهلام في حمام مائي لخفض درجة حرارته وحفظ هذه الدرجة لحين اتمام تحضير العينة.

3- محلول التصبيغ Stanning Solution استخدمت صيغة SAF RED لتصبيغ الخلايا.

4- محلول منع التلاشي (اختياري) يحضر في حالة حدوث تلاشي اختفاء في العينات نمزج 500 ملغم من Phenulenedi aminedi hydro chloride مع 1 XPBS (4.5) ملغم حتى الذوبان في انبويه بحجم 10 مل.

5- محلول فك الالتفات التحلزن القاعدي Alkaline unwinding solution عند تحضير هذا المحلول يوجب الحذر وارتداء القفازات ويحضر هذا المحلول من 4.0 غم من NaOH و 250 مايكرو mm EDTA و 200 ملغم من dH₂O لكل 50 مل . ويحرك حتى اتمام عملية الذوبان ، و ثم يترك حتى يكون بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال .

6- تحضير محلول الترحيل الكهربائي القاعدي لاختيار المذنب ولتحضير 1 لتر من محلول الترحيل الكهربائي 8 غرام من NaOH مسحوق 2 مل EDTA 500Mm و pH 8 dH₂O بعد ذلك يحفظ في الثلاجة بدرجة 4 درجة مئوية .

2.6.3. اختبار تحلل المذنب Comet Assay

1- يحضر محلول التحلل ويبرد على درجة 4 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة قبل الاستخدام.

2- إذابة الهلام في بيكر ماء مغلي لمدة 5 دقائق ثم يوضع في حمام مائي على درجة 37 درجة مئوية قبل 20 دقيقة من العمل .

3- مزجت الخلايا بتركيز 1 x 10 مع الهلام الذائب في درجة حرارة 37 درجة مئوية وبنسبة 1:10 (حجم حجم) و سحبت مباشرة بالماصة إلى شريحة المذنب وإذا كان من الضروري نستخدم المساحة الجانبية للفوهة البلاستيكية للماصة لنشر الهلام والخلايا فوق مساحة العينة للشريحة لتأكد من تغطية كافة مساحة العينة وإذا لم تتوزع بشكل متساوي تدفئ الشريحة بدرجة 37 درجة مئوية قبل اكمال التطبيق.

4 - في حالة العمل مع عدة عينات يجب تقسيم الهلام في قناني او انابيب بدرجة 37 درجة مئوية و اضافة الخلايا وتمزج بلطف بطريقة التقليب ونشر 50 في مساحة العينة توضع العينات على سطح مستوي ومنظم وعند درجة 4 مئوية في الثلاجة لمدة 10 دقائق إذ ستظهر قطرة واضحة بقطر 0.55mm في

- حافة المساحة المحددة للعينة ان زيادة وقت التبلور إلى 30 دقيقة يزيد من التصاق العينات في حالة الرطوبة العالية.
- 5- غمرت العينات في محلول التحلل بدرجة 4 مئوية لمدة 30-60 دقيقة ولغرض زيادة حساسية الاختبار يمكن استمرار مدة الحضان بنفس الدرجة لمدة 12 ساعة.
- 6- يجب ازالة المحلول الزائد من العينة وغمر بمحلول منع الالتفات القاعدي على ان يحضر قبل الاستعمال مباشرة.
- 7- يستمر الغمر في المحلول السابق لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة او لمدة ساعة بدرجة 4 م وفي الظلام.
- 8- لإجراء اختبار المذنب يضاف 1 مل بدرجة 4 مئوية من محلول الترحيل القاعدي ثم ينقل النموذج إلى الترحيل الكهربائي ويغطى بالغطاء الخاص مع ضبط الجهاز على 21 فولت لمدة 30 دقيقة
- 9- يزال محلول الترحيل الكهربائي الزائد بلطف وتغمر العينة بـ H_2O لمدة خمس دقائق وتكرر العملية مرتين ثم يغمر في محلول كحولي 70% لمدة خمس دقائق.
- 10- يجفف النموذج في درجة 37 م لمدة 10-15 دقيقة ويعمل التجفيف على جعل الخلايا في مستوى واحد مما يسهل عملية مراقبتها ثم تخزن النماذج في درجة حرارة الغرفة مع التجفيف المسبق لإجراء القياسات في المرحلة
- 11- وضع 100 مل من صبغة Safe red في دائرة الأكاروز الجاف ولمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في الظلام ثم يرفع النموذج برفق لإزالة الصبغة الزائدة ويغسل في الماء لمدة قليلة ثم يسمح للنموذج ان يجف بشكل كامل بدرجة 37 مئوية.
- 12- يوضع النموذج في المجهر الومضي Fluorescence إذ يكون مرشح الوميض كافي لإجراء الاختبار كما يمكن اجراء خمسين قياس مختلف في هذا الاختبار وتقاس من النسبة W/L دليل المذنب.

7.3. التحليل الإحصائي Statistical analysis

حللت نتائج الدراسة احصائياً باستخدام التصميم تام العشوائية Design Randomized Completely واختبرت معنوية الفروق بين المعدلات باستخدام أقل فرق معنوي (L.S.D) significant difference عند مستوى المعنوية ($P \leq 0.05$) اذ حللت النتائج احصائياً بواسطة تحليل التباين (ANOVA) Analysis of Variance واستخراج الخطأ القياسي Standard Error (SE) والمعدل $\pm$ Mean وحللت البيانات باستخدام برنامج SAS (SAS,2012).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

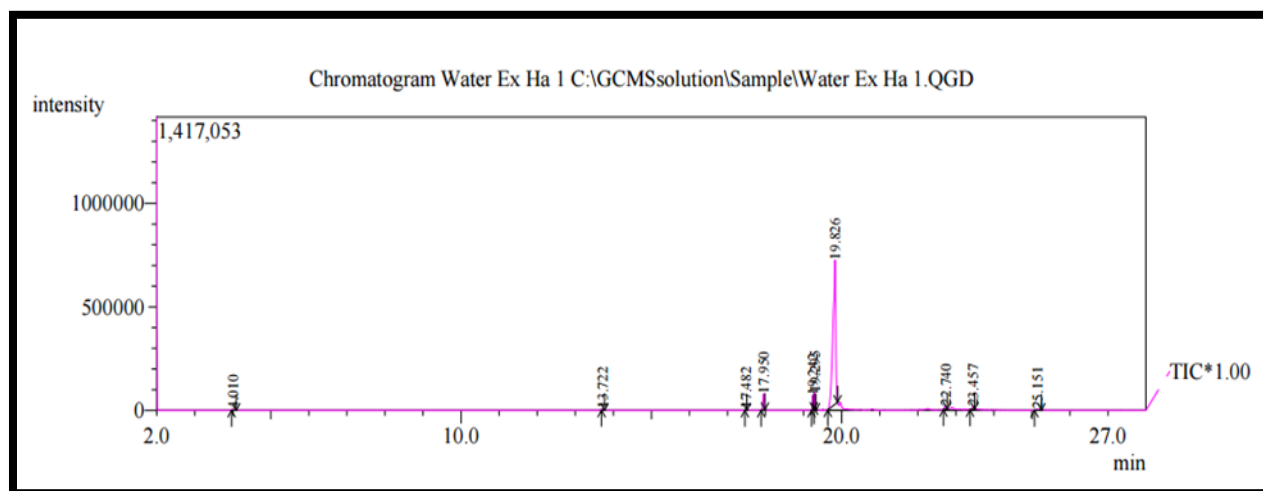
4. النتائج والمناقشة

1.4. الكشف عن المركبات الكيميائية الفعالة في المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius*

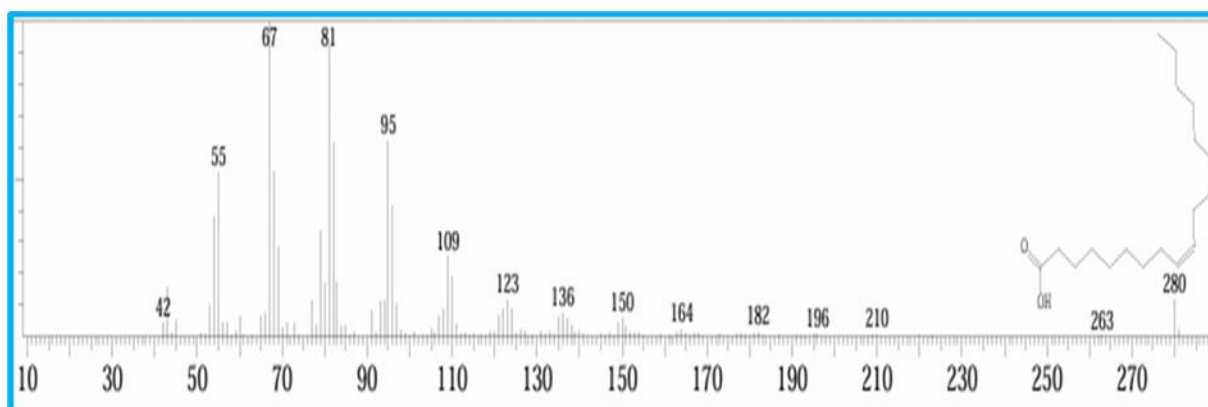
أظهر جدول (4-1) أن المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* يتكون من عدة مركبات كيميائية باستخدام جهاز (GC-MS) للكشف عن المركبات الفعالة. وبعد إجراء تحليل كروماتوغرافيا الغاز-مطياف الكتلة (GC-MS)، تبين أن مستخلص *Rubus ulmifolius* يتكون من عدة مركبات كيميائية وفقاً لمساحة الذروة، وزمن الاحتجاز، والصيغة الجزيئية. في هذه الدراسة، تم تحديد 9 مركبات كيميائية في المستخلص المائي لنبات *Rubus ulmifolius* وهي 9,12-Octadecadienoic acid و Hexadecanoic acid, cyclohexyl ester و Methyl trans-9-octadecenoate و 2-Ethylimidazole و 4,4-Dimethylcyclohexene و Chloroethyl linoleate و 2-Amino-2-oxoethyl و 1,3-Dioxolane, 2-phenyl و Pentanedinitrile, 2-methyl و acetate ، كما هو موضح في الجدول (4-1)، حيث بلغت أعلى قيمة مساحة 86.17% عند زمن الاحتجاز 19.825 دقيقة لمركب 9,12-Octadecadienoic acid ، بينما بلغت أدنى قيمة مساحة 0.29% عند زمن الاحتجاز 17.483 دقيقة لمركب 2-Amino-2-oxoethyl acetate.

جدول (4- 1) المركبات الفعالة التي تم فصلها من المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* باستخدام تقنية GC-Mass.

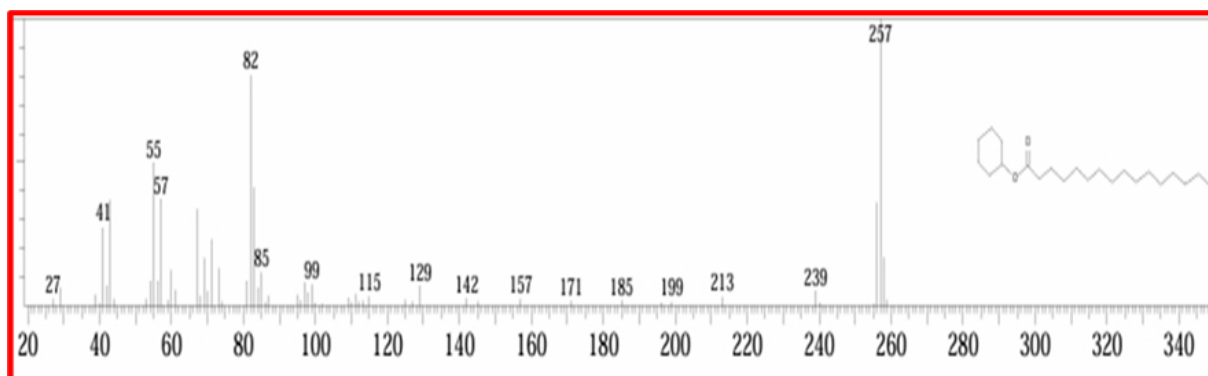
	اسم المركب الناتج	الصيغة الجزيئية	زمن الاحتجاز (الدقيقة) (R.Time)	Peak area%
1	9,12-Octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	19.825	86.17
2	Hexadecanoic acid, cyclohexyl ester	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	17.950	4.27
3	Methyl trans-9- octadecenoate	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	19.292	2.76
4	2-Chloroethyl linoleate	C ₂₀ H ₃₅ ClO ₂	19.242	2.58
5	4,4-Dimethylcyclohexene	C ₈ H ₁₄	22.742	1.34
6	2-Ethylimidazole	C ₅ H ₈ N ₂	23.458	0.97
7	Pentanedinitrile, 2-methyl	C ₆ H ₈ N ₂	4.008	0.48
8	1,3-Dioxolane, 2-phenyl	C ₉ H ₁₀ O ₂	13.725	0.35
9	2-Amino-2-oxoethyl acetate	C ₄ H ₇ NO ₃	17.483	0.29



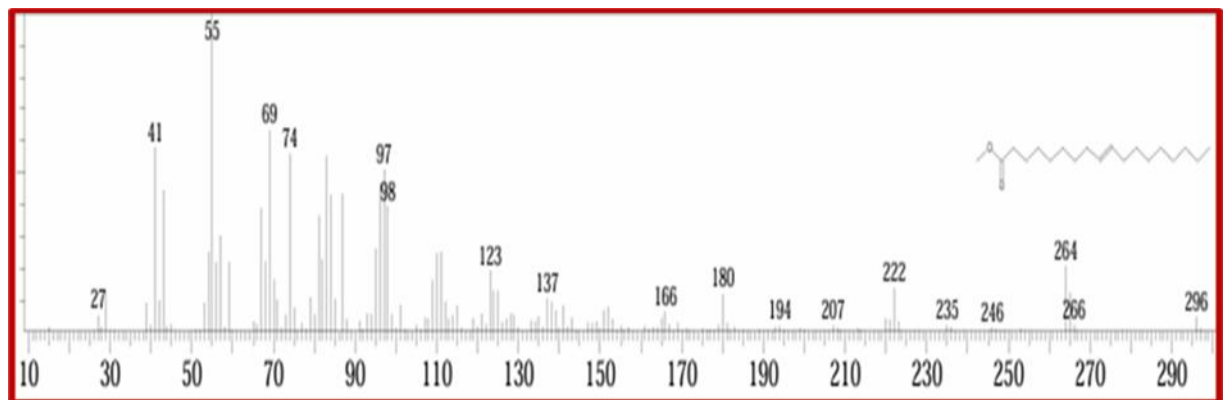
شكل (1-4) المركبات الفعالة في المستخلص المائي لنبات *Rubus ulmifolius*.



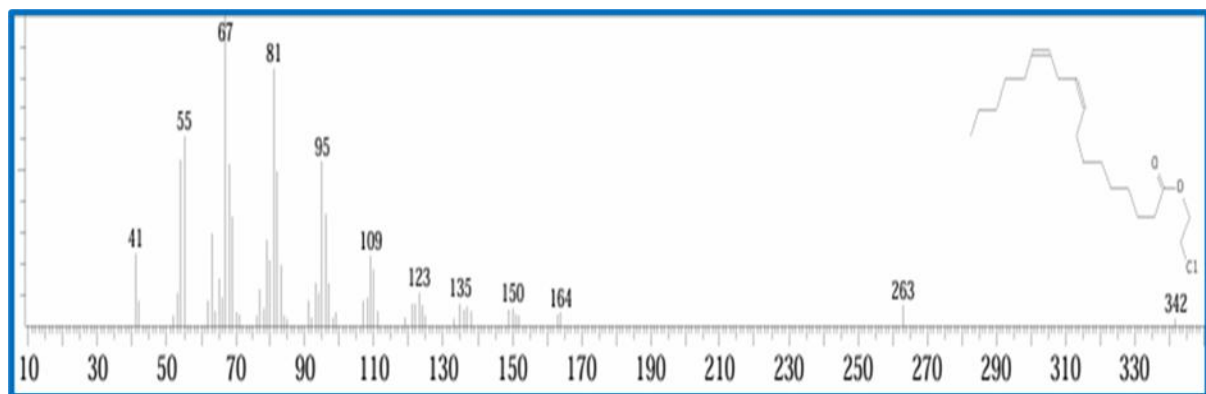
شكل (a2-4) Octadecadienoic acid-9,12



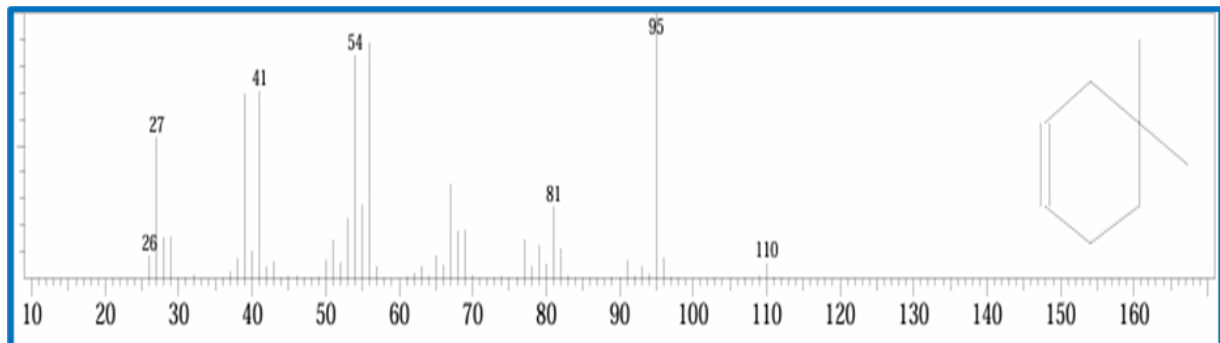
شكل (b 2-4) Hexadecanoic acid, cyclohexyl ester



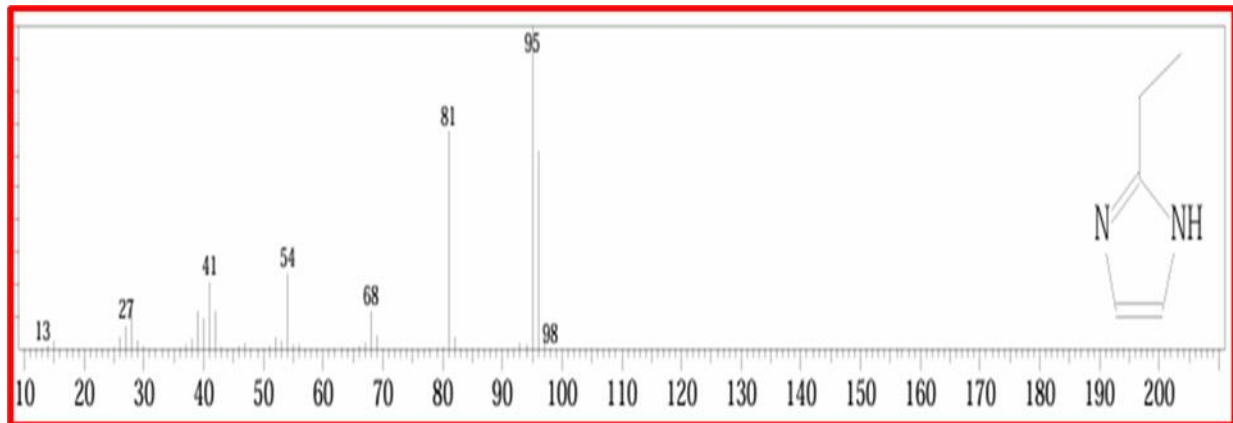
شكل (c2-4) Methyl trans-9-octadecenoate



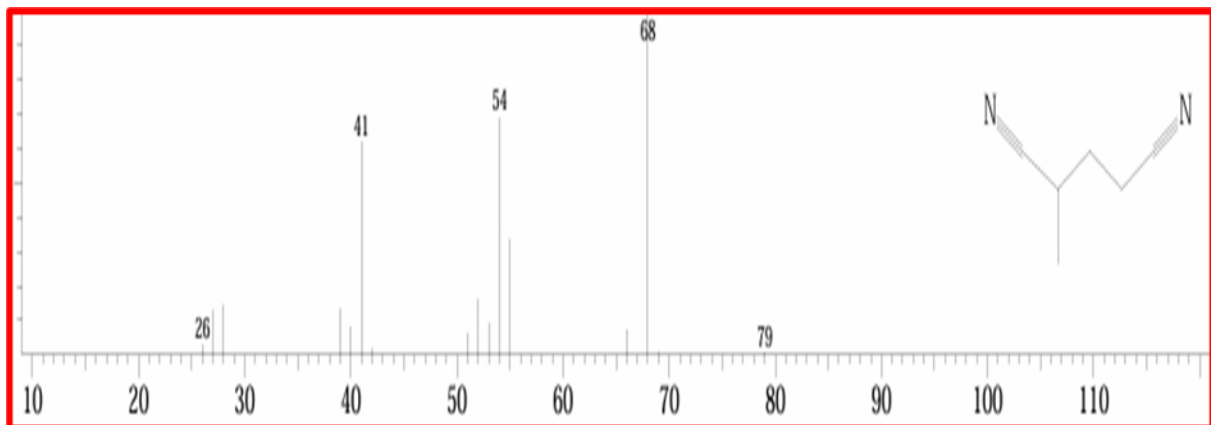
شكل (d2-4) -2Chloroethyl linoleate



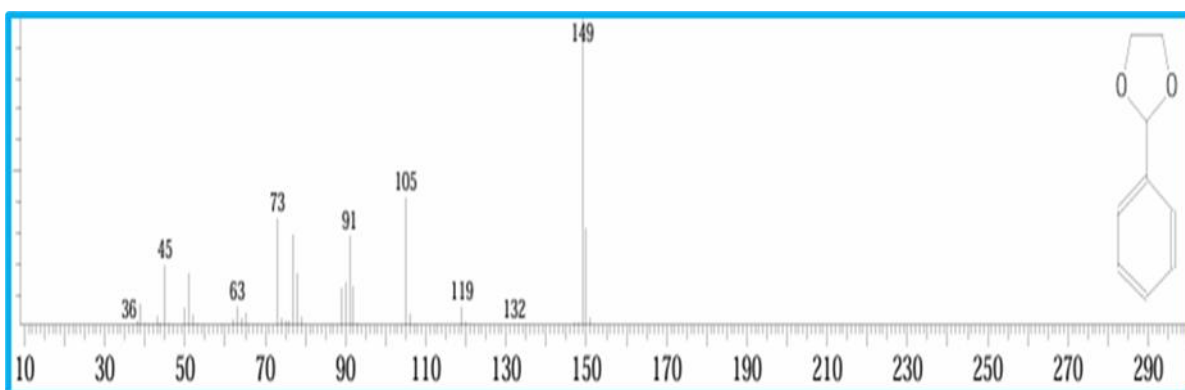
شكل (e2-4) 4,4-Dimethylcyclohexene



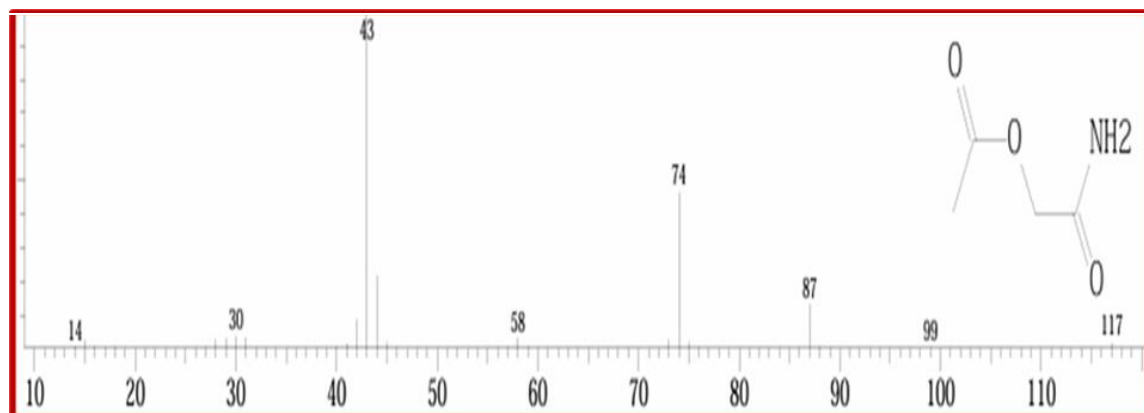
شكل (f2-4) Ethylimidazole-2



شكل (g2 -4) Pentanedinitrile, 2-methyl-



شكل (h2-4) 1,3-Dioxolane, 2-phenyl-



شكل (2-4) 2-Amino-2-oxoethyl acetate

2.4. تحديد التركيز الأكثر فعالية لمستخلص نبات توت العليق

أظهرت نتائج التجربة الأولى التي صممت لتحديد التركيز الأكثر فعالية من بين ثلاث تراكيز تصاعدية (200، 300، 400 ملغم/كغم) وجود انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في مستوى نشاط أنزيم الـ SOD في مجموعتي الوقاية الأولى والثانية مقارنة بمجموعة السيطرة في حين لم تظهر النتائج اختلافاً معنوياً ($p > 0.05$) في مستوى نشاط الانزيم بين مجموعة الوقاية الثالثة ومجموعة السيطرة. تشير النتائج أيضاً إلى وجود ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) في مستوى نشاط الانزيم بين مجموعة الوقاية الثالثة ومجموعتي الوقاية الأولى والثانية. (جدول 2-4).

جدول (2-4) تأثير ثلاثة تراكيز من المستخلص المائي لنبات توت العليق على مستوى نشاط أنزيم SOD في مصل الدم لدى ذكور الجرذان البيض المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2 ملغم / كغم) لمدة 30 يوماً.

مستوى نشاط أنزيم SOD U/ml	مجاميع التجربة
79.33±2.33 a	مجموعة السيطرة : (ماء اعتيادي)
44.32±2.45 c	مجموعة الوقاية الأولى : 200 ملغم/كغم مستخلص
61.63±2.13 b	مجموعة الوقاية الثانية : 300 ملغم/كغم مستخلص
77.19±1.95 a	مجموعة الوقاية الثالثة : 400 ملغم/كغم مستخلص

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

أوضحت النتائج المبينة في الجدول أعلاه فعالية المستخلص المائي لنبات توت العليق بالتركيز 400 ملغم/كغم ضد تأثير السيكلوسبورين في استنزاف أو تثبيط نشاط انزيم الـ SOD في مصل الدم مقارنة بالتركيزين 200,300 ملغم/كغم الذين أظهرنا انخفاضاً معنوياً ($p < 0.05$) في مستوى نشاط الانزيم.

3.4. الدراسة النسجية :Histological Study

1.3.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في نسيج الكبد وعلى قياسات معدل أقطار الخلايا الكبدية والجيبانيات الكبدية والأوردة المركزية لذكور الجرذان:

أوضحت نتائج الدراسة الحالية النسجية المبينة في الصورة (4-1) التركيب النسجي الطبيعي لكبد الجرذان لمجموعة السيطرة السالبة، إذ يتكون من عدة فصيصات وكل فصيص يحتوي على وريد مركزي طبيعي وتتنظم حوله خلايا مكعبة الشكل هي الخلايا الكبدية مع انتظام الحبال الكبدية وما بين الحبال مع فسخ دموية تسمى الجيبانيات ويمكن تمييز الخلايا الكبدية ذات أنوية واضحة كما تبين الصورة (4-2) التركيب الطبيعي للوريد البابي الكبدي مع قناة الصفراء والشريان الكبدي.

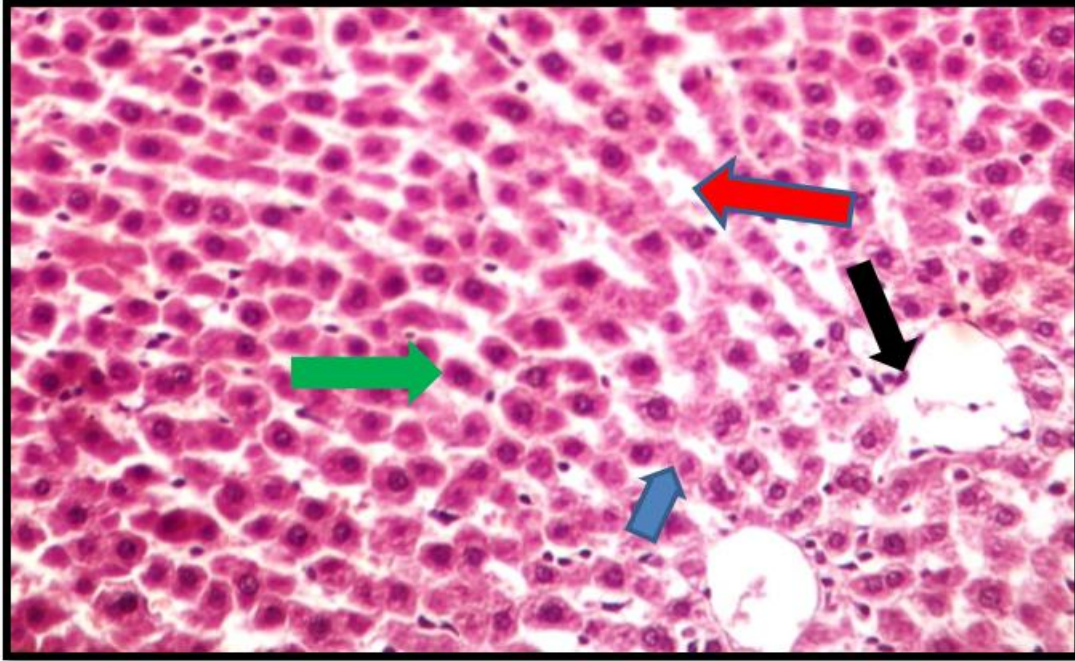
تشير نتائج الفحوصات النسجية إلى أن أنسجة الكبد في المجموعة الثانية السيطرة الموجبة المعاملة بالسيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم / كغم من وزن الجسم لوحظ فيها وجود احتقان وتوسع في الوريد المركزي، و تنكس الخلايا مع عدم انتظام شديد في الحبال الكبدية، ونخر خلوي، و ارتشاح خلوي شديد مع توسع الجيبانيات و تنكس ، الصورة (4-3) (4-4) (4-5). كما تبين الصورة (4-4) احتقان و توسع كبير في الوريد البابي و ارتشاح خلوي.

بينت القياسات النسجية لمجموعة عقار السيكلوسبورين (السيطرة الموجبة) (G2) حسب جدول (4-3) وجود ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) لمعدل قطر كل من الخلايا الكبدية (30.28 ± 0.42) مايكرون والجيبانيات (74.52 ± 0.26) مايكرون والوريد المركزي (30.28 ± 0.42) مايكرون مقارنةً بمعدل قطر كل من الخلايا الكبدية (17.92 ± 0.17) مايكرون والجيبانيات (35.70 ± 0.36) مايكرون والوريد المركزي (0.17 ± 17.92) مايكرون لمجموعة السيطرة السالبة G1. وهذا يشير إلى حدوث ضرر في غشاء الخلايا الكبدية الناتج عن زيادة النشاط الالتهابي والمتمثل بظهور الخلايا الالتهابية . وهذا يتوافق مع كل من (Freitas et al.,2013; Akbulut et al.,2015; Serrya et al.,2021).

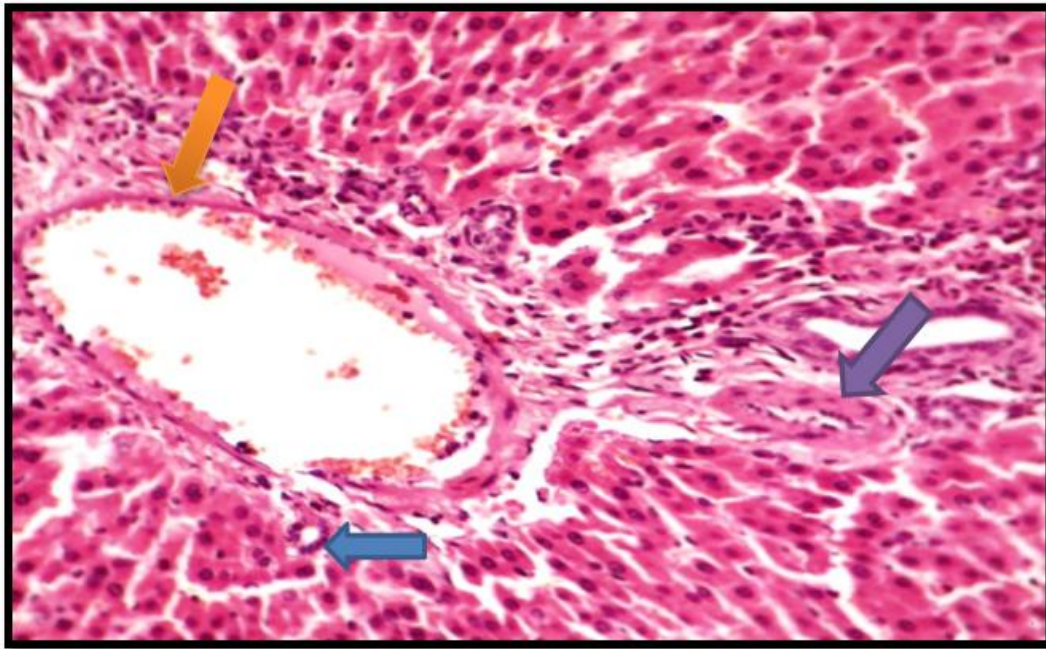
أظهرت نتائج الفحص النسيجي للكبد صورة (4-6) في المجموعة الثالثة مجموعة المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم لمدة 30 يوم وجود الوريد المركزي الطبيعي وانتظام الحبال الكبدية مع الجيبانيات اما المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز 400 ملغم/كغم وعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم أن الأنسجة أقرب إلى الطبيعي مع انتظام في الحبال الكبدية والخلايا الكبدية ونواها مع وجود توسع الجيبانيات مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة، الصورة (4-7). اتفقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسات السابقة (Lai et al., 2017; kareem and obeid, 2020; Majeed et al., 2023; Drobnis and Nangia, 2017).

كما بينت نتائج الدراسة الحالية للقياسات النسيجية للمجموعة المعاملة بالمستخلص لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم في جدول (4-3) عدم وجود فروق معنوية في معدل اقطار الخلايا الكبدية (17.91 ± 0.18) مايكرون ، و في معدل اقطار الجيبانيات (35.84 ± 0.38) مايكرون وعدم وجود فروق معنوية في معدل اقطار الوريد المركزي (17.91 ± 0.18) مايكرون مقارنة بمعدل قطر كل من الخلايا الكبدية (17.92 ± 0.17) مايكرون و الجيبانيات (35.70 ± 0.36) مايكرون و الوريد المركزي (17.92 ± 0.17) مايكرون لمجموعة السيطرة السالبة (G1) بينما كان هناك ارتفاع معنوي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة لمعدل قطر كل من الخلايا الكبدية (30.28 ± 0.42) مايكرون والجيبانيات (74.52 ± 0.26) مايكرون والوريد المركزي (30.28 ± 0.42) مايكرون.

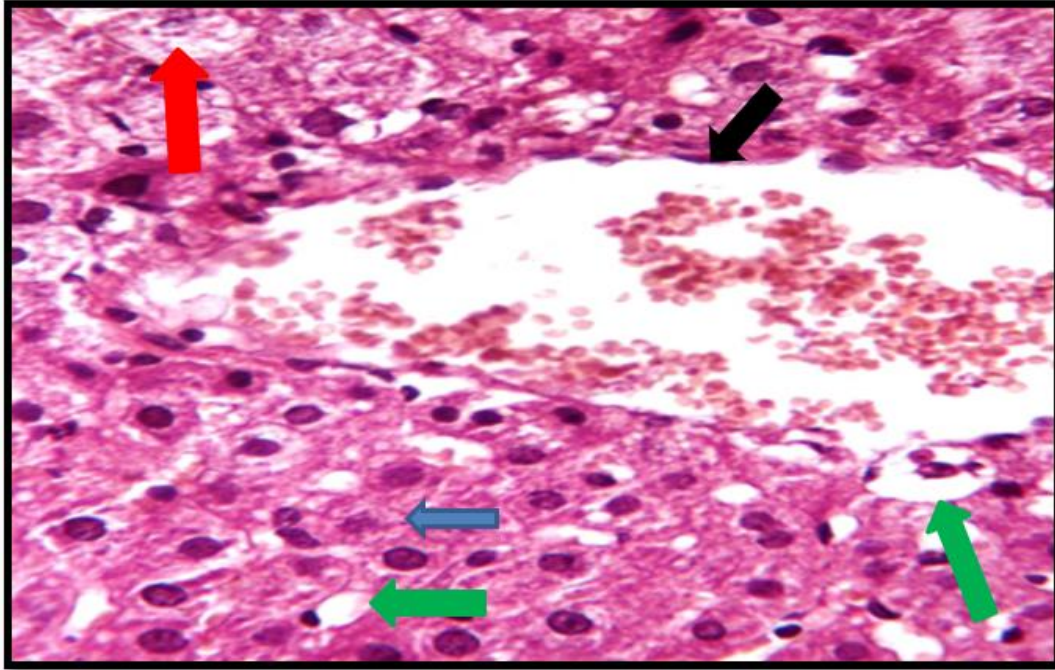
وبينت نتائج دراستنا للقياسات النسيجية في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت بتركيز (400) ملغم / كغم مع بالسيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم جدول رقم (4-2) عن وجود انخفاض معنوي ($p < 0.05$) لمعدل أقطار كل من الخلايا الكبدية (17.67 ± 0.14) مايكرون والجيبانيات (33.97 ± 1.66) مايكرون والوريد المركزي (17.67 ± 0.14) مايكرون مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) بينما لم نجد هناك فرق معنوي في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت بتركيز (400) ملغم / كغم مع بالسيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة .



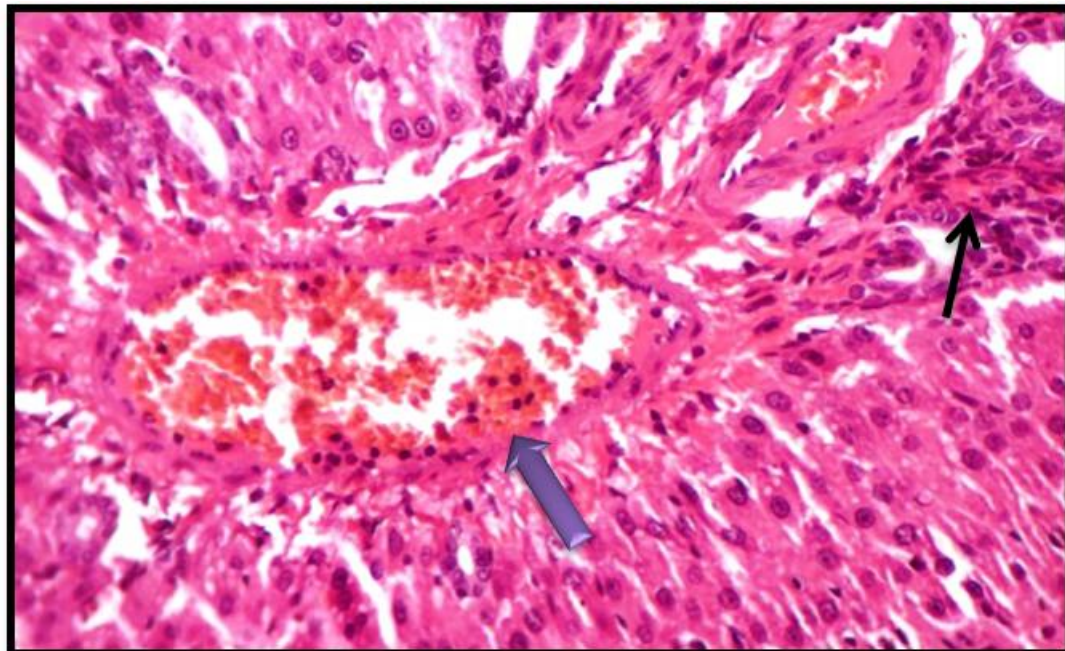
صورة (1-4) مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ لمجموعة السيطرة السالبة يلاحظ وجود الوريد المركزي (←) وانتظام الحبال الكبدية (←) مع وجود الجيباتيات (←) وخلايا الكبد وانويتها (→) (H & E 200X)



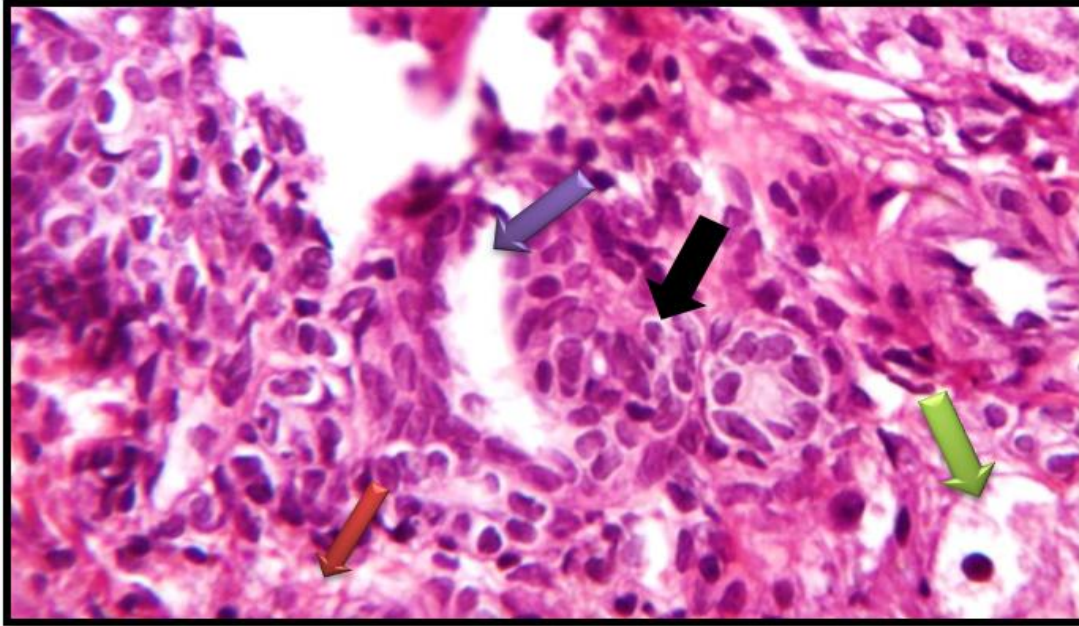
صورة (2-4) :مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ لمجموعة السيطرة السالبة يلاحظ وجود الوريد البابي (←) والشريان الكبدي (←) مع قناة الصفراء (←) (H & E 200X)



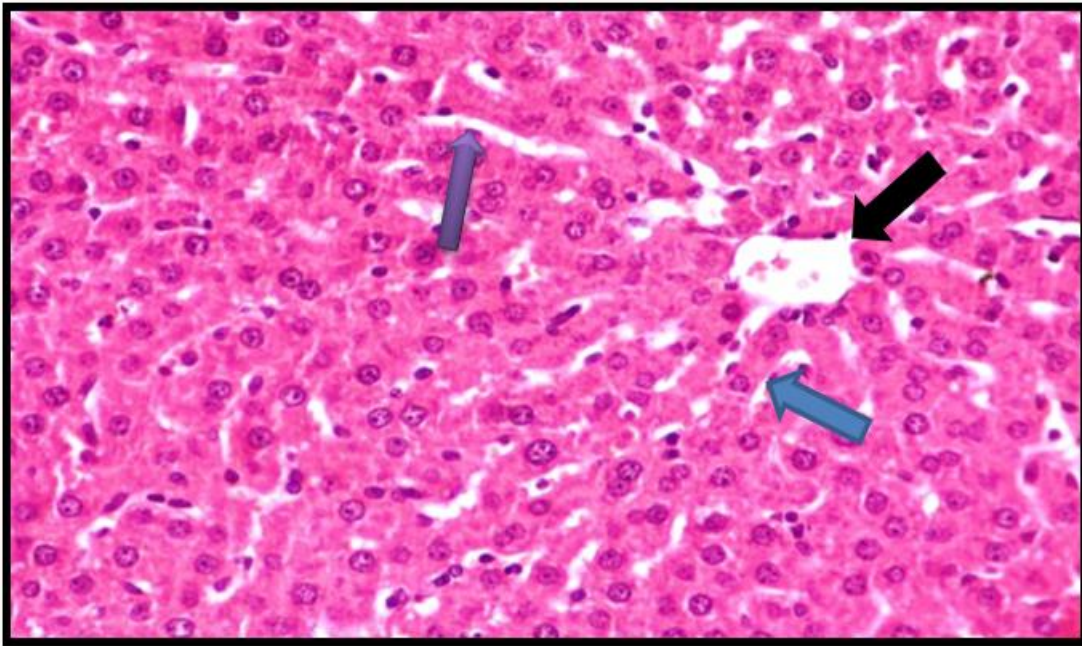
صورة (3-4) مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في لمجموعة المعاملة بالسيكلوسبورين بتركيز 0.2 ملغم / كغم من وزن الجسم يلاحظ فيها احتقان و توسع في الوريد المركزي (←) مع تنكس الخلايا (←) مع عدم انتظام شديد في الحبال الكبدية (←) مع تنخر الخلايا (←) (H & E 200X)



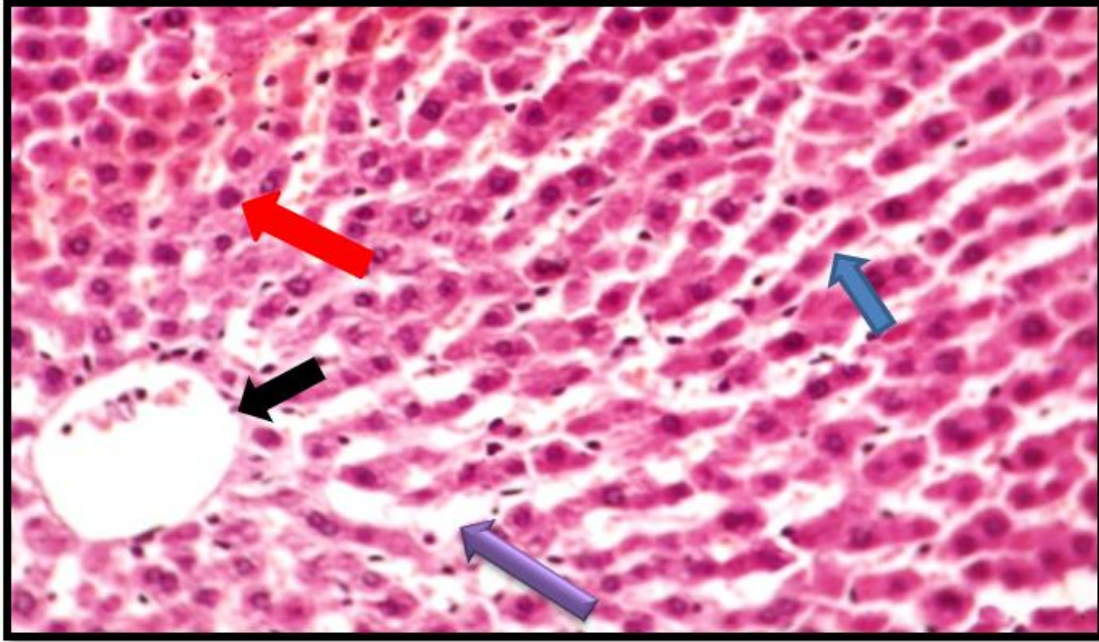
صورة (4-4) مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في لمجموعة المعاملة بالسيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم يلاحظ فيها احتقان و توسع في الوريد البابي (←) وارتشاح خلوي (←) (H & E 200X)



صورة (4- 5) مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في لمجموعة المعاملة بالسايكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم / كغم من وزن الجسم يلاحظ فيها احتقان و ارتشاح خلوي شديد (←) مع تنكس الخلايا (←) مع توسع الجيبانيات (←) مع تنخر الخلايا (←) (H & E 400X)



صورة (4-6) مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لشمار نبات توت العليق بتركيز (400) ملغم / كغم من وزن الجسم يظهر فيها وجود الوريد المركزي الطبيعي (←) انتظام الحبال الكبدية (←) مع وجود الجيبانيات (←) (H&E 200X)



صورة (4-7): مقطع عرضي من نسيج كبد الجرذ في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق بتركيز (400) ملغم / كغم مع بالسكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم يظهر فيها ان النسيج اقرب للطبيعي مع الوريد المركزي الطبيعي (←) وانتظام الحبال الكبدية (←) وخلايا الكبد وانويتها (←) مع توسع بسيط الجيبانيات (←) (H&E 200X) .

جدول (3-4): معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* على معدل أقطار كل من الخلايا الكبدية والجيبانويات الكبدية والوريد المركزي في نسيج الكبد لذكور الجرذان:

المعايير المدروسة المجاميع	أقطار الخلايا الكبدية (مايكروميتر)	أقطار الجيبانويات الكبدية (مايكروميتر)	أقطار الوريد المركزي (مايكروميتر)
السيطرة السالبة (ماء اعتيادي) G1	17.92 ± 0.17 B	35.70± 0.36 B	18.89 ± 0.16 B
السيطرة (الموجبة) عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G2	30.2 ± 0.42 A	74.52±0.26 A	30.28 ± 0.42 A
المستخلص المائي لفاكهة توت <i>Rubus ulmifolius</i> العليق تركيز (400) ملغم/كغم G3	17.91±0.18 B	35.84± 0.38 B	18.88± 0.17 B
المستخلص المائي لفاكهة توت <i>Rubus ulmifolius</i> العليق (400) ملغم/كغم + عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G4	17.67 ± 0.14 B	33.97± 1.66 B	18.65 ± 0.12 B
L.S.D	0.7538	2.5845	1.1109

**الحروف المختلفة عموديا تدل على وجود فروق معنوية * والحروف المتشابهة عموديا تدل على عدم وجود فروق معنوية
(P≤0.05) المتوسط ± الخطأ القياسي
N=6

وجد كلاً من Akbulut وجماعته (2015) و Serrya وجماعته (2021) أن حقن CsA يُسبب توسعاً في الجيوب الكبدية، وتسلاً للخلايا الالتهابية وحيدة النواة، واحتقاناً في الأوردة البابية والمركزية. كما لوحظت آفات مرضية مماثلة في دراسات أخرى بعد علاج الحيوانات بـ CsA .

إن الارتفاع في معدل اقطار الخلايا الكبدية والوريد المركزي والجيبانيات في حيوانات الجرذان التجربة يعود الى التأثير السام لعقار السيكلوسبورين على الخلايا الكبدية عند اعطائها بشكل مستمر مما سبب التهاب خلايا الكبد بسبب الاجهاد التأكسدي الناجم عن توليد الجذور الحرة عن طريق اطلاق السيتوكينات الالتهابية وعلى الرغم من فعالية السيكلوسبورين إلا أن استعماله يسبب العديد من الآثار الجانبية الناتجة من زيادة إنتاج الجذور الحرة، لأن استقلاب السيكلوسبورين بواسطة السيتوكروم CYP450 يؤدي إلى إنتاج الجذور الحرة مباشرة، بالإضافة إلى أنه يمنع من تنفس الميتوكوندريا في الخلايا مما يسبب نقص الأكسجة hypoxia التي تؤدي أيضاً إلى إنتاج الجذور الحرة. وتشمل آليات السمية التي يسببها السيكلوسبورين زيادة إطلاق أنواع الأوكسجين التفاعلية وزيادة تكوين السيتوكينات المسببة للالتهابات وتحريض موت الخلايا المبرمج (Drobnis and Nangia, 2017). وتقليل مستويات مضادات الأكسدة وتحفيز بيروكسيد الدهون، مما يؤدي إلى الاخلال في التوازن التأكسدي (Akoo1, 2015) عندما تزداد المواد المؤكسدة تنخفض مستويات مضادات الأكسدة، وهي حالة من الإجهاد التأكسدي ناتجة عن عدم التوازن بين ROS والقدرة الحيوية للجسم لإزالة السموم من المواد الوسيطة التفاعلية التي تسبب تلف الأنسجة (Valko et al., 2007).

وفي دراسة أجريت على ذكور الجرذان التي حقنت بعقار CSA قد يعود السبب في الضرر الحاصل في النسيج إلى الزيادة في أنواع الأوكسجين التفاعلية وتقليل مستويات مضادات الأكسدة الناتجة بفعل عقار CSA مما يؤدي إلى الإخلال في التوازن التأكسدي داخل الخلية، ويمكن أن يؤدي المستوى العالي من الإجهاد التأكسدي إلى تلف الحمض النووي والبروتينات، إذ يثبط CSA تخليق الحمض النووي وتؤثر الجذور الحرة على تنظيم مسارات الإشارات في الخلية. (Lai et al., 2017) فتهاجم الجذور الحرة الأحماض النووية، وعندما تخترق حواجز الغشاء يتسبب بتلفه والاخلال بنشاطه الخلوي وتدخل الى نواة الخلية التي قد تسبب طفرات جينية وموت الخلايا الناجم عن تحطيم DNA والدهون، كذلك تؤدي إلى خلل وظيفي في الإنزيمات وتكوين البروتينات (Singh et al., 2004) .

لاحظ Nair وجماعته (2002) أنه بسبب انحلال الخلايا ونخرها الذي أظهرته المقاطع النسيجية المرضية نتيجة لتأثير الإجهاد التأكسدي، فإن الإجهاد التأكسدي هو الآلية الرئيسية لتلف الأنسجة في الأعضاء.

كما أوضح Mazzaferro وجماعته (1990) ان الاجهاد التاكسدي يرتبط عادةً بتلف الحمض النووي التأكسدي وزيادة محتوى Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate ، وأن تراكم أنواع الأكسجين التفاعلية في الأعضاء قد يؤدي إلى تلف الحمض النووي مصحوبًا بزيادة مستويات-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine في الأنسجة. في حين أن تأثير أنواع الأكسجين التفاعلية على وظائف الميتوكوندريا وتنشيط نشاط إنزيمات ATPase ، بوساطة ROS ، قد يُسبب انكماشًا خلويًا ثانويًا (Son et al., 2010). وهذا قد يُفسر التناقص الذي يحدث في الخلايا .

في حين يعزى التأثير الإيجابي لنبات توت العليق *Rubus ulmifolius* إلى محتواه الغني بالمواد الكيميائية المفيدة مثل العفص، والفلافونويد، والأنثوسيانين، والأحماض الفينولية الشائعة في أنواع الروبوس. تساهم هذه المركبات في خصائصه المضادة للميكروبات، والحساسية، وفرط سكر الدم (Abdelhameed et al., 2025).

يرتبط النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات في نبات توت العليق *Rubus ulmifolius* بعدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل. تمنع هذه المركبات الأكسدة وتحمي الخلايا من خلال منح ذرات الهيدروجين للأنواع المتفاعلة من الجذور الحرة، أن آلية عمل مركبات الفلافونويد كمضادات للأكسدة يمكن أن تكون مباشرة أو غير مباشرة الآلية المباشرة هي التبرع بأيونات الهيدروجين لتحديد الآثار السامة للجذور الحرة. كمضادات للأكسدة، ويمكن أن تعمل بشكل غير مباشر عن طريق زيادة التعبير الجيني المضاد للأكسدة الذاتية (Espada-Bellido et al., 2019).

أظهرت دراسة Ruiz-Rodríguez وجماعته (2014) الإمكانيات العلاجية للمركب النشط في توت العليق *Rubus ulmifolius* وحماية الأنسجة من خلال خفض مستويات MDA وزيادة مستويات SOD و GSH (kareem and obeid, 2020; Majeed et al., 2023).

يُعد نبات توت العليق *Rubus ulmifolius* من ثمار الجيل الثالث الشائعة في أوروبا. هذه الثمار غنية بالسكريات والدهون وفيتاميني C و E وحمض الإيلاجيك والفلافون والأنثوسيانين، وغيرها. علاوة على ذلك، تتميز هذه الثمار بخصائص مضادة للبكتيريا والالتهابات ومضادات الأكسدة والشيخوخة (Goodman et al., 2021)، يُعد حمض الفيروليك، المكون الرئيسي لمضادات الأكسدة الحرة، العنصر الرابط الرئيسي الذي يُعزز قدرة التوت الأسود المضادة للأكسدة (Huang et al., 2022).

وجاءت النتائج الحالية متفقة مع دراسة Espada-Bellido *et al.*, (2019) والتي جرعت فيها الجرذان بالمستخلص الكحولي لنبات التوت اذا ظهرت الخلايا الكبدية طبيعية مع عدم وجود أي تغيرات نسجية مرضية وهذا يدل على ان يحمي من الجذور الحرة بالنظر إلى احتوائه على العديد من مضادات الاكسدة اذ انه ليس له اي تأثير سام على الأنسجة بسبب الخصائص المضادة للأكسدة للمستخلص نفسه التي تحسن أيضاً بشكل مباشر المظهر النسيجي للكبد عن طريق القدرة على إزالة الجذور الحرة بسبب احتوائها على المركبات -9,12 Octadecadienoic acid و Hexadecanoic acid, cyclohexyl ester و Methyl trans- و 2-Chloroethyl linoleate و 9-octadecenoate و 4,4-Dimethylcyclohexene و 2- و 1,3-Dioxolane, 2-phenyl و Pentanedinitrile, 2-methyl و Ethylimidazole و 2- Amino-2-oxoethyl acetate .

2.3.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في نسيج الكلية وقياسات معدل أقطار الكبيبة والنيبيب الملثوي الداني والقاصي لجرذان الجرذان:

بينت نتائج الدراسة الحالية النسيجية المبينة في الصورة (4-8) التركيب النسيجي الطبيعي لكلية الجرذان الذي يعود لمجموعة السيطرة السالبة، إذ يلاحظ وجود الكبيبة الطبيعية ومحفظة بومان مع النيبيب الملثوي الداني والنيبيب القاصي وفسحة بومان.

واما نتائج الفحوصات النسيجية لكلية في المجموعة الموجبة المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم وقد تمثلت بوجود ضمور كببيي، وزيادة في فسحة بومان، وتحطم جدران الأنابيب البولية، مع احتقان الأوعية الدموية بين الأنابيب الكلوية، ونزيف بين الأنابيب الكلوية مع تساقط الظهارة المبطنة، وظهور ارتشاح شديد للخلايا الالتهابية وتنكس خلايا النبيبات البولية وتنخر بطانة الأنابيب، صورة (4-9) و (4-10) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة G1.

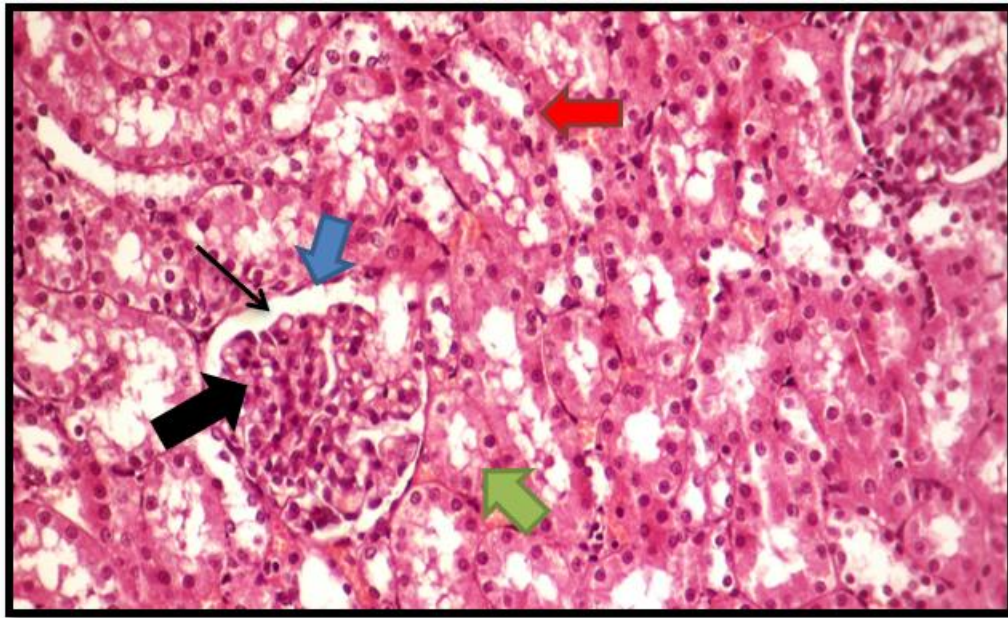
بينما اظهرت نتائج الدراسة الحالية للقياسات النسيجية لمجموعة عقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم / كغم من وزن الجسم (السيطرة الموجبة) (G2) جدول (4-4) إلى وجود انخفاض معنوي ($P \leq 0.05$) لمعدل اقطار كل من الكبيبة (53.46 ± 0.24) مايكرون والنيبيب الملثوي القاصي (20.23 ± 0.04) مايكرون والنيبيب الملثوي الداني (32.63 ± 0.23) مايكرون ، مقارنة بمعدل اقطار

كل من الكبيبة (84.08 ± 0.33) ، النبيب الملتوي الداني (46.03 ± 0.14) ، والنبيب الملتوي القاصي (32.78 ± 0.18) لمجموعة السيطرة السالبة (G1). وهذا يشير إلى حدوث ضرر في غشاء الخلايا الكلوية الناتج عن الضرر الحاصل بسبب إعطاء العقار.

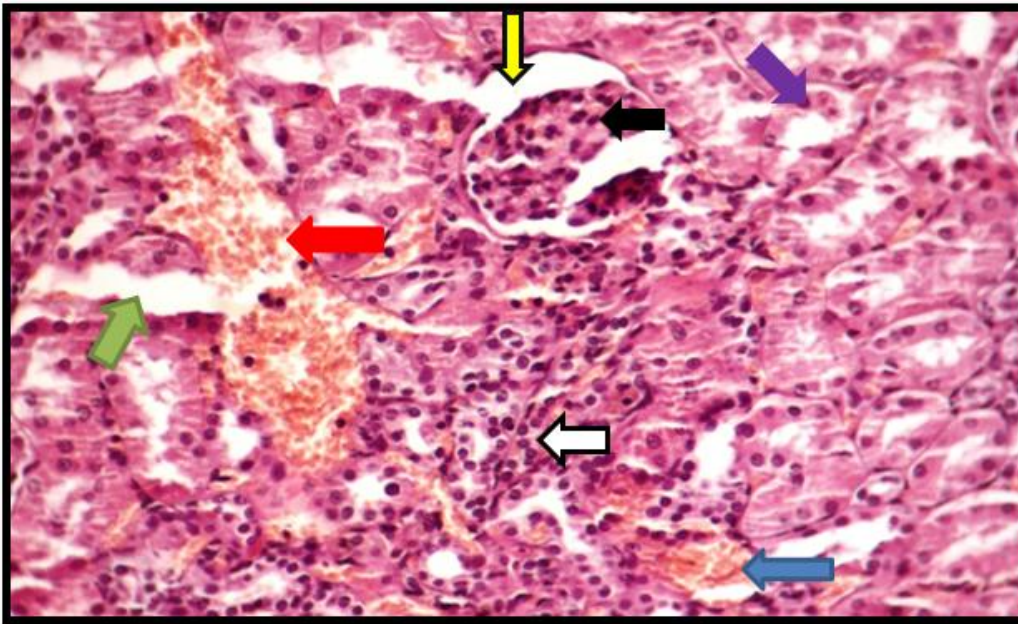
أوضحت نتائج الفحص النسيجي في دراستنا الحالية في صورة (4-11) الثالثة مجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم التركيب الطبيعي للنسيج و النبيب الملتوي الداني و النبيب الملتوي القاصي و محفظه بومان في حين لوحظ في صورة (4-12) لمقطع نسيج الطبيعي الكلية المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم مع عقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم أن الكبيبة والأنسجة أقرب إلى الوضع الطبيعي ووجود محفظة بومان وفسحة بومان مع التركيب الطبيعي للأنابيب البولية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 .

واظهرت نتائج الدراسة الحالية القياسات النسيجية في مجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم جدول (4-4) عدم وجود فروق معنوية في معدل اقطار الكبيبة (84.13 ± 0.15) مايكرون و معدل اقطار النبيب الملتوي القاصي (32.68 ± 0.20) مايكرون ومعدل اقطار النبيب الملتوي الداني (45.93 ± 0.22) مايكرون مقارنة بمعدل اقطار كل من الكبيبة (84.08 ± 0.33) ، النبيب الملتوي الداني (46.03 ± 0.14) ، والنبيب الملتوي القاصي (32.78 ± 0.18) لمجموعة السيطرة السالبة G1.

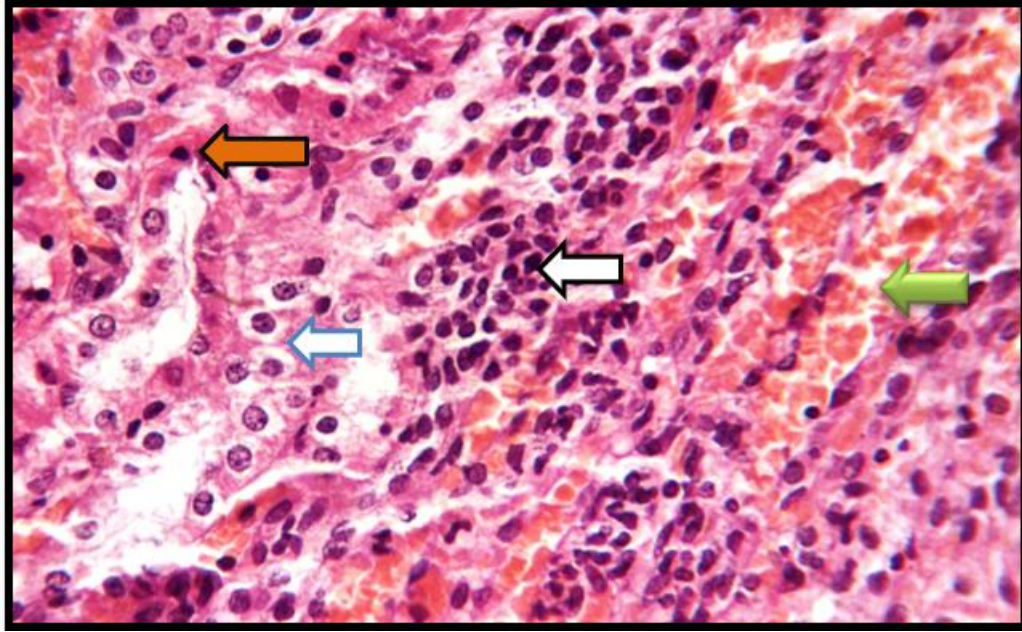
وبينت نتائج القياسات النسيجية للكلية في ذكور الجرذان في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز 400 ملغم /كغم وعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم جدول (4-4) وجود ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) في معدل اقطار كل من الكبيبة (83.70 ± 0.27) مايكرون والنبيب الملتوي القاصي (32.60 ± 0.22) مايكرون النبيب الملتوي الداني (45.90 ± 0.41) مايكرون مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة (G2) في اقطار كل من الكبيبة (53.46 ± 0.24) مايكرون والنبيب الملتوي القاصي (20.23 ± 0.04) مايكرون والنبيب الملتوي الداني (32.63 ± 0.23) مايكرون.



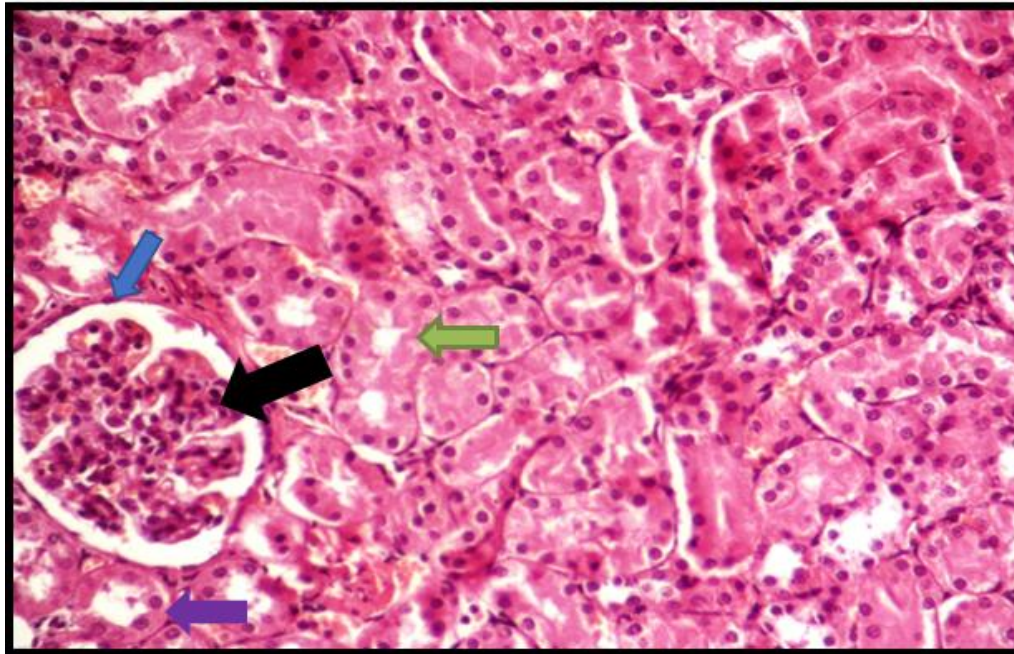
صورة (4-8) مقطع عرضي من نسيج كلية جرذ لمجموعة السيطرة السالبة يلاحظ وجود الكبيبة الطبيعية () و محفظة بومان () مع النبيب الملتنوي الداني () و النبيب القاصي () و فسحة بومان () (H & E 200 X).



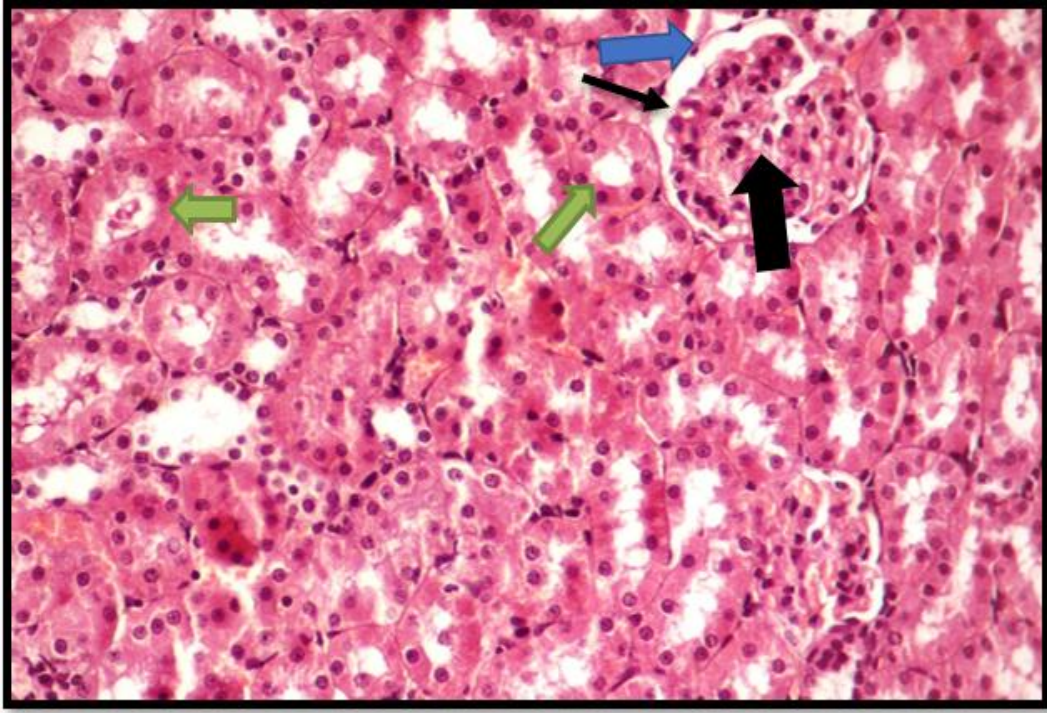
صورة (4-9) مقطع عرضي من نسيج كلية جرذ في المجموعة المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم / كغم من وزن الجسم يظهر فيها ضمور الكبيبة () وزيادة وفسحة بومان () وتحطم في جدران النيبات البولية () مع وجود احتقان الاوعية الدموية بين النيبات الكلوية () ونزف بين النيبات الكلوية () وانسلاخ ظهارتها المبطنة () وارتشاح الخلايا الالتهابية () (H & E Stain 200X).



صورة (4-10) مقطع عرضي من نسيج كلية جرذ في المجموعة المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/ كغم من وزن الجسم يظهر فيها ارتشاح شديد للخلايا الالتهابية (←) مع وجود نزف بين النبيبات الكلوية (←) مع تنكس خلايا النبيبات البولية (←) و تنخر في بطانة النبيبات (H ←) & E Stain 400 X)



صورة (8-11) مقطع عرضي من نسيج الكلية في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لشمار نبات توت العليق بتركيز (400) ملغم / كغم من وزن الجسم يلاحظ فيها التركيب الطبيعي للكبيبة (←) والنبيب الداني (←) و النبيب القاص (←) مع محفظة بومان (←) (H & E 200 X).



صورة (4-12) مقطع عرضي من نسيج كلية الجرذ في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت /العليق بتركيز (400)ملغم /كغم مع عقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم / كغم من وزن الجسم من وزن الجسم يلاحظ الكبيبة والنسيج اقرب للطبيعي (←) ووجود محفظة بومان (←) وفسحة بومان (←) مع البنية الطبيعية للنبيبات البولية (←) (H & E Stain 200X) .

جدول (4-4) معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* على معدل اقطار كل من الكبيبة والنبيب الملتوي الداني والنبيب الملتوي القاصي في نسيج الكلية لذكور الجرذان:

المعايير المدروسة المجاميع	اقطار الكبيبة (مايكروميتر)	اقطار النبيب الملتوي القاصي (مايكروميتر)	اقطار النبيب الملتوي الداني (مايكروميتر)
السيطرة السالبة (ماء اعتيادي) G1	84.08± 0.33 A	32.78± 0.18 A	46.03± 0.14 A
السيطرة (الموجبة) عقار السيكلوسبورين (0.2) (ملغم/كغم) G2	53.46±0.24 B	20.23±0.04 B	32.63± 0.23 B
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> تركيز (400) ملغم/كغم G3	84.13± 0.15 A	32.68± 0.20 A	45.93± 0.22 A
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> (400) ملغم /كغم + عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G4	83.70± 0.27 A	32.60± 0.22 A	45.90± 0.41 A
L.S.D	0.7747	0.5311	0.807

**الحروف المختلفة عموديا تدل على وجود فروق معنوية
*والحروف المتشابهة عموديا تدل على عدم وجود فروق معنوية
(P≤0.05) المتوسط ± الخطأ القياسي
N=6

قد يعود سبب هذه التغيرات التي حصلت الى الاثار الجانبية الناتجة عن عقار السيكلوسبورين والذي يقوم بزيادة تشكيل الجذور الحرة، اكسدة الدهون ، اكسدة البروتينات و زيادة مستويات بيروكسيد الهيدروجين وبالتالي تحطم الاغشية الخلوية للنبيبات البولية والكبيبات (Valko *et al.*, 2007 ; Akoo1, 2015).

كما تتفق هذه الدراسة فيما يتعلق بتأثير السيكلوسبورين على مستوى الفحوصات النسجية مع (Gruev *et al.*, (2003) Colombo *et al.*, (2013); Khudiar and Hussein, (2017).

يؤدي علاج السيكلوسبورين الى انحلال وظائف الكلى إلى جانب التغيرات المرضية الكلوية وارتفاع ضغط الدم الجهازى، يمكن أن يؤدي هذا التأثير الضار إلى الفشل الكلوي المزمن وحتى الفشل الكلوي في مرحلته النهائية. ، يرتبط استخدام السيكلوسبورين بسمية كلوية كبيرة، ومن المحتمل جداً أن تكون نتيجة لتأثيره السام على بطانة الأوعية الدموية، وهو موثق باستمرار في الحيوانات التجريبية تتوفر الآن أدلة على أن كل جرعة فموية CsA يؤدي الى انخفاض مؤقت في تدفق البلازما الكلوية ومعدل الترشيح الكبيبي، نتيجةً لنوع من نقص التروية الكلوية الحاد القابل للعكس (Gruev *et al.*, 2003). أدى علاج الفئران بـ CsA إلى أكسدة الدهون في الطحال، كما يتضح من زيادة الناتج الثانوي لأكسدة الدهون

(Trull *et al.*, 2002)

ان عقار السيكلوسبورين له القدرة على احداث تغيرات كلوية تعزى هذه التغيرات الى الاجهاد التأكسدي وحدوث الالتهاب مما يؤدي الى تحطم الكبيبات وضمور الكبيبات واختلال وظائف الكلية (Barbarino *et al.*, 2013). وأن الآثار الجانبية لعقار CsA عادةً ما تكون مصحوبة بتغيرات نسجية مرضية في أعضاء مختلفة من الجسم مثل الكبد والكليتين والقلب (Freitas *et al.*, 2013) وأنسجة الخصية والبروستات (Rezzani, 2004).

يُعد تنشيط إجهاد الشبكة الإندوبلازمية آلية أخرى أجريت عليها أبحاث مؤخراً، ويمكن أن يمارس CsA من خلالها تأثيره السام للكلية (Yilmaz *et al.*, 2022).

يتمتع مستخلص فاكهة توت العليق بالقدرة على تخفيف السمية الكلوية لعقار السيكلوسبورين ، يُعزى هذا إلى نشاط مضادات الأكسدة لفاكهة التوت عن طريق منع تكوين الجذور الحرة أو منع الاجهاد التأكسدي أو إصلاح الجزيئات الحيوية التالفة تأكسدياً اذ تؤدي العمليات التي تولد الجذور الحرة في تطوير أمراض مختلفة مثل أمراض الكلى وأمراض القلب والالتهابات ومرض السكري، تمتاز النباتات الطبية باحتوائها على مكونات فعالة يختلف كل منها في تركيبته وتأثيراته البيولوجية ، تعود الآثار العلاجية والوقائية

للمستخلصات النباتية إلى حقيقة أنها تحتوي على مركبات ذات خصائص مفيدة مثل مضادات الأكسدة ، يرتبط النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات في نبات توت العليق بعدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل. تمنع هذه المركبات الأكسدة وتحمي الخلايا من خلال منح ذرات الهيدروجين للأنواع المتفاعلة من الجذور الحرة (Espada-Bellido et al., 2019). وجاءت نتائج الدراسة الحالية متفقه مع Ruiz-Rodríguez وجماعته (2014) حيث اثبتت الامكانية العلاجية للمركب النشط في التوت وحماية الأنسجة من خلال خفض مستويات MDA وزيادة مستويات SOD و GSH (Majeed et al., 2023).

ويرجع السبب في هذه النتائج إلى احتواء هذه الفاكهة على مجموعة متنوعة من المواد الكيميائية النباتية ، بما في ذلك البروتينات ، والكربوهيدرات ، والسابونين ، والفليويدات ، والفلافونويدات ، والفينولات ، والجليكوسيدات فضلا عن احتوائها على مجموعة متنوعة من الفيتامينات و المعادن ، بالإضافة الى ما شخصته نتائج الكشف باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز-مطياف الكتلة (GC-MS) التي اجريت في الدراسة الحالية قد يكون لهذه المركبات التي تعمل كمضادات للأكسدة ، ومثبطات بيروكسيد الدهون ، ولديها القدرة على البحث عن الجذور الحرة خصائص وقائية للكبد والكلية، كما ذكرنا سابقاً ، تمتلك مستخلصات فاكهة توت العليق مستويات عالية من مضادات الأكسدة الانزيمية (Abdelhameed et al., 2025).

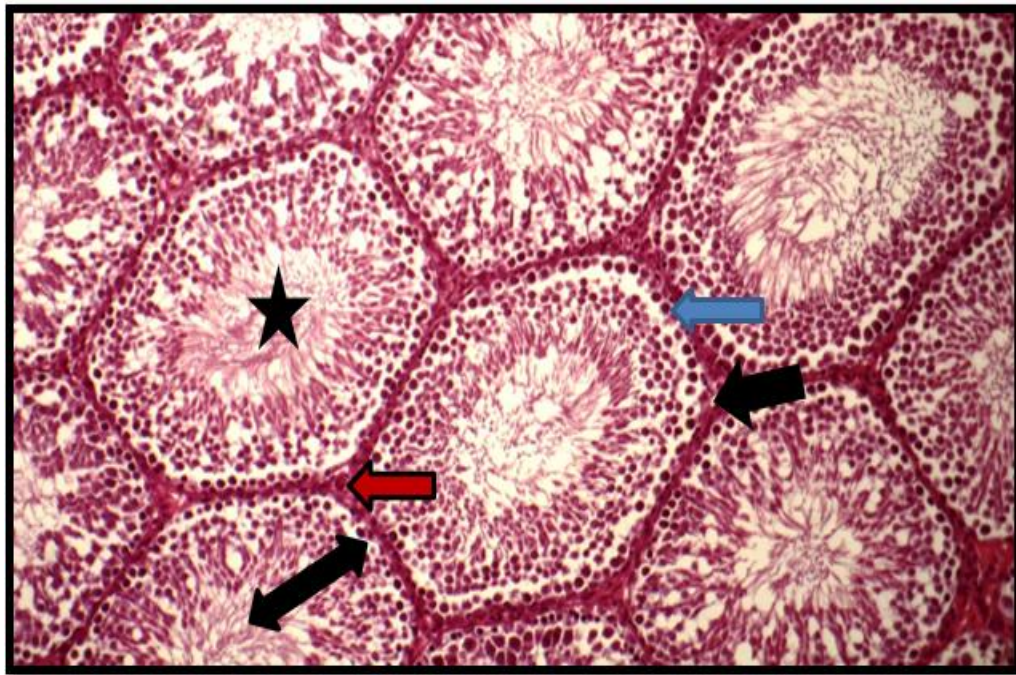
3.3.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في نسيج الخصية لذكور الجرذان:

اظهرت نتائج الدراسة الحالية النسيجية المبينة في الصورة (4-13) في مجموعة السيطرة السالبة التركيب النسيجي الطبيعي لخصية الجرذان إذ يلاحظ وجود نسيج طبيعي للخصية مع النبيبات المنوية وتجاويفها ممتلئة بالنطف مع خلايا لايدك في النسيج البيني وطبقة الخلايا الظهارية الجرثومية وسليفات النطف.

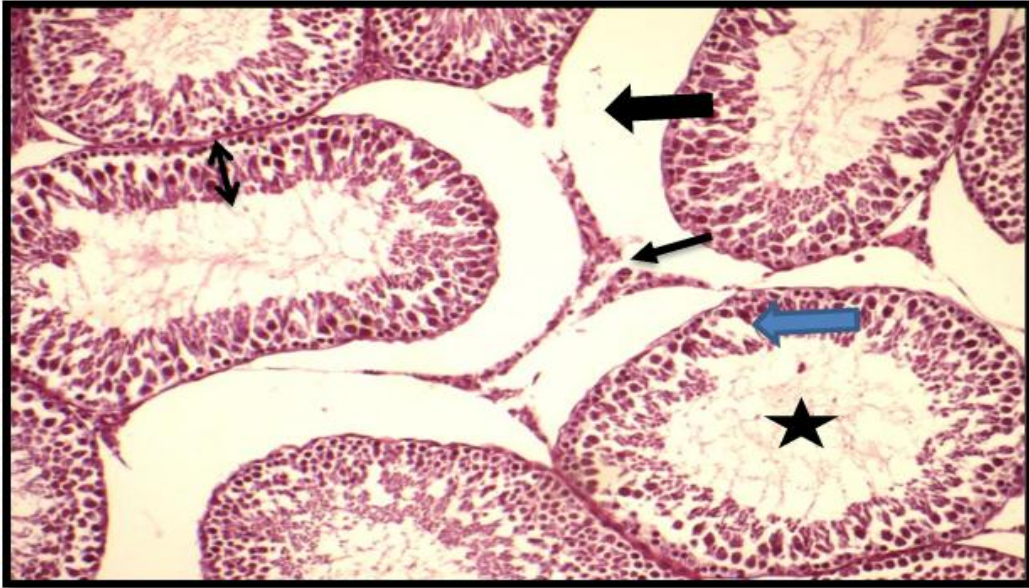
في حين أظهرت نتائج الفحص النسيجي للخصية في الجرذان المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز 0.2 ملغم/كغم من وزن الجسم الى وجود مسافات بينية بين النبيبات المنوية والنطف قليلة في تجاويف النبيبات مع اختزال النسيج البيني وتفككه وقلة خلايا لايدك وانخفاض حجم طبقة الخلايا الظهارية الجرثومية تنكس الطبقة الجرثومية وتفكك خلاياها، صورة (4-14).

كما يظهر في أنسجة الخصى في المجموعة الثالثة مجموعة المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز 400 ملغم/كغم من وزن الجسم في صورة (4-15) يظهر فيه تركيب الخصية الطبيعي مع النبيلات المنوية والتجاويف ممتلئة بالنطف ووجود خلايا لايدك في النسيج البيني غير المفكك.

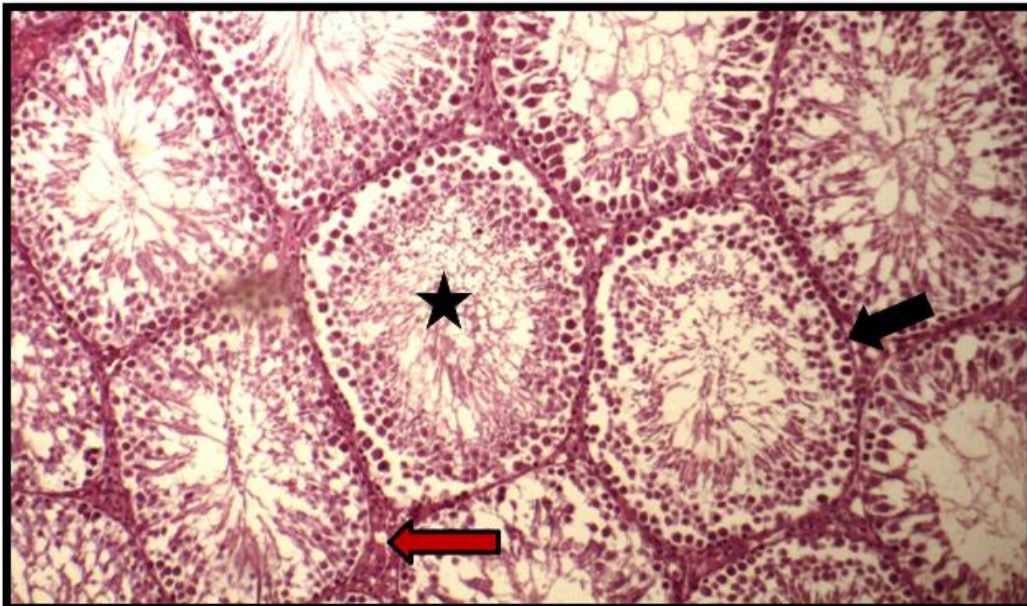
اما المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز 400 ملغم/كغم من وزن الجسم مع عقار السيكلوسبورين بتركيز 0.2 ملغم/كغم من وزن الجسم صورة (4-16) يظهر فيها الخلايا المولدة للحيوانات المنوية داخل النبيلات المنوية وتجاويفها ممتلئة بالنطف مع وجود خلايا لايدك في النسيج البيني وزيادة عدد طبقات الخلايا الظهارية الجرثومية المكونة للنطف بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2.



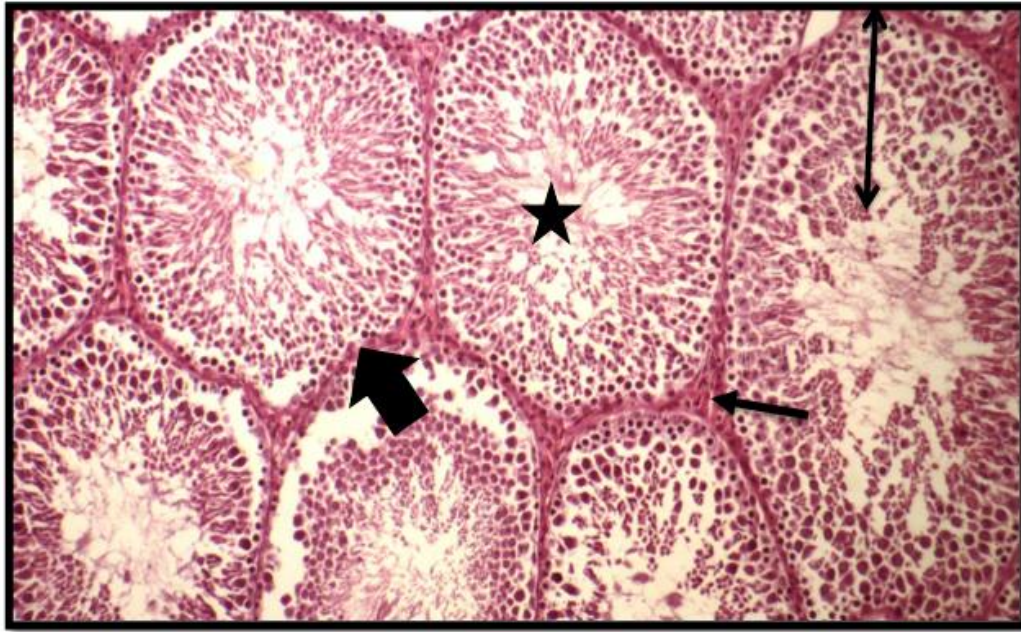
صورة (4-13): مقطع نسجي مستعرض في خصية جرد من مجموعة السيطرة لوحظ فيه نسيج طبيعي للخصية مع النبيلات المنوية (↔) وتجاويفها ممتلئة بالنطف (★) مع خلايا لايدك في النسيج البيني (↔) وطبقة الخلايا الظهارية الجرثومية (↔) وسليقات النطف (↔) (ملون H & E) وقوة تكبير (100x).



صورة (4-14) مقطع نسجي مستعرض في خصية جرد في المجموعة المعاملة بالسيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم لوحظ فيها وجود مسافات بينية بين النبيبات المنوية (↔) والنطف قليلة في تجاويف النبيبات (★) مع اختزال النسيج البيني وتفككه وقلة خلايا لايدك (↔) وانخفاض حجم طبقة الخلايا الظهارية الجرثومية (↔) تنكس الطبقة الجرثومية وتفكك خلاياها (↔) (ملون H&E وقوة تكبير 100X)



صورة (4-15) مقطع نسجي مستعرض في خصى جرد في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق بتركيز (400) ملغم /كغم من وزن الجسم يظهر فيه تركيب الخصية الطبيعي مع النبيبات المنوية (↔) والتجاويف ممتلئة بالنطف (★) ووجود خلايا لايدك في النسيج البيني غير المفكك (↔) (ملون H&E وقوة التكبير 100X).



صورة (4-16) مقطع نسجي مستعرض في خصى جرد في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق بتركيز (400) ملغم / كغم مع عقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم / كغم من وزن الجسم يظهر فيه الخلايا المولدة للحيوانات المنوية داخل النيبات المنوية (↔) وتجاويفها ممتلئة بالنطف (★) مع وجود خلايا لايدك في النسيج البيني (←) وزيادة عدد طبقات الخلايا الظهارية الجرثومية المكونة للنطف (↔) (H&E ملون وقوة التكبير 100 X).

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة مع (Baykalir ., 2016 ; Abdelkader et al., 2021) ;
(Kant et al., 2009 et al).

يمكن أن يؤثر CSA على الجهاز التناسلي الذكري بطريقة معقدة، وقد يسبب العقم عند الذكور والإناث عندما يتم استخدامه مدة طويلة (أكثر من 3 أشهر) (Kant et al., 2009). كما ويسبب سمية تكاثرية، فيتداخل مع تكوين الحيوانات المنوية مما يؤدي إلى خلل في التكاثر وبالتالي عقم الذكور (2016 Baykalir et al.,). ويضعف CsA وظيفة الخصية ويقلل من مستوى هرمون التستوستيرون وعدد الحيوانات المنوية، مما يؤدي إلى انخفاض الخصوبة (Seethalakshmi et al., 1990a).

وتشمل آليات سمية الخصية التي يسببها السيكلوسبورين زيادة إطلاق أنواع الأوكسجين التفاعلية وزيادة تكوين السيتوكينات المسببة للالتهابات وتحريض موت الخلايا المبرمج في الخلايا المولدة للحيوانات المنوية، وقد تؤدي هذه التأثيرات إلى أحداث سامة خطيرة في الغدد التناسلية والتي تؤثر بشكل كبير على خصوبة الذكور (Drobnis and Nangia, 2017).

كما اكتسب تأثير CSA على الخصوبة أهمية أكبر مع زيادة عمليات زرع الأعضاء الناجحة التي يتم إجراؤها في جميع أنحاء العالم (Najafi et al., 2016). لأن السايكلوسبورين يسبب سمية في الخصية، مما قد يؤدي إلى العقم عند الذكور، كما أنه مسؤول عن ضعف تكوين الحيوانات المنوية وتلف الجهاز التناسلي الذكري لدى المتلقين، لذلك تم التوجيه إلى استعمال مضادات الأكسدة لمواجهة هذه السمية التناسلية (Abdelkader et al., 2021). فقد أشارت نتائج البحوث والدراسات إلى أن CsA ضمن الجرعة العلاجية على الجرذان الذكور كان له تأثير سلبي على معايير السائل المنوي، وكانت هناك دراسات لتحديد العوامل الدوائية الجديدة القادرة على التخفيف من تلف الخصية الناجم عن CsA وتحسين القدرة الإنجابية للذكور (Pan et al., 2018; Khattab and Mansoury, 2020).

وأن الآثار الجانبية لعقار CsA عادةً ما تكون مصحوبة بتغيرات نسجية مرضية في أعضاء مختلفة من الجسم مثل الكبد والكليتين والقلب (Freitas et al., 2013) وأنسجة الخصية والبروستات (Rezzani, 2004).

يزيد CsA من إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS وتقليل مستويات مضادات الأكسدة وتحفيز بيروكسيد الدهون، مما يؤدي إلى الاختلال في التوازن التأكسدي وموت الخلايا المبرمج (Akoo1, 2015). يكون للجهاز التناسلي الذكري في الحالة الطبيعية توازن بين إنتاج ROS ونشاط مضادات الأكسدة. لكن الإفراط في إنتاج ROS في السائل المنوي يمكن أن يؤثر على آليات الدفاع المضادة للأكسدة في الحيوانات المنوية أو البلازما المنوية ويسبب الإجهاد التأكسدي (Safarnavadeh and Rastegarpanah, 2011).

اتفقت الدراسة الحالية مع دراسة He وجماعته (2013) عند دراستهم على ذكور الجرذان إذ لاحظوا أن الجرعات العلاجية من CSA أضرت بوظيفة الخصية وخفضت مستويات هرمون التستوستيرون، مما أدى إلى ضمور في الأنسجة وتقليل قطر النبيبات المنوية. ويؤدي الانخفاض غير الطبيعي في مستويات هذا الهرمون في المصل إلى انخفاض في ارتفاع الظهارة الجرثومية وقطر النبيبات المنوية (Sukhorum and Iamsaard, 2017). فقد ارتبطت التغيرات التنكسية في الخصية وضمور خلايا لايدك وانخفاض أقطار النبيبات المنوية وصغر التجويف للجرذان بالاضطراب في إنتاج هرمون التستوستيرون (Nair et al., 1995). كما ذكر Jana وجماعته (2006) أن نقص هرمون التستوستيرون

في الجرذان أدى إلى انخفاض في قطر النبيتات ناقلة المني لأنه مسؤول عن الترتيب الخلوي في النبيتات المنوية، التي بدت وكأنها منفصلة بعد التعرض لـ CSA.

اتفقت نتائج الدراسة مع الدراسات سابقة (Monteiro *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013;) (Lin *et al* 2019). التي تسببت جرعات CsA بعد 8 أسابيع بحدوث تغيرات مرضية وتلف في أنسجة الخصية.

أن الإجهاد التأكسدي الناجم عن السيكلوسبورين يؤدي إلى أضرار هيكلية ووظيفية في أنسجة الخصية (Zeinab *et al.*, 2014). فقد أوضح Chipuk وجماعته (2010) أن الأضرار التي لوحظت في التركيب النسيجي للخصية يتم من خلال التأثير المباشر لـ CSA الذي يؤدي إلى ضعف تكوين ونضج الحيوانات المنوية، أو غير المباشر من خلال تحفيز بيروكسيد الدهون وهو آلية كيميائية قادرة على تعطيل بنية ووظيفة الخصية. فتؤثر الجذور الحرة على أكسدة البروتين الخلوي وعلى غشاء الخلية، وتعزز من إطلاق انزيمات Lysosomal في العصارة الخلوية التي تكون مرتبطة بالغشاء مما يسبب في تفتيته .

أظهرت الدراسة الكيميائية النسيجية للباحث Abdul-Hamid وجماعته (2016) أن CsA تسبب في انخفاض محتوى البروتين في أنسجة الخصية، مما أدى إلى ضمور في النبيتات المنوية. إما التفجى الذي حصل فهو نتيجة تنكس الخلايا الجرثومية غير الطبيعية فتسبب بذلك وجود مسافات كبيرة بين خلايا سرتولي المجاورة (Virtanen *et al.*, 2005). وقد ذكر Alazouny وجماعته (2014) إن ROS المتولدة بفعل CSA تبدأ تفاعلات الفسفرة المؤكسدة لأغشية الخلايا وتعطل مجموعات الكاديرين/الكاتينين Cadherin/Catenin الموجودة بين خلايا سرتولي والخلايا الجرثومية في خصية الجرذان، مما يؤدي إلى تعطيل مجمع الوصلات بين هذه الخلايا وزيادة المسافات بين خلايا سرتولي، وإن هذه المجمعات هي الوحدة الوظيفية للوصلات الملتصقة بالخلايا الخلوية القائمة على الأكتين كبروتين رابط في الظهارة المتعددة، التي يتم تنظيمها بواسطة هرمون التستوستيرون (Lee *et al.*, 2003).

إن انخفاض سمك الظهارة الجرثومية هو أحد أسباب انخفاض إنتاج الحيوانات المنوية، الذي يؤدي إلى قلة النطاف Oligospermia أو فقد النطاف Azospermia في التجويف. ويمكن أيضاً تفسير موت الخلايا المبرمج وقلة النطف في النبيتات المنوية من خلال انخفاض مستويات التستوستيرون، الضروري للحفاظ على تكوين الحيوانات المنوية بشكل طبيعي ولمنع موت الخلايا المبرمج للخلايا الجرثومية في الجرذان (Aitken, 2009)

وقد ثبت أن مستخلصات التوت تمارس أنشطة مضادة للالتهابات ومضادات الأكسدة ومضادة للسرطان ومضادة للميكروبات (Abu Bakar *et al.*, 2016).

تشتهر أنواع فاكهة توت العليق بخصائصها المضادة للأكسدة بسبب وجود مركبات نشطة بيولوجيًا، بما في ذلك الفلافونيدات، القلويدات، الستيرتولات والفينولات ونانيت الجلوكوز والألاميدات والأحماض الدهنية. تم استعمال هذه المركبات لعلاج مشاكل الخصوبة ويساهم في تعزيز الخصوبة الجنسية (Schulz *et al.*, 2015).

تحتوي فاكهة توت العليق على المركبات الكيميائية الفعالة مثل الفينولات والفلافونيدات وبعض المركبات المهمة ذات التأثير القوي والفعال كما تعمل على تثبيط تفاعلات تكوين الجذور الحرة التي يسببها عقار CsA لكونها مركبات فعالة لها القابلية على منح الهيدروجين لهذه الجذور، وتعمل كنظام كاسح لأصناف الاوكسجين التفاعلية وتنشيط تكوين الانزيمات المضادة للأكسدة كالكلوتاثيون (Martins *et al.*, 2023).

إن المنتجات الطبيعية التي تحتوي على مضادات الأكسدة لديها القدرة على حماية الخصية من الأضرار التأكسدية وبيروكسيده الدهون والضعف في مضادات الأكسدة عند التعرض إلى المواد الكيميائية ومنها عقار الاوكسي ميتلون (Skrovankova *et al.*, 2022).

تحتوي فاكهة توت العليق على مركبات فعالة تساعد على التخلص بنجاح من الجذور الحرة وحماية الخلايا من الاجهاد التأكسدي مما يدل على أن أنسجة الخصية تم إصلاحها وعادت إلى وضعها الطبيعي عند تناول حيوانات التجربة التوت قبل إعطاء عقار CsA، إذ تعمل فاكهة التوت على التخلص من الجذور الحرة والدهون التي تسبب تلف الأنسجة (Martins *et al.*, 2023).

4.4. الدراسة الفسلجية:

1.4.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius*

في معدل مستوى بعض إنزيمات الكبد لذكور الجرذان:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية جدول (4-5) ارتفاعا معنويا ($P \leq 0.05$) في المجموعة الثانية G2 الجرعة عقار السيكلوسبورين (0.2 ملغم / كغم من وزن الجسم في تراكيز كل من ALT (51.343 ± 0.49) و AST (172.33 ± 27.95) و ALP (191.50 ± 8.45) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة G1 .

كما بينت نتائج الدراسة الحالية من جدول (4-5) وجود اختلاف معنويا ($P \leq 0.05$) في تركيز انزيم ال ALT (36.167 ± 0.50) ال AST (104.00 ± 5.10) وتركيز ال ALP (124.83 ± 5.42) في مجموعة التي جُرعت بالمستخلص المائي لنبات *Rubus ulmifolius* (G3) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (132.67 ± 20.78)، (37.167 ± 1.52) (153.17 ± 9.30) على التوالي .

و حصول انخفاض معنويا ($P \leq 0.05$) في تركيز انزيم AST (140.50 ± 10.63) في المجموعة G4 الوقائية الجرعة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400 ملغم/كغم) من وزن الجسم قبل عقار السيكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم بالمقارنة مع مجموعة عقار السيكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم من وزن الجسم G2 (172.33 ± 27.95) وحصول انخفاض معنويا ($P \leq 0.05$) في ALT المجموعة G4 الوقائية المعاملة بالمستخلص قبل عقار السيكلوسبورين (0.2 ملغم/كغم من وزن الجسم (38.160 ± 1.01) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة G2 (51.343 ± 0.49) و ارتفاعا معنويا في ALP ($P \leq 0.05$) (150.17 ± 15.95) بالمقارنة مع مجموعة عقار السيكلوسبورين (0.2 ملغم/كغم) (191.50 ± 8.45) .

جدول (4-5) : معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين الجسم والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في مستوى انزيمات الكبد في مصل ذكور الجرذان البيض

ALP U/L	AST U/L	ALT U/L	المعايير المدروسة المعاملات
153.17± 9.30 C	132.67± 20.7 B	37.167± 1.52 BC	السيطرة السالبة (ماء اعتيادي) G1
191.50± 8.45 B	172.33± 27.9 A	51.343± 0.49 A	السيطرة (الموجبة) عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم G2
124.83±5.42 D	104.00± 5.10 C	36.167± 0.50 C	المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> بتركيز (400) ملغم/كغم G3
150.17±15.95 C	140.50±10.63 B	38.160±1.01 B	المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> (400 ملغم /كغم) + عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G4
20.163	10.325	1.9592	LSD

**الحروف المختلفة عموديا تدل على وجود فروق معنوية
* والحروف المتشابهة عموديا تدل على عدم وجود فروق معنوية (P≤0.05)
N=6 المتوسط ± الخطأ القياسي

انزيمات الكبد (ALT،AST،ALP) هي مؤشرات حيوية مهمة سريريًا للكشف عن مدى تلف الكبد أثناء المرض والتسمم، لأن مستوى فعاليته يرتبط في المقام الأول بصحة الجسم وتنظيم التمثيل الغذائي للبروتين، والكربوهيدرات والدهون كما تشير الى سلامة الخلايا الكبدية ان حدوث خلل وظيفي في الكبد تسبب بارتفاع معنوي بمستوى انزيمات الكبد (ALT,AST,ALP) في مصل الدم ، وسبب هذه الاصابة الكبدية هي قدرة الدواء على انتاج الجذور الحرة الزائدة وببروكسييدات الدهون وقمع قدرة ازالة الجذور الحرة و آلية الدفاع المضادة للاكسدة (Pandit et al ., 2012) .

تتجم المستويات المرتفعة من إنزيمات الكبد عن تحطم الخلايا الكبدية وتلفها أو نخر الخلية، ويتم إطلاق هذه الإنزيمات داخل خلايا الكبد في مجرى الدم عند تلف أغشية الخلايا، وبالتالي زيادة مستويات هذه الإنزيمات في البلازما، وقد يكون ذلك بسبب زيادة نفاذية غشاء البلازما ويزداد إطلاق هذه الإنزيمات حسب إمكانية السمية مع زيادة شدة اضطرابات وأمراض الكبد المختلفة (Kuzu *et al.*, 2019). كما أظهرت النتائج الحالية أن الزيادة الكبيرة في أنشطة AST و ALP و ALT والتغيرات النسجية المرضية في الكبد كانت بسبب العلاج CSA، وتُعزى هذه السمية إلى تأثير عقار CSA المؤكسد وبالتالي تسمم الكبد وتدمير معظم أغشية خلايا الكبد، ووصفت العديد من الدراسات أن أكسدة الدهون في غشاء القلب وخلايا الكبد، التي تسببها أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، هي السبب الرئيسي لتلف الأنسجة الناجم عن CSA (Lai *et al.*, 2017).

إن السمية التي يسببها السيكلوسبورين تعود إلى زيادة إطلاق أنواع الأوكسجين التفاعلية وزيادة تكوين السيتوكينات المسببة للالتهابات وتحريض موت الخلايا المبرمج (Drobnis and Nangia, 2017).

لوحظت زيادة في قيم MDA في البلازما والأنسجة عند إعطاء CSA مع زيادة إنتاج بيروكسيد الهيدروجين في الخلايا الحية، مما يؤدي لاحقاً إلى زيادة تكوين جذور الهيدروكسيل (Khan *et al.*, 2006). يزيد CSA من إنتاج ROS عن طريق تغيير نفاذية غشاء الخلية، وبالتالي تغيير سلسلة نقل الإلكترون في الميتوكوندريا (Nicolli *et al.*, 1996). ترتبط مستويات ROS المرتفعة ارتباطاً مباشراً بأبيض CSA بواسطة إنزيمات السيتوكروم P450 في الكبد (Chlubek and Poland, 2003).

نظراً لكون التوت مصدراً غنياً بمركبات البوليفينول، فقد تم التعرف على هذه الثمار بفوائدها الصحية المحتملة للإنسان، ويعود ذلك أساساً إلى خصائصها المضادة للأكسدة والالتهابات (في أوراق *R. ulmifolius*، وجد Tabarki وجماعته (2017) أن مركبي الكايمبفيرول O-3-روتينوسيد والنارينجين هما المركبان الفينوليان السائدان، بينما أشار Ali وجماعته (2017) إلى وجود الفلافونيدات والعفص والقلويدات والستيرويدات في الأجزاء الهوائية من توت العليق في المقابل، هناك عدد قليل من الدراسات المنشورة حول الخصائص الغذائية ومكونات البوليفينول والقدرة المضادة للأكسدة لثمار توت العليق (Ahmad *et al.*, 2015; Hajaji *et al.*, 2017). وقد أفادت دراسات سابقة بتأثير النضج

على الخصائص الفيزيائية والكيميائية والتغذوية. والمكونات النشطة بيولوجيًا، وخصائص مضادات الأكسدة في ثمار توت العليق (Seraglio et al., 2018; Schulz et al., 2015; Fu et al., 2015).

ان عدم وجود فروق معنوية في مستويات AST و ALT و ALP في المجموعة الثالثة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة تعود للخصائص العلاجية التي يتمتع بيه مستخلص هذا النبات وقد يعود ذلك الانخفاض الى نشاط المركبات الفعالة فيه المضادة للالتهاب والتي تعمل على تثبيط تكاثر وانتشار الخلايا الالتهابية

يُعد التوت الأسود من أغنى مصادر مضادات الأكسدة الطبيعية نظرًا لمحتواه العالي من المركبات الفينولية، مثل الأنثوسيانين، والإلاجيتانين، والفلافونول، والفلافانول (Skrovankova et al., 2022; Okatan, 2018; Vega et al., 2021). في الواقع، يتميز بقدرة استثنائية على التخلص من الجذور الحرة الناتجة كيميائيًا، مما يمنع مجموعة واسعة من الاضطرابات البشرية ويحافظ على توازن صحي بين الجذور الحرة ومضادات الأكسدة. ويتميز التوت الأسود، على وجه الخصوص، بقدرات مضادة للأكسدة ملحوظة ضد الجذور الفائقة الأكسجين ($\cdot\text{O}_2^-$)، وببيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، وجذور الهيدروكسيل ($\text{OH}\cdot$)، والأكسجين الأحادي (Martins et al., 2023).

توصل Gil-Martínez وجماعته (2023) الى أن الاستهلاك اليومي لتوت العليق يُعد مصدر أساسي للمواد المعززة للصحة. قد تمنع التحسينات الغذائية، وخاصة زيادة استهلاك الأطعمة النباتية، كانت فاكهة التوت الأسود موضوعًا لأبحاث مكثفة نظرًا لمحتواها العالي من مضادات الأكسدة، والتي يمكن أن تُعيد مستويات الأكسدة والالتهابات إلى طبيعتها، تُعد الفلافونويدات والستيلبينات والعفص أمثلة على مضادات الأكسدة الخارجية. على سبيل المثال، يُعد التخلص من أنواع الأكسجين الجذرية وإزالة سمومها ومنع إنتاجها، والتأثير على دورة الخلية، وتجنب تثبيط الأورام، وتعديل نقل الإشارة، وأحداث موت الخلايا المبرمج، والأبيض، آليات ذات صلة بيولوجية تُعزى إلى المركبات الفينولية.

2.4.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في معدل مستوى البروتين الكلي و الكلوبيولين و الالبومين لذكور الجرذان:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية من جدول (4-6) في المجموعة الثانية المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم لمدة 30 يومًا إلى حدوث انخفاض معنوي ($p \leq 0.05$) في مستوى الألبومين (1.882 ± 0.11 C) والكلوبيولين (1.561 ± 0.19 C) والبروتين الكلي (3.216 ± 0.36 B) مقارنةً بمجموعة السيطرة السالبة.

أظهرت النتائج الدراسة الحالية في الجدول (4-6) أن حيث عدم وجود فرق معنوي بين المجموعة الثالثة المعاملة بالمستخلص المائي لنبات توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم في مستوى البروتين الكلي (4.026 ± 0.18) مع مجموعة السيطرة السالبة (4.520 ± 0.22) ووجود ارتفاع معنوي ($p \leq 0.05$) في مستوى الكلوبيولين والالبومين (3.276 ± 0.29) (3.278 ± 0.14) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (4.520 ± 0.22) (2.533 ± 1.13) على التوالي ووجود ارتفاع معنوي ($p \leq 0.05$) في مستوى البروتين الكلي والكلوبيولين والالبومين بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم (3.216 ± 0.36 B) (1.561 ± 0.19 C) (1.882 ± 0.11 C) على التوالي وبينت النتائج ان المجموعة الوقائية كان له تأثير وقائي عند إعطاء فاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم قبل السيكلوسبورين G4 ، حيث عمل على الحد من الآثار الضارة للسيكلوسبورين، وأثبت فعاليته في إعادة الألبومين (2.529 ± 0.08) والكلوبيولين (2.812 ± 0.16) والبروتين الكلي (4.728 ± 0.26) إلى حالتها الطبيعية، وبقيت عند مستواها الطبيعي مقارنةً بمجموعة السيطرة السالبة (3.278 ± 0.14) (3.276 ± 0.29) (4.520 ± 0.22) على التوالي .

جدول (4-6): معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في مستوى معدل مستوى البروتين الكلي و الكلوبيولين و الالبومين في مصل ذكور الجرذان البيض

المعاملات	لمعايير المدروسة	البروتين الكلي g/dl	الكلوبيولين g/dl	الالبومين g/dl
السيطرة السالبة (ماء اعتيادي) G1	4.520±0.22 A	2.986±0.18 B	2.533±1.13 B	
السيطرة (الموجبة) عقار السايكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G2	3.216±0.36 B	1.561±0.19 C	1.883±0.11 C	
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> تركيز (400) ملغم/كغمG3	4.026±0.18 A	3.276±0.29 A	3.278±0.14 A	
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> (400) ملغم /كغم + عقار السايكلوسبورين (0.2 ملغم/كغم) G4	4.728±0.26 A	2.812±0.16 B	2.529±0.08 B	
LSD	0.7874	0.2055	0.2245	

**الحروف المختلفة عموديا تدل على وجود فروق معنوية
* والحروف المتشابهة عموديا تدل على عدم وجود فروق معنوية (P≤0.05)
المتوسط ± الخطأ القياسي
N=6

اتفقت نتائج دراستنا الحالية مع (Khudiar and Hussein, 2017 ;Colombo *et al.*,2013 ;Gruev *et al.*,2003)

نظرا لأن البروتينات هي مكونات عضوية مهمة في الخلايا الحيوانية فهي جزء من غشاء الخلية وكأنزيمات فمن المعروف أنها تؤدي دورا مهما في التفاعل بين الوسط الداخلي والخارجي للخلية ، كونها تمثل جزء من غشاء الخلية وكأنزيم ، تؤدي البروتينات أيضا دورا مهماً في تصنيع إنزيمات إزالة السموم اذ تزيلها من المواد التي تدخل جسم الحيوان قد يعود سبب انخفاض الألبومين إلى استهلاك الألبومين كمضاد للأكسدة ، فالبروتين جزء رئيسياً في معظم الأعضاء وجزء كبير من الإنزيمات والهرمونات المختلفة ، لذلك يعد البروتين هو الذي ينظم العديد من وظائف الجسم ، مثل النمو والتطور، ويقيس بروتين المصل الكلي نوعان من بروتينات المصل يتكونان من الألبومين والجلوبيولين (Ye *et al.*, 2020). يعد نقص تكوين الألبومين أحد المظاهر السريرية الشديدة لأمراض الكبد والتهاب كبيبات الكلى مما يؤدي إلى فقدان البروتين (Guyton and Hall, 2016).

ومن الآثار السلبية الرئيسة المرتبطة بـ CsA هي السمية العصبية والسمية الكلوية وارتفاع ضغط الدم وارتفاع السكر في الدم واضطرابات الجهاز الهضمي (Barbarino *et al.*, 2013) أدى علاج الفئران بـ CsA إلى أكسدة الدهون ، كما يتضح من زيادة الناتج الثانوي لأكسدة الدهون (Trull *et al.*,2002) .

قد يثبط السيكلوسبورين تخليق البروتين الكبدي ومن ثم يؤدي إلى انخفاض البروتين، ربما على مستوى الترجمة (Jeon and Kim,2011). إلى جانب ذلك، قد يصاحب الإفراط في إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية بعد التعرض لـ CsA (Mostafavi-Pour *et al.*,2013) انخفاض في مستوى بروتين الكبد ثم انخفاض في المصل. وقد ثبت أن سمية CsA في الكلى والكبد والجهاز العصبي مصحوبة بزيادة كل من إنتاج H_2O_2 وببيروكسيد الدهون، وانخفاض مصاحب في المستوى الخلوي للجلوتاثيون المختزل (Uz *et al.*,2012).

استنتج Abdelhameed وجماعته (2025) قد يكون تعزيز البروتين الكلي والكلوبيولين في الدم يرجع إلى حقيقة أن مستخلص فاكهة توت العليق يحتوي على كمية عالية من البروتينات والأحماض الأمينية وإن المركبات التي تعمل كمضادات للأكسدة، ومثبطات بيروكسيد الدهون، لديها القدرة على القضاء على الجذور الحرة وذات خصائص وقائية للكبد والكلى، وهذا التحسن يعود إلى امتلاك مستخلصات فاكهة توت العليق مستويات عالية من المركبات النشطة بيولوجيا كالمركبات الفينولية والاحماض الدهنية الغير المشبعة

مثل حامض الجاليك، حامض البنزويك، الساليسيليك والعديد من الاستروجينيات والقلويدات والسيكلوببتيدات .

3.4.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في مستوى اليوريا و الكرياتينين لذكور الجرذان:

بينت نتائج الدراسة في جدول (4-6) ارتفاعا في تركيز اليوريا (122.80 ± 9.42) و تركيز الكرياتينين (0.315 ± 0.02) في المجموعة المجرعة عقار السيكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (35.54 ± 3.92) و (0.271 ± 0.03) على التوالي .

أوضحت نتائج الدراسة في جدول (4-6) عدم وجود اختلاف معنوي ($P \leq 0.05$) بين المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* تركيز 400 ملغم/كغم في تركيز اليوريا (32.86 ± 1.97) وتركيز الكرياتينين (0.270 ± 0.02) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (35.54 ± 3.92) و (0.271 ± 0.03) على التوالي .

اما المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* 400 ملغم/كغم وعقار السيكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم ف سجلت انخفاضا معنويا ($P \leq 0.05$) في تركيز اليوريا (34.63 ± 2.42) وتركيز الكرياتينين (0.281 ± 0.03) بالمقارنة مع مجموعة عقار السايكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم (122.80 ± 9.42) و (0.315 ± 0.02) على التوالي .

أظهرت النتائج أن المستخلص المائي لنبات *Rubus ulmifolius* كان له تأثير وقائي عند إعطائه قبل السيكلوسبورين، حيث عمل على الحد من الآثار الضارة للسيكلوسبورين، وأعاد اليوريا والكرياتينين إلى حالتها الطبيعية وحافظا على مستواهما الطبيعي مقارنةً بالمجموعة G1. جدول (4-6)

وُجد أن السيكلوسبورين يؤدي إلى زيادة ملحوظة في مستوى اليوريا والكرياتينين مقارنةً بالمجموعة G1، بينما وجدت مجموعة الحيوانات التي جرّعت بالمستخلص المائي لنبات *Rubus ulmifolius* تأثيراً إيجابياً مقارنةً بالمجموعة G2.

جدول (4-7): معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة التوت العليق *Rubus ulmifolius* في مستوى اليوريا و الكرياتينين في مصل ذكور الجرذان البيض .

الكرياتينين Crea mg/dl	اليوريا Urea mg/dl	المعايير المدروسة المعاملات
0.271±0.03 B	35.54±3.92 B	السيطرة السالبة (ماء اعتيادي) G1
0.315±0.02 A	122.80±9.42 A	السيطرة (الموجبة) عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G2
0.270±0.02 B	32.86±1.97 B	المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> تركيز (400) ملغم/كغم G3
0.281±0.03 B	34.63±2.42 B	المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> (400) ملغم /كغم + عقار السايكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G4
0.0542	10.355	LSD

**الحروف المختلفة عموديا تدل على وجود فروق معنوية
* والحروف المتشابهة عموديا تدل على عدم وجود فروق معنوية (P≤0.05)
المتوسط ± الخطأ القياسي
N=6

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Barbarino et al.,2013) حيث تم الكشف عن تحريض السمية الكلوية لعقار السيكلوسبورين عن طريق ارتفاع معنوي في مستويات اليوريا والكرياتينين في الدم والتي تم تأكيدها بوساطة التغيرات النسجية المرضية السامة مقارنة بمجموعة السيطرة. تعد اليوريا والكرياتينين من أكثر العلامات حساسية للسمية الكلوية في تشخيص الإصابة الكلوية. يتميز التأثير الكلوي للسيكلوسبورين بتقليل معدل الترشيح الكبيبي مما يؤدي إلى ارتفاع اليوريا والكرياتينين في الدم.

بين Freitas وجماعته (2013) ان يسبب عقار السيكلوسبورين التسمم الكلوي أيضًا عن طريق توليد الجذور الحرة المستحثة بالأدوية هذه الزيادة في المؤشرات الحيوية للسمية الكلوية ناتجة عن تراكم النواتج الايضية السامة السيكلوسبورين في النيفرون وانخفاض معدل الترشيح الكبيبي أو قد تكون ثانوية لزيادة أنواع الأكسجين التفاعلية قد يحدث خلل في وظائف الكلى بسبب خلل في آلية التنظيم الذاتي ناتج عن إعطاء CSA . علاوة على ذلك، يُحفّز CSA تخليق الجذور الحرة في الكبيبات، مما قد يُسبب الفشل الكلوي. قد تلعب عملية أكسدة الدهون في الأغشية السيتوبلازمية، والتي تُسبب اضطرابًا في بنية الكلى، دورًا في اختلال وظائف الكلى ولم يتم بعد فهم الآلية الدقيقة للتسمم الكلوي الناجم عن عقار السيكلوسبورين ، قد تكون السمية الكلوية التي يسببها السيكلوسبورين ناتجة من خلال تكوين الجذور الحرة مما يؤدي في النهاية إلى أكسدة الدهون و البروتينات والاحماض الامينية وبالتالي يرتفع مستوى اليوريا والكرياتينين في الدم و تسبب الإجهاد التأكسدي في أنسجة الكلى مما يؤدي ارتفاع اليوريا والكرياتينين في الدم.

اثبت Gruev وجماعته (2003) ان النتيجة الأكثر شيوعًا والمحملة للحد من علاج السيكلوسبورين هي اختلال وظائف الكلى إلى جانب التغيرات المرضية الكلوية وارتفاع ضغط الدم الجهازى، يمكن أن يؤدي هذا التأثير الضار إلى الفشل الكلوي المزمن وحتى الفشل الكلوي في مرحلته النهائية. طوال عملية التمثيل الغذائي المكثفة، يتم استقلاب السيكلوسبورين إلى مستقلبات متعددة بواسطة إنزيمات السيتوكروم بي-450 الكبدية وأوكسيداز مختلطة الوظائف. وهذا يؤدي إلى تفاعلات دوائية ذات صلة سريرية. الأدوية التي تثبط إنزيمات السيتوكروم بي-450 تزيد من تركيز السيكلوسبورين الأصلي وقد تسبب سمية كلوية وارتفاع ضغط الدم وآثار جانبية أخرى. وعلى العكس من ذلك، فإن الأدوية التي تحفز هذه الإنزيمات تقلل من تركيز السيكلوسبورين الأصلي وتؤدي إلى انخفاض في الأدوية المثبطة للمناعة للدواء غير المتغير ومع ذلك، يرتبط استخدام السيكلوسبورين بسمية كلوية كبيرة، ومن المحتمل جدًا أن تكون نتيجة لتأثيره السام على بطانة الأوعية الدموية، وهو موثق باستمرار في الحيوانات التجريبية والبشر.

بينت نتائج الدراسة الحالية في المجموعة الثالثة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* تركيز (400) ملغم/كغم مع المجموعة الوقائية G4 عدم وجود أي تغيرات مرضية وأن المستخلص المائي لم يسبب تأثيرات ضارة كون نبات التوت العليق من النباتات الطبية تتميز باحتوائها على مركبات فعالة وتختلف بعضها عن بعض من ناحية تركيبها وتأثيرها البيولوجي، يعود التأثير العلاجي والوقائي للمستخلصات النباتية لاحتوائها على مركبات لها خصائص فعالة مثل مضادات الأكسدة . (Abdul and Majeed,2012)

اذ أكد Abdelhameed وجماعته (2025) وAbu Bakar وجماعته (2016) الى أن مستخلص فاكهة توت العليق تحتوي على مركبات الفلافونويد ، والقلويدات ، والصابونين ، والعفص ، والجليكوزيدات ، والفينولات ، ومركبات الأسيتوجينين المختلفة ، وأظهرت مجموعة متنوعة من الأنشطة الدوائية التي تشمل مضادات الأكسدة ، ومضادة للسرطان ، وخصائص مضادة للالتهابات وبالتالي يعمل على تحسين وظائف الكلى وإعادة الاضطرابات الايضية الى مسارها الطبيعي .

4.4.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في مستوى SOD و GSH و MDA و CAT لذكور الجرذان:

أوضحت نتائج الدراسة الحالية في جدول (4-8) للمجموعة الثانية المعاملة بعقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم حصول انخفاضاً معنوياً في مستوى كل من SOD (20.71 ± 0.25) و GSH (39.68 ± 4.09) و CAT (35.94 ± 2.90) وارتفاعاً معنوياً في مستوى MDA (49.91 ± 0.51) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (27.09 ± 1.28) و (51.36 ± 5.90) و (38.73 ± 2.52) و (46.75 ± 3.50) على التوالي .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروق معنوية في جدول (4-8) في مستويات انزيم SOD (32.66 ± 1.66) و ارتفاع معنوي في مستوى GSH (77.04 ± 2.25) وانخفاض معنوي في مستوى MDA و CAT و (26.36 ± 3.98) و (24.56 ± 2.36) في مجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* تركيز (400) ملغم / كغم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (27.09 ± 1.28) و (51.36 ± 5.90) و (38.73 ± 2.52) و (46.75 ± 3.50) على التوالي .

كذلك بينت نتائج الدراسة الحالية في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز 400 ملغم/كغم من وزن الجسم مع عقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم وقائياً فقد أظهرت ارتفاعاً معنوياً في مستوى SOD (51.60 ± 0.76) والكلوتاثيون (50.93 ± 2.54) CAT (44.95 ± 3.30) بالمقارنة مع مجموعة عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم (20.71 ± 0.25) و (39.68 ± 4.09) (35.94 ± 2.90) على التوالي وانخفاضاً معنوياً في مستوى MDA في المجموعة الوقائية (G4) (35.96 ± 1.09) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة المعاملة بعقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم (49.91 ± 0.51)

جدول (4-8): معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في مستوى المالونديالدهيد (MDA) وبعض مضادات الأكسدة في مصل ذكور الجرذان البيض .

المعايير المدروسة المعاملات	سوبراوكسيد ديسموتيز SOD $\mu\text{mol/L}$	المالون ثنائي الدهيد MDA $\mu\text{mol/L}$	الكلوتاثيون GSH $\mu\text{mol/L}$	الكاتليز CAT $\mu\text{mol/L}$
السيطرة السالبة (ماء اعتيادي) G1	27.09 ± 1.28 B	38.73 ± 2.52 B	51.36 ± 5.90 B	46.75 ± 3.50 A
السيطرة (الموجبة) عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G2	20.71 ± 0.25 C	49.91 ± 0.51 A	39.68 ± 4.09 C	35.94 ± 2.90 B
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus</i> <i>ulmifolius</i> تركيز (400) ملغم/كغم G3	32.66 ± 1.66 B	26.36 ± 3.98 C	77.04 ± 2.25 A	24.56 ± 2.36 C
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus</i> <i>ulmifolius</i> (400) ملغم + عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G4	51.60 ± 0.76 A	35.96 ± 1.09 B	50.93 ± 2.54 B	44.95 ± 3.30 A
LSD	6.2254	5.6593	1.9892	2.4512

**الحروف المختلفة عمودياً تدل على وجود فروق معنوية
* والحروف المتشابهة عمودياً تدل على عدم وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$)
المتوسط $\pm$ الخطأ القياسي
N=6

وجاءت هذه النتائج متماثلة مع نتائج دراسات سابقة (Al-Amran *et al.*, 2011; Qin and Chen, 2019; Yazdani *et al.*, 2019). إذ لوحظت زيادة قيم MDA في البلازما والأنسجة عند إعطاء CSA مع زيادة إنتاج بيروكسيد الهيدروجين في الخلايا الحية مما يؤدي بعد ذلك إلى زيادة تكوين جذور الهيدروكسيل (Khan *et al.*, 2006). فيؤدي عقار السيكلوسبورين إلى زيادة توليد ROS من خلال تغيير نفاذية مسامية الغشاء الخلوي، وبالتالي تغيير سلسلة نقل الإلكترون في الميتوكوندريا (Nicolli *et al.*, 1996).

عندما تزداد المواد المؤكسدة تنخفض مستويات مضادات الأكسدة، وهي حالة من الإجهاد التأكسدي ناتجة عن عدم التوازن بين ROS والقدرة الحيوية للجسم لإزالة السموم من المواد الوسيطة التفاعلية التي تسبب تلف الأنسجة (Valko *et al.*, 2007). وترافق ذلك مع انخفاض في فعالية GSH و CAT لأنهما من مضادات الأكسدة التي تسهم في منع الأكسدة المستحدثة بالعقار عن طريق الإزالة المباشرة للجذور الحرة، وإن تلك المضادات تُستنزف لأنها تمثل خطأً دفاعياً ضد سمية ROS، وبالتالي تنخفض بسبب زيادة هدمها أو قلة تصنيعها نتيجة حدوث نقص في المواد الأولية الضرورية لبناء هذه الإنزيمات في أثناء الإجهاد التأكسدي (Morakinyo *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2006; Weiji *et al.*, 2004).

يؤدي الكلوتاثيون الداخلي دوراً وقائياً في الأنسجة عن طريق تفاعلات إزالة السموم وأيضاً إزالة الجذور الحرة، وبالتالي الحفاظ على السلامة الهيكلية للخلايا وأغشية العضيات، وأن انخفاض مستوى GSH قد يضر بالدفاعات المضادة للأكسدة الخلوية ويؤدي إلى تراكم الجذور الحرة مثل جذر الهيدروكسيل والسيوبر أوكسيد وبيروكسيد الهيدروجين (Tirmenstein *et al.*, 2000).

يزيد السيكلوسبورين من إنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS وتقليل مستويات مضادات الأكسدة وتحفيز بيروكسيد الدهون، مما يؤدي إلى الإخلال في التوازن التأكسدي وموت الخلايا المبرمج (Akoo1, 2015).

وقد يعود السبب في ذلك إلى الزيادة في أنواع الأوكسجين التفاعلية وتقليل مستويات مضادات الأكسدة الناتجة بفعل عقار CSA مما يؤدي إلى الإخلال في التوازن التأكسدي داخل الخلية، ويمكن أن يؤدي المستوى العالي من الإجهاد التأكسدي إلى تلف الحمض النووي والبروتينات، إذ يثبط السيكلوسبورين تخليق الحمض النووي وتؤثر الجذور الحرة على تنظيم مسارات الإشارات في الخلية. (Lai *et al.*, 2017) فتهاجم الجذور الحرة الأحماض النووية، وعندما تخرق حواجز الغشاء يتسبب بتلفه والإخلال بنشاطه الخلوي وتدخل إلى نواة الخلية التي قد تسبب طفرات جينية وموت الخلايا الناجم عن تحطيم DNA والدهون، كذلك تؤدي إلى خلل وظيفي في الإنزيمات وتكوين البروتينات (Singh *et al.*, 2004).

ولكن على الرغم من فعالية السيكلوسبورين، إلا أن استعماله يسبب العديد من الآثار الجانبية الناتجة من زيادة إنتاج الجذور الحرة، لأن استقلاب السيكلوسبورين بواسطة السيتوكروم CYP450 يؤدي إلى إنتاج الجذور الحرة مباشرة، بالإضافة إلى أنه يمنع من تنفس الميتوكوندريا في الخلايا مما يسبب نقص الأكسجة hypoxia التي تؤدي أيضاً إلى إنتاج الجذور الحرة (Akoo1, 2015).

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع Khan وجماعته (2006) حيث اثبتت زيادة في قيم MDA في البلازما والأنسجة عند إعطاء السيكلوسبورين مع زيادة إنتاج بيروكسيد الهيدروجين في الخلايا الحية، مما يؤدي لاحقاً إلى زيادة تكوين جذور الهيدروكسيل. يزيد السيكلوسبورين من إنتاج ROS عن طريق تغيير نفاذية غشاء الخلية، وبالتالي تغيير سلسلة نقل الإلكترون في الميتوكوندريا. ترتبط مستويات ROS المرتفعة ارتباطاً مباشراً بأبيض السيكلوسبورين بواسطة إنزيمات السيتوكروم P450 في الكبد (Chlubek and Poland, 2003).

عادةً ما تكون الآثار الجانبية للسيكلوسبورين مصحوبة بتغيرات نسجية مرضية في أعضاء مختلفة من الجسم مثل الكلى والكبد والقلب (Freitas et al., 2013) وأنسجة الخصية والبروستاتا (Rezzani, 2004). تشمل آليات السمية التي يسببها السيكلوسبورين زيادة إطلاق أنواع الأكسجين التفاعلية وزيادة تكوين السيتوكينات المؤيدة للالتهابات وتحريض موت الخلايا المبرمج. قد تؤدي هذه التأثيرات إلى أحداث سامة خطيرة في الأنسجة (Drobnis and Nangia, 2017).

يُعتبر توت العليق *Rubus ulmifolius* من أكثر مصادر مضادات الأكسدة الطبيعية وفرةً، نظراً لمستوياته العالية من المركبات الفينولية، بما في ذلك الأنثوسيانين، والإيلاجيتانين، والفلافونول، والفلافانول. يتمتع بقدرة استثنائية على تحييد الجذور الحرة الناتجة كيميائياً، مما يُجنّب العديد من الأمراض البشرية، ويُحافظ على توازن صحي بين الجذور الحرة وأنظمة مضادات الأكسدة. وتحديداً، يُظهر التوت الأسود خصائص مضادة للأكسدة استثنائية ضد الجذور الفائقة، وبيروكسيد الهيدروجين، وجذور الهيدروكسيل، والأكسجين الأحادي (Martins et al., 2023).

يرتبط النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات بعدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل. تمنع هذه المركبات الأكسدة وتحمي الخلايا من خلال منح ذرات الهيدروجين للأنواع النشطة من الجذور الحرة (Espada-Bellido et al., 2019).

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع Martins وجماعته (2024) حيث اثبت عند المعالجة بتوت العليق،

تحسن مستوى مضادات الأكسدة MDA وزاد GSH ، بينما لوحظ انخفاض في مستوى CAT وفقاً للمجموعات المعالجة. يُعزى هذا التحسن في هذه المستويات إلى مساعدة التوت لجهاز المناعة داخل الخلايا من خلال خصائصه المضادة للأكسدة، حيث قلل توت العليق *Rubus ulmifolius* بشكل ملحوظ من زيادة مستوى بيروكسيد الدهون، وخفض استنزاف مستويات GSH وأنشطة CAT . أظهرت دراسة (Ruiz-Rodríguez *et al.*, 2014) الإمكانيات العلاجية للمركب النشط في توت العليق *Rubus ulmifolius* وحماية الأنسجة من خلال خفض مستويات MDA وزيادة مستويات SOD و GSH (kareem and obeid, 2020; Majeed *et al.*, 2023).

توصل Ghanem وجماعته (2024) الى التحقق من فعالية مضادات الأكسدة في تقليل الالتهابات باستخدام النباتات الطبية. فهي قادرة على خفض الإجهاد التأكسدي وتنظيم الالتهابات عبر تعديل مسارات الإشارات، أو التخلص من المؤكسدات مباشرة، أو إنتاج إنزيمات مضادة للأكسدة، مما يساعد على الوقاية من الأمراض المزمنة المرتبطة بالالتهابات التي يسببها السيكلوسبورين .

إذ إن العلاج بالنباتات الطبية وسيلة مهمة ضد الإجهاد التأكسدي، وتعد الفلافونيدات من أكثر المركبات النباتية الطبية انتشاراً وفعالية، بسبب خصائصها المضادة للأكسدة، التي تؤدي دوراً مهماً في النظام الدفاعي ضد سمية أنواع الأوكسجين التفاعلية (Reactive oxygenspecies(ROS)، إذ تثبط تكون الجذور الحرة ومنع التأثير الضار لتلك الجذور وتسهم بثبات الدهون في الغشاء الخلوي (Dauqan, 2011) أن فعالية مضادات الأكسدة لمركبات الفلافونيد تكون مرتبطة بعدد مجموعات الهيدروكسيل وموضعها، فتمنع هذه المركبات عملية الأكسدة وتحمي الخلايا عن طريق التبرع بذرة الهيدروجين للأنواع المتفاعلة من الجذور الحرة (Pari and Sivasankari, 2008).

5.4.4. تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في معدل مستوى هرمون الشحمون الخصوي (Testosterone (T) والهرمون اللوتيني (LH) وهرمون المحفز الجريبات النامية Follicles stimulating hormone (FSH) للذكور الجرذان:

سجلت الدراسة الحالية في جدول (4-9) انخفاض معنوي للهرمونات المذكورة أعلاه في مجموعة تجريع عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم / كغم من وزن الجسم FSH G2 (2.23 ± 0.10) و LH (1.56 ± 0.8) و T (2.98 ± 0.18) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (3.48 ± 0.15), (3.67 ± 0.11), (4.36 ± 0.22) على التوالي.

لوحظ أيضا انعدام الفروق المعنوية ($p < 0.05$) في مستويات هرمون المحفز الجريبات النامية FSH (3.98 ± 0.20) والهرمون اللوتيني LH (4.87 ± 0.34) وهرمون الشحمون الخصوي التيستسترون T (5.45 ± 0.16) في المجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* تركيز (400) ملغم/كغم مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة G1 .

اما في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم قبل تجريع عقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم فسجلت انعدام الفروق المعنوية في معدلات مستويات هرمون FSH (3.41 ± 0.14) و LH (3.59 ± 0.35) , T (4.29 ± 0.15) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة G1 .

جدول (4-9): معدل تأثير تجريع عقار السيكلوسبورين والمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في مستوى التستوستيرون و LH و FSH في مصل ذكور الجرذان البيض .

FSH mIU / ml	LH mIU / ml	التستوستيرون mIU / ml	المعايير المدروسة Mean $\pm$ S.D المجاميع
3.48 $\pm$ 0.15 A	3.67 $\pm$ 0.11 B	4.36 $\pm$ 0.22 B	السيطرة السالبة (ماء اعتيادي) G1
2.23 $\pm$ 0.10 B	1.56 $\pm$ 0.8 C	2.98 $\pm$ 0.18 C	السيطرة (الموجبة) عقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم G2
3.98 $\pm$ 0.20 A	4.87 $\pm$ 0.34 A	5.45 $\pm$ 0.16 A	المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> تركيز G3 (400) ملغم/كغم
3.41 $\pm$ 0.14 A	3.59 $\pm$ 0.35 B	4.29 $\pm$ 0.15 B	المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> (400) ملغم /كغم + عقار السيكلوسبورين (0.2) G4 ملغم/كغم
0.9584	1.1504	1.0685	LSD

**الحروف المختلفة عموديا تدل على وجود فروق معنوية
* والحروف المتشابهة عموديا تدل على عدم وجود فروق معنوية (P $\leq$ 0.05)
المتوسط $\pm$ الخطأ القياسي
N=6

اشارت نتائج الدراسة الحالية إلى وجود انخفاض معنوي في مستوى هرمون التستوستيرون وحصول انخفاض معنوي في مستوى الهرمون اللوتيني LH والهرمون المحفز للجريب FSH لذكور الجرذان المعاملة بعقار CSA مقارنة بمجموعة السيطرة وباقي المجاميع، وجاءت هذه النتائج متطابقة مع نتائج دراسات (Chen et al., 2013; Pan et al., 2018; Karna, 2021).

لاحظ He وجماعته (2013) أن الجرعات العلاجية من السيكلوسبورين أضرت بوظيفة الخصية وخفضت مستويات هرمون التستوستيرون، مما أدى إلى ضمور في الأنسجة وتقليل قطر النبببات المنوية. ويؤدي الانخفاض غير الطبيعي في مستويات هذا الهرمون في المصل إلى الانخفاض في سمك الظهارة الجرثومية وقطر النبببات المنوية. فقد ارتبطت التغيرات التنكسية في الخصية وضمور خلايا لايدك وانخفاض اقطار النبببات المنوية وصغر التجويف للجرذان بالاضطراب في إنتاج هرمون التستوستيرون (Sukhorum and Iamsaard, 2017).

وإن السيكلوسبورين يؤثر بشكل أساسي في تخليق وإفراز هرمون التستوستيرون في الخصية وبالتالي خفض مستوياته في المصل، فقد ذكر Ali وجماعته (2009) أن السيكلوسبورين له تأثير مثبط على تخليق هرمون التستوستيرون في خلايا لايدك من خلال التدمير الهيكلي للميتوكوندريا والشبكة الإندوبلازمية الملساء وهي العضيات التي تحتوي على إنزيمات التخليق الحيوي للتستوستيرون. كما يسبب عقار السيكلوسبورين انخفاضاً ملحوظاً في هرمون التستوستيرون في الدم المرتبط بانخفاض وزن الجسم (Telailia and Hacene, 2020). ومن المعروف أن هذا الهرمون هو من الهرمونات الابتنائية في الجسم الذي يعمل على زيادة في حجم وكتلة العضلات المخططة وزيادة نمو العظام (Sinha-Hikim et al., 2002). فقد أشارت دراسة MacDonald وجماعته (2010) إلى وجود علاقة بين انخفاض إجمالي هرمون التستوستيرون ومؤشر كتلة الجسم.

ذكر Rajfer وجماعته (1987) أن تجريع السيكلوسبورين عن طريق الفم بجرعات تساوي أو تزيد عن 15 ملغم/كغم من وزن الجسم في اليوم لمدة شهر واحد يؤدي إلى تناقص مستويات هرمون التستوستيرون في المصل وداخل الخصية في الجرذان البالغة، وذلك بعد أن استعملوا ثلاث جرعات من CsA (7.5، 15، 30) ملغم/كغم من وزن الجسم.

السيكلوسبورين أو أحد مستقلباته قد يتداخل بشكل مباشر مع إنزيمات التخليق الحيوي لهرمون التستوستيرون عبر تثبيط نظام السيتركروم P-450scc فيكون له تأثير سلبي على نشاط انشقاق السلسلة الجانبية للكوليسترول في الخصية مما يؤدي إلى انخفاض معدل تكوين ستيرويد التستوستيرون (Kadhem, 2022).

وذكر Freitas وجماعته (2012) أن السيكلوسبورين يسبب تلف بنية الخصية في ذكور الجرذان البالغة مما يسبب في انخفاض مستويات هرمون التستوستيرون في المصل، ومن ضمن الآليات الرئيسية التي من

خلالها تقلل جرعات السيكلوسبورين من هرمون التستوستيرون في مصل ذكور الجرذان هي انخفاض عدد مستقبلات LHR وبالتالي عدم قدرة الخصيتين على الاستجابة لإشارة LH المرتفعة لتعزيز تكوين السيترويد (Seethalakshmi et al., 1990c). كذلك الزيادة في مستويات ROS التي يسببها CSA تؤدي إلى انخفاض في إنتاج التستوستيرون (Kadhem, 2022). كما يمكن ان يكون لقلة عدد خلايا لايدك وضمور حجمها الذي بينته المقاطع النسجية للدراسة الحالية دور في انخفاض مستوى هرمون التستوستيرون، لأن الخلل في وظيفة خلية لايدك كخلية إفرازية تؤدي إلى انخفاض مستويات هرمون التستوستيرون في المصل وان ارتفاع مستوى الجنور الحرة لها دور في خفض الهرمونات وتحطيم انسجة الخصية وتقليل خلايا لايدك (Hutson, 2006).

تعد المستويات المرتفعة من LH وFSH مؤشراً على فشل وظائف الخصية الرئيسة نتيجة الضرر بسبب المرض أو الاشعاع أو العلاجات والادوية (Jadalhaq, 2011). فيمكن أن تكون الزيادة في مستويات LH في المصل بسبب تثبيط إنتاج هرمون التستوستيرون، وأن النقص في مستقبلات LHR يكمن وراء فشل الخصيتين في الاستجابة لمستويات LH المرتفعة في مصل الجرذان عند المعاملة ب السيكلوسبورين (Krueger et al., 1991). كما ان تلف خلايا سرتولي يؤثر على تنظيم التغذية الراجعة السلبية لإفراز FSH، لأن السيكلوسبورين قد يسبب إصابة وتنكس خلايا سرتولي التي تحوي على مستقبلات هرمون (Kadhem, 2022).

تحمي المركبات النباتية المتعددة الفينول (الايروفلافون والفلافونويد) والمنشطات الجنسية بخصائصها الستيرويدية ومضادات الأكسدة والالتهابات السلالات المولدة للحيوانات المنوية من تلف أنواع الأوكسجين التفاعلية عن طريق تعزيز HPGA وزيادة تكاثر خلايا سيرتولي ولايدك وتمايزها

يكون للجهاز التناسلي الذكري في الحالة الطبيعية توازن بين إنتاج ROS ونشاط مضادات الأكسدة. لكن الإفراط في إنتاج ROS في السائل المنوي يمكن أن يؤثر على آليات الدفاع المضادة للأكسدة في الحيوانات المنوية أو البلازما المنوية ويسبب الإجهاد التأكسدي (Safarnavadeh and Rastegarpanah, 2011).

تحتوي فاكهة توت العليق على كمية كبيرة من مضادات الأكسدة متعددة الفينول مثل صبغات الأنثوسيانين المرتبطة بالحماية الصحية المحتملة ضد العديد من الأمراض البشرية. يساهم هيكل الفاكهة الكلي في قيمتها الغذائية لأنه يزيد من نسبة الألياف الغذائية، مما يضعها بين الأطعمة النباتية ذات أعلى محتوى من الألياف

المعروفة بنسبة 20% ألياف لكل وزن إجمالي. التوت هو مصدر غني بفيتامين C مع 30 ملغم لكل حصة من 1 كوب (حوالي 50% من القيمة اليومية)، والمنغنيز (حوالي 60% من القيمة اليومية)، ومحتوى فيتامينات B 13، وحمض الفوليك، والمغنيسيوم، والنحاس والحديد الموجودة بشكل كبير في التوت. يحتل توت العليق مرتبة قريبة من أعلى جميع الفواكه لقوة مضادات الأكسدة، وخاصة بسبب محتواه المنخفض من حمض الإلاجيك (من الإلاجيتانين)، والأنثوسيانين. ولديه قيمة ORAC تبلغ حوالي 4900 لكل 100 غم (Abdul and Majeed, 2012).

تساهم المركبات البوليفينولية المتنوعة الموجودة في فاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* في علاج العديد من الأمراض المزمنة والتكسية (Ferlemi and Lamari, 2016; Del Bo et al., 2015). ويمكن للمركبات الفينولية أن تُحيد الجذور الحرة وتعمل كمضادات للأكسدة، ومضادات للميكروبات، وتحمي من الاجهاد التأكسدي وعوامل مضادة للالتهابات في فسيولوجيا النبات (Abdelhameed et al., 2025).

قد تعود التأثيرات المضادة للأكسدة لمعظم مستخلصات النباتات إلى محتواها الفينولي، حيث تلعب هذه الفينولات دوراً رئيسياً في التخلص من الجذور الحرة وتعزيز إنتاج مضادات الأكسدة الداخلية، مثل تقليل MDA و ROS، ورفع مستوى بعض الإنزيمات مثل الجلوتاثيون المختزل (GSH) وفائق أكسيد ديسميوتاز (SOD) (Nagy et al., 2024) تشمل آليات مضادات الأكسدة التخلص من الجذور الحرة، وتخليق المعادن، وتثبيط الإنزيمات، وتعزيز إنتاج مضادات الأكسدة الداخلية.

توجد علاقة مباشرة قوية بين نشاط مضادات الأكسدة وتركيز المركبات الفينولية. ووفقاً لنتائج Maslov وجماعته (2023)، تمتلك براعم التوت الأحمر إمكانات علاجية بفضل خصائصها المضادة للأكسدة. يتميز مستخلصها المائي بغناه بالمركبات الفينولية، بما في ذلك الأحماض العضوية والفلافونويدات مثل الكاتيكين، والتي تُظهر نشاطاً مضاداً للأكسدة قوياً. وقد كشفت اختبارات حيوية الخلايا أن خلايا سرطان حساسة بشكل خاص لمستخلصات توت العليق. وقد أظهرت هذه المستخلصات تأثيراً وقائياً من خلال تخفيف توليد أنواع الأكسجين التفاعلية التي يسببها بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) (Junior et al., 2023).

وقد أظهرت أنواع *Rubus*، الغنية بالبوليفينولات والفلافونويدات، إمكانات كبيرة في تعزيز الصحة الإنجابية. الفلافونويدات، المعروفة بخصائصها القوية المضادة للأكسدة والالتهابات، تؤثر إيجاباً على التوازن الهرموني وتحسن جودة الحيوانات المنوية وحركتها بشكل ملحوظ، مما يجعلها من أبرز العناصر في تعزيز

الصحة الإنجابية (Muniyandi et al., 2019; Nagy et al., 2024). وبالمثل، تُسهم الصابونينات أيضاً في تعزيز الخصوبة، وخاصةً في تنظيم الهرمونات؛ ومع ذلك، فإن الأبحاث المتعلقة بتأثيراتها أقل شمولاً مقارنةً بأبحاث الفلافونويدات والفينولات (Elmotayam et al., 2022; Muniyandi et al., 2019).

أظهرت دراسة على النباتات الطبية المحتوية على بعض المركبات الفينولية تأثير وقائي على الأضرار الناجمة عن أنواع الاوكسجين التفاعلية في الجهاز التناسلي أن وجود هذه المركبات ينظم إفراز هرمون التستوستيرون من خلايا لايدك، ويعزز من إنتاج حامض الساليسيليك، ويزيد من إفراز خلايا سيرتولي للماء والمغذيات الدقيقة في سلالة الحيوانات المنوية، وينظف تجويف المنطقة المحيطة بالحيوانات المنوية من أنواع الأوكسجين التفاعلية (Jamalan et al., 2016).

5.4. الدراسة الوراثية :

1.5.4. تأثير تجريع المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* وعقار السيكلوسبورين على نسبة تحطم جزيئة الحامض النووي الـ Comet Assay DNA في خلايا الكبد لذكور الجرذان.

اختبار المذنب هو طريقة سريعة وحساسة للغاية للكشف عن تلف الحمض النووي على مستوى الخلايا الفردية. يقيس هذا الاختبار كسور الحمض النووي أحادية السلسلة ومزدوجة السلسلة، ومواقع التآكل القلوي، وإصلاح الاستئصال غير المكتمل، ومواقع الارتباط المتقاطع. من أهم مزايا اختبار المذنب إمكانية تطبيقه على كل من الخلايا المتكاثرة وغير المتكاثرة، ويمكن إجراؤه على جميع أنواع الخلايا حقيقية النواة. يتمثل المبدأ الأساسي لاختبار المذنب القلوي في تحليل الأغشية البيولوجية لإطلاق البروتينات المرتبطة بالحمض النووي، يليه ترحيل كهربائي قصير المدى عند درجة حموضة أعلى من 13. خلال هذه العملية، تهاجر شظايا الحمض النووي وتشكل شكلاً يشبه المذنب، والذي يُصوّر عن طريق التلوين بصبغة فلورية مرتبطة بالحمض النووي. يتناسب مدى الهجرة الكهربائية طردياً مع مقدار تلف الحمض النووي. تشمل المزايا الرئيسية لاختبار كومييت الحساسية - إذ يُمكنه الكشف عن مستويات منخفضة من تلف الحمض النووي (Živković et al., 2024).

ذكر (Dauqan 2011) إن العلاج بالنباتات الطبية وسيلة مهمة ضد الإجهاد التأكسدي، وتعد الفلافونويدات من أكثر المركبات النباتية الطبية انتشاراً وفعالية، بسبب خصائصها المضادة للأكسدة، التي تؤدي دوراً مهماً في النظام الدفاعي ضد سمية أنواع الأوكسجين التفاعلية Reactive

(ROS) oxygenspecies، إذ تثبط تكوّن الجذور الحرة ومنع التأثير الضار لتلك الجذور وتسهم بثبات الدهون في الغشاء الخلوي، أن فعالية مضادات الأكسدة لمركبات الفلافونيد تكون مرتبطة بعدد مجموعات الهيدروكسيل وموضعها، فتتمنع هذه المركبات عملية الأكسدة وتحمي الخلايا عن طريق التبرع بذرة الهيدروجين للأنواع المتفاعلة من الجذور الحرة (Pari and Sivasankari, 2008).

بينت النتائج الموضحة في الجدول (4-10) إلى حدوث ارتفاع معنوي ($P < 0.05$) في نسبة تحطم جزيئة DNA لخلايا الكبد في المجموعة الثانية المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم (G2) طول الذيل و طول المذنب و olive moment بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (G1)، وحدث انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في (قطر الرأس و head DNA) في المجموعة الثانية المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم (G2) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة (G1)، في حين لوحظ انخفاضاً معنوياً ($P \leq 0.05$) في نسبة طول الذيل و طول المذنب و olive moment في المجموعة الثالثة المستخلص المائي لفاكهة توت/العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي جرعت عقار السيكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم (G3) و وجود ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في نسبة قطر الرأس و head DNA في المجموعة الثالثة المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* بتركيز (400) ملغم/كغم من وزن الجسم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة التي جرعت عقار السيكلوسبورين 0.2 ملغم/كغم (G3). وكذلك لوحظ في المجموعة الرابعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* 400 ملغم/كغم وعقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم (G4) عدم وجود فرق معنوي في طول الذيل وقطر الرأس و head DNA و olive moment بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة.

جدول (10-4) مقارنة لتأثير المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* وعقار السيكلوسبورين على قياسات اختبار المذنب لخلايا الكبد Comet Assay

المجموعة / الجرعة	Olive Moment	طول الذيل	Head DNA	قطر الرأس	طول المذنب
السيطرة السالبة (ماء اعتيادي)	89.54±4.05 b	402.12 ±16.74 c	65.24 ±5.92 a	150.92 ±11.37 b	475.12 ±22.71 c
السيطرة (الموجبة) عقار السيكلوسبورين (0.2) (ملغم/كغم)	183.53 ±13.62 a	661.95 ±32.09 a	41.28 ±2.82 b	123.7 ±207.1 a	781.53 ±51.66 a
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> تركيز (400) ملغم/كغم	93.31±4.78 b	410.48 ±21.52 c	68.83 ±4.37 a	157.58 ±9.84 b	489.04 ±35.02 c
المستخلص المائي لفاكهة توت العليق <i>Rubus ulmifolius</i> (400) ملغم /كغم وعقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم	105.25±4.87 b	560.32 ±28.94 b	60.23 ±3.17 a	153.87 ±9.83 b	664.34 ±29.05 b
.L.S.D (P-value)	22.771 ** (0.0001)	72.183 ** (0.0008)	13.027 ** (0.0076)	49.605 ** (0.0001)	82.772 ** (0.0001)

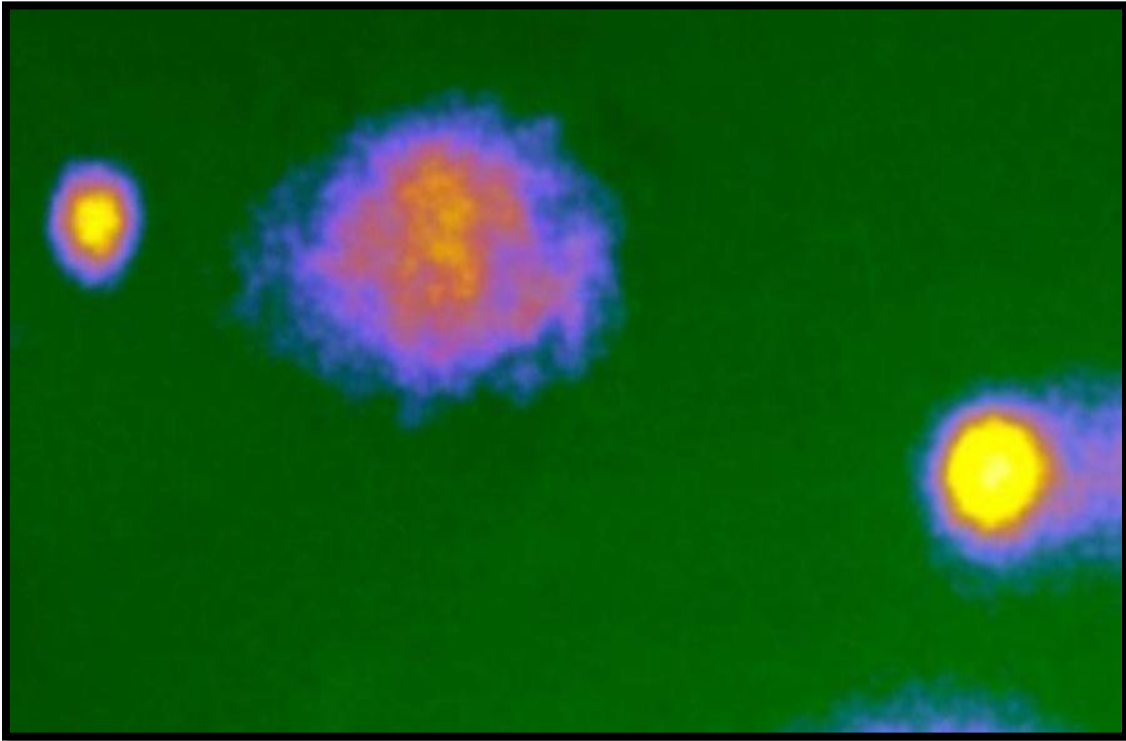
**الحروف المختلفة عموديا تدل على وجود فروق معنوية ($P \leq 0.05$)
* والحروف المتشابهة عموديا تدل على عدم وجود فروق معنوية
N=6
المتوسط ± الخطأ القياسي

لدراسة تقييم تأثير المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* (400) ملغم/كغم وعقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم في نسبة تحطم جزيئة الحامض النووي DNA في الحيوانات لخلايا الكبد للجرذان، تم استخدام اختبار المذنب Comet Assay،

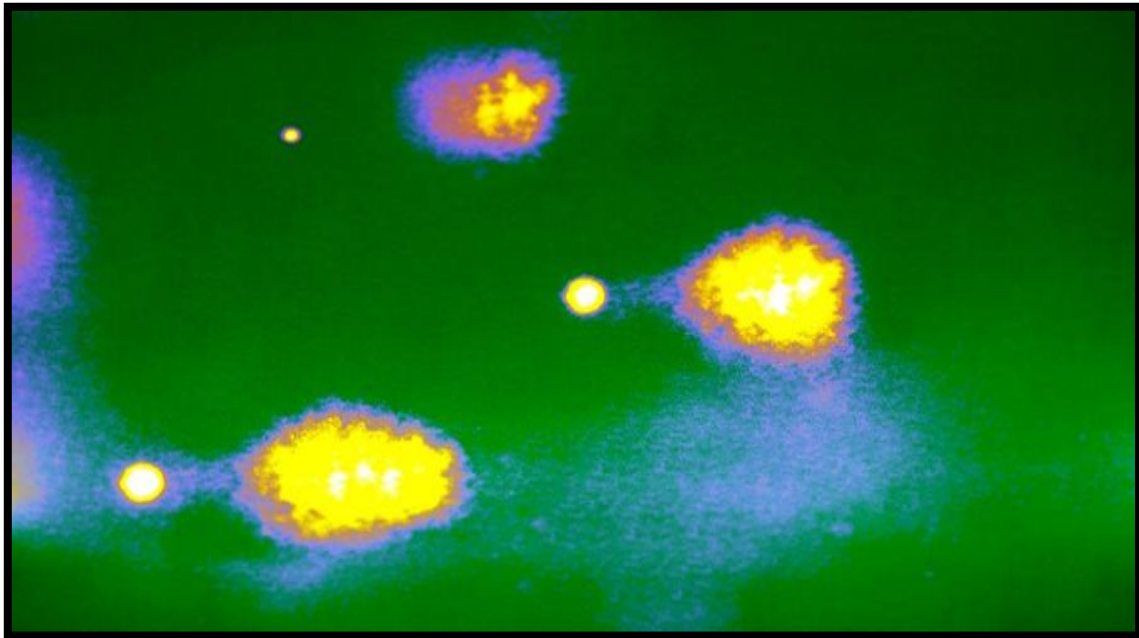
إذ أظهرت نتائج الفحص المجهرى في الصورة (4-17) مجموعة السيطرة السالبة (G1) وفي الصورة (4-19) التابعة لمجموعة الجرذان المجرعة بمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* (400) ملغم/كغم فقط. نوى خلايا الكبد غير متضررة وأقرب الى الطبيعية

أظهرت نتائج المجموعة المعاملة بعقار السيكلوسبورين بتركيز (0.2) ملغم/كغم من وزن الجسم في الصورة (4-18) تفككاً وتلفاً واضحاً في جزيئة الحامض النووي DNA لخلايا الكبد على شكل مذنبات إذ يظهر نمط ترحيل DNA بمنطقة الذيل بنسبة اكبر مما هو عليه بمنطقة الرأس .

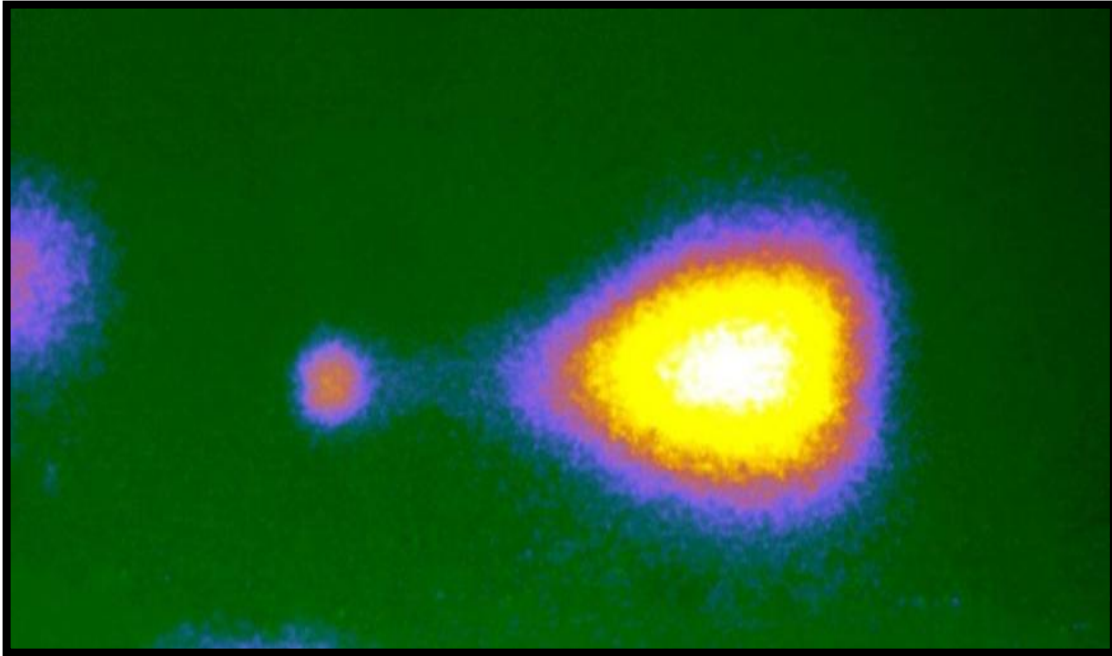
واوضحت نتائج المجموعة الرابعة المعاملة بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* 400 ملغم/كغم وعقار السيكلوسبورين (0.2) ملغم/كغم (G4) في الصورة (4-20) تلفاً منخفضاً في جزيئة DNA في نوى خلايا الكبد وأظهرت تحسناً في جزيئة الحامض النووي DNA خلايا الكبد إذ لوحظ نوى طبيعية للخلايا وغير متضررة نسبياً.



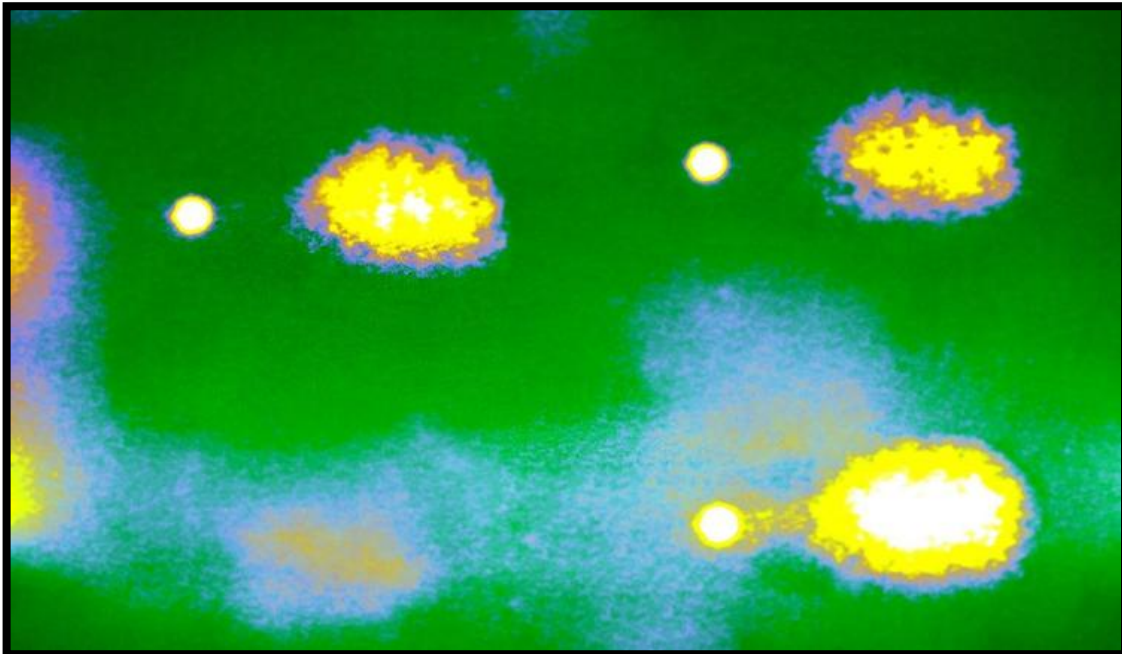
صورة (4-17) نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان لمجموعة السيطرة السالبة (G1) حيث يلاحظ ظهور جزيئة DNA المكثفة بصورة طبيعية. (قوة التكبير X 100, الصبغة SYBER green).



صورة (4-18) نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان المجموعة المعاملة بعقار السيكلوسبورين إذ يلاحظ الضرر الحاصل لجزيئة DNA على شكل مذنبات (Tail). (قوة التكبير X 100, الصبغة SYBER green).



صورة (4-19) نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان المستخلص المائي لفاكهة توت العليق *Rubus ulmifolius* إذ يلاحظ الترتيب الطبيعي لجزيئة DNA (SYBER green الصبغة, 100X قوة التكبير).



صورة (4-20) نمط الهجرة الكهربائية للحمض النووي DNA لخلايا الكبد لذكور الجرذان في المجموعة الوقائية المعاملة بالمستخلص المائي لثمار نبات توت العليق *Rubus ulmifolius* مع عقار السيكلوسبورين إذ يلاحظ جزيئة DNA في ترتيب اقرب الى الطبيعة عند مقارنتها بمجموعه السيطرة السالبة (قوة التكبير 100 X, الصبغة SYBER green).

وقد تم الحصول على تأكيد إضافي لتحفيز الموت الخلوي المبرمج بواسطة CsA من خلال اختبار المذنب، والذي أظهر زيادة في تلف الحمض النووي وتفتته في لحيوانات المنوية لدى الحيوانات المُعالجة CsA. لوحظ تلف مماثل في الحمض النووي لـ CsA على الخلايا الكلوية و الكبد (Pan et al., 2016، Elmoslemay et al., 2021) يمكن أن يزيد CsA أيضاً من تلف الحمض النووي وتجزؤه في الخلايا الكلوية والحيوانات المنوية (El-Magd et al., 2022).

وقد يعود السبب في الضرر الحاصل في النسيج إلى الزيادة في أنواع ROS وتقليل مستويات مضادات الأكسدة الناتجة بفعل عقار CSA مما يؤدي إلى الإخلال في التوازن التأكسدي داخل الخلية، ويمكن أن يؤدي المستوى العالي من الإجهاد التأكسدي إلى تلف الحمض النووي والبروتينات، إذ يثبط CSA تخليق الحمض النووي وتؤثر الجذور الحرة على تنظيم مسارات الإشارات في الخلية (Lai et al., 2017). فتهاجم الجذور الحرة الأحماض النووية، وعندما تخرق حواجز الغشاء يتسبب بتلفه والاختلال بنشاطه الخلوي وتدخل إلى نواة الخلية التي قد تسبب طفرات جينية وموت الخلايا الناجم عن تحطيم DNA والدهون، كذلك تؤدي إلى خلل وظيفي في الإنزيمات وتكوين البروتينات (Singh et al., 2004).

على المستوى الجزيئي، يُعد الإجهاد التأكسدي والالتهاب وموت الخلايا المبرمج الآليات الرئيسية الثلاث المشاركة في السمية الكبدية بواسطة CsA. في الإجهاد التأكسدي يرتبط CsA، وهو شديد المحبة للدهون، فوراً بأغشية الخلايا ويحفز أكسدة الدهون (كما يتضح من ارتفاع مستويات MDA) التي تسبب الإفراط في إنتاج الجذور الحرة، وخاصة من الميتوكوندريا، وتثبط أنشطة إنزيمات مضادات الأكسدة الخلوية الداخلية مثل SOD و CAT (Faheem et al., 2022; Korolczuk et al., 2016). ودعماً لذلك، وجد أيضاً مستويات عالية من MDA وانخفاض أنشطة SOD و CAT في الحيوانات المعالجة بـ CsA. تشير المستويات العالية من MDA إلى ارتفاع بيروكسيد الدهون الذي يسبب تلفاً تأكسدياً لمكونات الخلية المختلفة ويكبح نظام الدفاع المضاد للأكسدة الداخلي (SOD و CAT). بما أن الميتوكوندريا هي العضية الرئيسية التي تُنتج (ROS)، فإن CsA قد يُعطّل الفسفرة التأكسدية للميتوكوندريا في خلايا الكبد (التي تحتوي على ميتوكوندريا وفيرة)، مما يؤدي إلى إطلاق واسع لأنواع الأكسجين التفاعلية واختلال في توازن الأكسدة والاختزال (Wu et al., 2018; El-Sherbeeney and Nader, 2016).

لاحظ Nair وجماعته (2002) أنه بسبب انحلال الخلايا ونخرها الذي أظهرته المقاطع النسيجية المرضية نتيجة لتأثير الإجهاد التأكسدي، فإن الإجهاد التأكسدي هو الآلية الرئيسية لتلف الأنسجة في الأعضاء (Chandra et al., 2010). كما أوضح Mazzaferro وجماعته (1990) والذي يرتبط عادةً بتلف

الحمض النووي التأكسدي وزيادة محتوى NADPH ، وأن تراكم أنواع الأكسجين التفاعلية في الأعضاء قد يؤدي إلى تلف الحمض النووي مصحوبًا بزيادة مستويات 8-OHdG في الأنسجة. في حين أن تأثير أنواع الأكسجين التفاعلية على وظائف الميتوكوندريا وتنشيط نشاط إنزيمات ATPase ، بوساطة ROS ، قد يُسبب انكماشًا خلويًا ثانويًا (Son et al., 2010). وهذا قد يُفسر التناقص الذي يحدث في الخلايا (Abbas et al 2015).

قد يكون لتوقف النمو الناتج عن العوامل السامة للكلية آثار على تجديد خلايا الأنابيب، مما يعيق التعافي من الفشل الكلوي الحاد، وقد يساهم أيضًا في فرط نمو أنواع أخرى من الخلايا مثل الخلايا الليفية، مما يؤدي إلى التليف الخلالي. تتسبب العوامل الضارة بالحمض النووي في تنشيط الخلايا لمجموعة متنوعة من جينات الاستجابة للإجهاد، والتي يمكن أن تؤدي إلى توقف دورة الخلية من خلال عدد من المسارات المختلفة (Lally et al., 1999).

وجد Lai وجماعته (2017) أن الإجهاد التأكسدي الناجم عن السيكلوسبورين يسبب اضطرابات خطيرة في تخليق الحمض النووي DNA ، والحمض النووي الريبي RNA (المعتمد على الحمض النووي) ، والبروتينات ، والتي بدورها تعيق القدرة المتجددة للعضيات، تؤدي هذه الظاهرة التي لا رجعة فيها إلى الارتفاع الهائل في الإنزيمات الكبدية والنخر أو موت الخلايا المبرمج للخلايا الكبدية (Chandra et al., 2010). ويعد تناول السيكلوسبورين مصدرًا للتأثيرات الضارة مثل السمية الجينية ، والسمية الكلوية ، والسمية الكبدية ، والسمية القلبية ، مما يحدد من استخدامه السريري (Freitas et al., 2013) ، إذ يثبط CSA تخليق الحمض النووي وتؤثر الجذور الحرة على تنظيم مسارات الإشارات في الخلية فتهاجم الجذور الحرة الأحماض النووية،

من خلال دراسة El-Magd وجماعته (2022) توصل إلى أن سمية الكبد المُحفزة بـ CsA تتضمن تنشيط إجهاد الشبكة الإندوبلازمية المُحفز لموت الخلايا، كما يتضح من زيادة تنظيم الجينات المرتبطة بإجهاد الشبكة الإندوبلازمية (XBP1 و BIP و CHOP) والجينات المرتبطة بموت الخلايا (Bax و Casp3)، وخفض تنظيم الجين المضاد لموت الخلايا Bcl2 في أكباد الفئران المُعالجة بـ CsA. وشملت النتائج الجديدة الأخرى لهذه الدراسة تأثيرات مُحسنة لـ AVS ضد سمية الكبد المُحفزة بـ CsA، كما يتضح من انخفاض معاملات تلف الكبد (ALT و AST و ALP و GTP والبيليروبين)، واستعادة توازن الأكسدة والاختزال (انخفاض MDA وارتفاع إنزيمات مضادات الأكسدة)، وتنشيط إجهاد الشبكة الإندوبلازمية وتلف الحمض النووي، وتحسين أنسجة الكبد. ترتبط سمية الكبد المُحفزة بـ CsA باضطرابات وظيفية وبنوية في الكبد

وظيفيًا، افاد أن CsA زاد من أنشطة المصل ومستويات مؤشرات تلف الكبد (ALT، AST، ALP، GTP-، والبيليبروبين)، وخفض التعبير عن الألبومين. يشير هذا الاضطراب في وظائف الكبد إلى تحريض السمية الكبدية بواسطة CsA.

يعود سبب ملاحظة جزيئة DNA في ترتيب اقرب الى الطبيعة في المجموعة الوقائية بسبب النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات في نبات توت العليق *Rubus ulmifolius* بعدد وموقع مجموعات الهيدروكسيل. تمنع هذه المركبات الأكسدة وتحمي الخلايا من خلال منح ذرات الهيدروجين للأنواع المتفاعلة من الجذور الحرة، أن آلية عمل مركبات الفلافونويد كمضادات للأكسدة يمكن أن تكون مباشرة أو غير مباشرة الآلية المباشرة هي التبرع بأيونات الهيدروجين لتحديد الآثار السامة للجذور الحرة. كمضادات للأكسدة، ويمكن أن تعمل بشكل غير مباشر عن طريق زيادة التعبير الجيني المضاد للأكسدة الذاتية (Espada-Bellido et al., 2019).

الاستنتاجات والتوصيات

**Conclusions
and
Recommendations**

5. الاستنتاجات والتوصيات Conclusions & Recommendations

1.5. الاستنتاجات Conclusions:

من خلال نتائج الدراسة الحالية تم استنتاج ما يأتي :

1 - أحدث التجريع فمويا بعقار السيكلوسبورين اجهداً تأكسدياً أدى إلى اضرار نسجية في نسيج الكبد والكلى والخصيه التي تمثلت بوجود:

A (ارتفاع في معدل اقطار كل من الخلايا الكبدية والوريد المركزي والجيبانيات وانخفاض في معدل أقطار كل من الكبيبة وأقطار النبيب الملثوي الداني والنبيب الملثوي القاصي.

B (ارتفاع معنوي في معدل مستوى انزيمات الكبد (ALT,AST, ALP) وMDA ومستوى اليوريا والكرياتنين وانخفاض معنوي في مستوى GSH SOD CAT والبروتين الكلي والالبومين والكلوبيولين كذلك انخفاض معنوي في مستوى هرمونات الخصية LH. FSH . T مقارنة مع مجموعة السيطرة .

2 - احدث التجريع بعقار السيكلوسبورين الى تغيرات كبيرة في الحامض النووي DNA حيث يلاحظ الضرر الحاصل لجزيئة DNA على شكل مذنبات

3 - إن الدور الوقائي للمستخلص المائي لفاكهة توت العليق أدى الى معادلة الاجهاد التأكسدي الناجم عن التعرض لعقار السيكلوسبورين من خلال تحسين معظم التغيرات النسجية المرضية في الكبد والكلى والخصية والتقليل من التأثيرات السمية على وظائف الكبد والكلى والخصية من خلال:

A (انخفاض في معدل اقطار كل من الخلايا الكبدية والوريد المركزي والجيبانيات وارتفاع في معدل أقطار كل من الكبيبة وأقطار النبيب الملثوي الداني والنبيب الملثوي القاصي.

B (حصول انخفاض معنوي في مستوى انزيمات الكبد AST وALT و ALP وتركيز اليوريا والكرياتنين CAT بينما سبب ارتفاع معنوي في معدل تركيز البروتين الكلي والالبومين والكلوبيولين و تراكيز الكلوتاثيون وSOD كذلك ارتفاع معنوي في مستوى هرمونات الخصية T LH. FSH . مقارنة مع مجموعة عقار السيكلوسبورين.

4 - وان المستخلص المائي لفاكهة توت العليق لها دور وقائي كبير في على الحامض النووي DNA إذ يلاحظ جزيئه DNA في ترتيب اقرب الى الطبيعة

5 - تبين ان التجريع بالمستخلص المائي لفاكهة توت العليق وبتركيز 400 ملغم / كغم من وزن الجسم قلل وبشكل كبير من التلف الحاصل في نسيج الكبد والكلى والخصية وساهم بشكل فعال في إعادة المعايير الفسلجية والنسجية المدروسة الى معدلاتها الطبيعي .

2.5. التوصيات: Recommendations

- 1 - اجراء دراسات أخرى لمعرفة تأثير عقار السيكلوسبورين كمادة سامة على أعضاء أخرى كالبنكرياس والرئتين والطحال في الجرذان البيض.
- 2 - دراسة التأثير الوقائي والعلاجي للمستخلص الكحولي لفاكهة توت العليق على امراض المناعة الذاتية مثل التهاب الأمعاء الحاد والمفاصل.
- 3 - دراسة أجزاء مختلفة من فاكهة توت العليق مثل الأوراق والجذور ومعرفة المركبات الفعالة واختبار فعاليتها الوقائية ضد السرطان .
- 4 - ضرورة الالتزام بالجرعة والمدة المحددة للمثبط المناعي عقار السيكلوسبورين مع تجنب استخدامه لمدة طويلة لتجنب الآثار الجانبية على أعضاء وأنسجة الجسم وخصوصا الكلى والكبد والخصية وأعضاء الجسم كافة .
- 5 - زيادة الوعي والتثقيف عن طريق الاهتمام بطب الاعشاب من خلال الاستفادة منه في تقليل الآثار الجانبية الناتجة عن العلاجات الكيميائية المستخدمة.

المصادر

References

References

- Abbas, T., Ahmad, K. R., Ullah, A., Iqbal, S., & Raees, K. (2015).** Mitigating effects of Jambul against lead induced toxicity in epididymis and vas deferens of mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 13(11), 721.
- Abbiss, H., Maker, G. L., & Trengove, R. D. (2019).** Metabolomics approaches for the diagnosis and understanding of kidney diseases. *Metabolites*, 9(2), 34.
- Abdelhameed, M. F., El Hawary, S., El-Raey, M. A., & Abd El-Kader, E. M. (2025).** Rubus Species: A Natural Treasure Trove of Bioactives and Their Therapeutic Potential. *Egyptian Journal of Chemistry*, 68(3).
- Abdelkader, M., Hilal, M., Torky, A. R., Elsayed, H., & Allam, W. (2021).** The ameliorative effect of N-acetylcysteine on cyclosporine induced testicular toxicity in male albino rats. *Ain Shams Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology*, 36(1), 123-129.
- Abdu, D. A., & Majeed, S. N. (2012).** Identification of antioxidant compounds in red raspberry (*Rubus idaeus*) fruit in Kurdistan region (North Iraq). *J Appl Chem*, 2(3), 6–10.
- Abdul-Hamid, M., Abdella, E. M., Galaly, S. R., & Ahmed, R. H. (2016).** Protective effect of ellagic acid against cyclosporine A-induced histopathological, ultrastructural changes, oxidative stress, and cytogenotoxicity in albino rats. *Ultrastructural Pathology*, 40(4), 205-221.
- Abou Seif, H. S. (2016).** Physiological changes due to hepatotoxicity and the protective role of some medicinal plants. *Beni-suef University journal of basic and applied sciences*, 5(2), 134-146.
- Abu Bakar, M. F., Ismail, N. A., Isha, A., & Mei Ling, A. L. (2016).** Phytochemical composition and biological activities of selected wild berries (*Rubus*

- moluccanus L., R. fraxinifolius Poir., and R. alpestris Blume). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016(1), 2482930.
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020).** Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10.
- Ahmad, M., Masood, S., Sultana, S., Hadda, T. B., Bader, A., & Zafar, M. (2015).** Antioxidant and nutraceutical value of wild medicinal Rubus berries. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 241–247
- Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2009).** Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*, 154-171.
- Akbulut, S., Elbe, H., Eris, C., Dogan, Z., Toprak, G., Yalcin, E., ... & Turkoz, Y. (2015).** Effects of antioxidant agents against cyclosporine-induced hepatotoxicity. *journal of surgical research*, 193(2), 658-666.
- Akkari, H., Hajaji, S., B'chir, F., Rekik, M., & Gharbi, M. (2016).** Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of Rubus ulmifolius (Rosaceae) against Haemonchus contortus. *Veterinary Parasitology*, 221, 46–53.
- Akool, E. S. (2015).** Molecular mechanisms of the protective role of wheat germ oil against cyclosporin A-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmaceutical biology*, 53(9), 1311-1317.
- Al-Amran, F. G., Hadi, N. R., Kamoona, T. H., & Kadhum, Z. J. (2011).** Amelioration of chronic cyclosporine A-induced nephrotoxicity by telmisartan in rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(4), 500-505
- Alazouny, Z. M., Mohamed, E. M., & Ahmed, G. A. (2014).** Effect of cyclosporine A on the structure of adult albino rat testis and the role of lycopene

- supplementation: a histological and immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Histology*, 37(2), 292-303.
- Alejandro Vazquez-Cruz, M., Jimenez-Garcia, S. N., Torres-Pacheco, I., Horacio Guzman-Maldonado, S., Guevara-Gonzalez, R. G., & Miranda-Lopez, R. (2012).** Effect of maturity stage and storage on flavor compounds and sensory description of berrycactus (*Myrtillocactus geometrizans*). *Journal of food science*, 77(4), C366-C373.
- Ali, M., Khan, S. A., Dubey, P., Nath, A., Singh, J. K., Kumar, R., & Kumar, A. (2013).** Impact of arsenic on testosterone synthesis pathway and sperm production in mice. *Inno J Med Health Sci*, 4, 185-189.
- Ali, N., Shaoib, M., Shah, S. W. A., Shah, I., & Shuaib, M. (2017).** Pharmacological profile of the aerial parts of *Rubus ulmifolius* Schott. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 59.
- Ali, R.B., Klouz, A., Boubaker, S., Lakhal, M., d & Belkahia, C. (2009).** An animal model of testicular toxicity by cyclosporine: Evaluation and protection. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23(2), 241-246.
- Alqadi, R., Alqumia, A., Alhomoud, I. S., Alhowail, A., Aldubayan, M., Mohammed, H. A., ... & Khan, R. A. (2024).** Cyclosporine's immunosuppressive effects, entwined toxicity, and clinical modulations of an organ transplant drug. *Transplant Immunology*, 102147.
- Amor, K. T., Ryan, C., & Menter, A. (2010).** The use of cyclosporine in dermatology: part I. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(6), 925-946.
- Attia, A. A., Salama, A. F., Eldiasty, J. G., Mosallam, S. A. E. R., El-Naggar, S. A., El-Magd, M. A., ... & Elmetwalli, A. (2022).** Amygdalin potentiates the anti-cancer effect of Sorafenib on Ehrlich ascites carcinoma and ameliorates the associated liver damage. *Scientific Reports*, 12(1), 6494.

- Bakar, M. F. A., Ismail, N. A., Isha, A., & Ling, A. L. M. (2016).** Phytochemical composition and biological activities of selected wild
- Barbarino, J. M., Staatz, C. E., Venkataramanan, R., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2013).** PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, 23(10), 563-585.
- Bari, A., Dasgupta, A., Agarwal, T., Dada, T., & Sharma, N. (2025).** Clinical Efficacy and Safety of Preservative Free Cyclosporine in Dry Eye Disease. *Clinical Ophthalmology*, 1149-1154.
- Baughman, R. P., Meyer, K. C., Nathanson, I., Angel, L., Bhorade, S. M., Chan, K. M., ... & Whelan, T. (2012).** Monitoring of nonsteroidal immunosuppressive drugs in patients with lung disease and lung transplant recipients: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 142(5), e1S-e111S.
- Baykalir, B. G., Seven, P. T., Gur, S., & Seven, I. (2016).** The effects of propolis on sperm quality, reproductive organs and testicular antioxidant status of male rats treated with cyclosporine-A. *Animal Reproduction (AR)*, 13(2), 105-111.
- Belfield, A., and Golderg, G. M. (1971).** Revised assay for serum phenyl phosphatase activity using 4-amino-antipyrine-Enzyme., 12, 561–573.
- Bergmeyer, H. U., & Rej, M. H. and R. (1985).** International Federation Of Clinical Chemistry (Ifcc) Scientific Committee, *Analytical Section. Journal. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 24: 481–495.
- Blanco-Rodríguez, J., & Martinez-Garcia, C. (1997).** Apoptosis pattern elicited by oestradiol treatment of the seminiferous epithelium of the adult rat. *Reproduction*, 110(1), 61-70.

- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., & Stähelin, H. (1976).** Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and Actions*, 6(4), 468-475.
- Brabletz, T., Pietrowski, I., & Serfling, E. (1991).** The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. *Nucleic acids research*, 19(1), 61-67.
- Bramki, A., Benouchenne, D., Salvatore, M. M., Benslama, O., Andolfi, A., Rahim, N., Moussaoui, M., Ramoul, S., Nessah, S., & Barboucha, G. (2024).** In Vitro and In Silico Biological Activities Investigation of Ethyl Acetate Extract of *Rubus ulmifolius* Schott Leaves Collected in Algeria. *Plants*, 13(23), 3425.
- Calne, R. Y., Rolles, K., Thiru, S., McMaster, P., Craddock, G. N., Aziz, S., ... & Lewis, P. (1979).** Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *The lancet*, 314(8151), 1033-1036.
- Castro, R. I., Vásquez-Rojas, C., Cortiella, M. G. I., Parra-Palma, C., Ramos, P., & Morales-Quintana, L. (2022).** Evolution of the volatile organic compounds, phenols and antioxidant capacity during fruit ripening and development of *Rubus ulmifolius* Schott fruits. *Horticulturae*, 9(1), 13.
- Cavallini, L., Malendowicz, L. K., Mazzocchi, G., Belloni, A. S., & Nussdorfer, G. G. (1989).** Effects of prolonged cyclosporine-A treatment on the Leydig cells of the rat testis. *Virchows Archiv B*, 58(1), 215-220.
- Chandra, A. K., Chatterjee, A., Ghosh, R., & Sarkar, M. (2010).** Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 972-979.

- Chauhan, E. S., & Chauhan, U. (2022).** Nutritional and bioactive properties of *Rubus ulmifolius* schott (Blackberry): A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 41(3), 249–255.
- Chen Qing, C. Q., Zhang XiaoNan, Z. X., Yu HaoWei, Y. H., Yan-Wang, Y.-W., & Tang HaoRu, T. H. (2012).** Changes of total anthocyanins and proanthocyanidins in the developing blackberry fruits.
- Chen, K., Man, K., Metselaar, H. J., Janssen, H. L., Peppelenbosch, M. P., & Pan, Q. (2014).** Rationale of personalized immunosuppressive medication for hepatocellular carcinoma patients after liver transplantation. *Liver transplantation*, 20(3), 261-269.
- Chen, Y., Zhang, Z., Lin, Y., Lin, H., Li, M., Nie, P., ... & Zhang, Z. (2013).** Long-term impact of immunosuppressants at therapeutic doses on male reproductive system in unilateral nephrectomized rats: a comparative study. *BioMed research international*, 2013, 1-9.
- Chighizola, C. B., Ong, V. H., & Meroni, P. L. (2017).** The use of cyclosporine A in rheumatology: a 2016 comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 52, 401-423.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., & Green, D. R. (2010)** The BCL-2 family reunion. *Molecular cell*, 37(3), 299-310.
- Chlubek, D., & Poland, S. (2003).** Fluoride and oxidative stress. *Fluoride*, 36 ,(4) 217-228
- Clewell, R. A., Campbell, J. L., Ross, S. M., Gaido, K. W., Clewell III, H. J., & Andersen, M. E. (2010).** Assessing the relevance of in vitro measures of phthalate inhibition of steroidogenesis for in vivo response. *Toxicology in vitro*, 24(1), 327-334.
- Colombo, M. D., Perego, R., & Bellia, G. (2013).** Drug interaction and potential side effects of cyclosporine. *Adv Med Biol*, 74, 1-24.

- Cybulsky, A. V. (2017).** Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nature Reviews Nephrology*, 13(11), 681-696.
- da Silva, L. P., Pereira, E., Pires, T. C. S. P., Alves, M. J., Pereira, O. R., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019).** Rubus ulmifolius Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. *Food Research International*, 119, 34–43.
- Dauqan, E. M., Abdullah, A., & Sani, H. A. (2011).** Natural antioxidants, lipid profile, lipid peroxidation, antioxidant enzymes of different vegetable oils. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(4), 308-316.
- Del Bo, C., Martini, D., Porrini, M., Klimis-Zacas, D., & Riso, P. (2015).** Berries and oxidative stress markers: An overview of human intervention studies. *Food & function*, 6(9), 2890-2917.
- Diehl, A. M., & Day, C. (2017).** Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *New England Journal of Medicine*, 377(21), 2063-2072.
- Drobnis, E. Z., & Nangia, A. K. (2017).** Immunosuppressants and male reproduction. *Impacts of Medications on Male Fertility*, 179-210
- Duttagupta, I., Ghosh, K. C., & Sinha, S. (2016).** Synthetic studies toward nonribosomal peptides. *Studies in Natural Products Chemistry*, 48, 29-64.
- Ebefors, K., Bergwall, L., & Nyström, J. (2022).** The glomerulus according to the mesangium. *Frontiers in Medicine*, 8, 740527.
- Eftekhari, A., Hasanzadeh, A., Khalilov, R., Hosainzadegan, H., Ahmadian, E., & Eghbal, M. A. (2020).** Hepatoprotective role of berberine against paraquat-induced liver toxicity in rat. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 4969-4975.

- El-Magd, M. A., Zedan, A. M., Zidan, N. S., Sakran, M. I., Bahattab, O., Oyouni, A. A. A., ... & Elmoslemany, A. M. (2022). Avocado seeds-mediated alleviation of cyclosporine a-induced hepatotoxicity involves the inhibition of oxidative stress and proapoptotic endoplasmic reticulum stress. *Molecules*, 27(22), 7859.
- Elmoslemany, A. M., El-Magd, M. A., Ghamry, H. I., Alshahrani, M. Y., Zidan, N. S., & Zedan, A. M. (2021). Avocado seeds relieve oxidative stress-dependent nephrotoxicity but enhance immunosuppression induced by cyclosporine in rats. *Antioxidants*, 10(8), 1194.
- Elmotayam, A. K., Elnattat, W. M., Ali, G. A., El Khatteb, R. M., Abdelhameed, M. F., Ali, A. H., ... & Ahmed, S. R. (2022). Assessment of Ferula hermonis Boiss fertility effects in immature female rats supported by quantification of ferutinin via HPLC and molecular docking. *Journal of Ethnopharmacology*, 289, 115062.
- Elrod, J. W., Wong, R., Mishra, S., Vagnozzi, R. J., Sakthivel, B., Goonasekera, S. A., ... & Molkentin, J. D. (2010). Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca²⁺ exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(10), 3680-3687.
- El-Sherbeeney, N. A., and Nader, M. A. (2016). The protective effect of vildagliptin in chronic experimental cyclosporine A-induced hepatotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(3), 251-256.
- Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Álvarez, J. A., F. Barbero, G., and Ayuso, J. (2019). Extraction of antioxidants from blackberry (*Rubus ulmifolius* L.): Comparison between ultrasound-and microwave-assisted extraction techniques. *Agronomy*, 9(11), 745.

- Eyer, P., and Podhradský, D. (1986).** Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 153(1), 57-66.
- Ezez, D., Mekonnen, N., and Tefera, M. (2023).** Phytochemical analysis of *Withania somnifera* leaf extracts by GC-MS and evaluating antioxidants and antibacterial activities. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 581-590.
- Faheem, S. A., El-Sayed, N. M., Moustafa, Y. M., Saeed, N. M., and Hazem, R. M. (2022).** Pyrvinium pamoate ameliorates cyclosporin A-induced hepatotoxicity via the modulation of Wnt/ β -catenin signaling and upregulation of PPAR- γ . *International Immunopharmacology*, 104, 108538.
- Fahr, A. (1993).** Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clinical pharmacokinetics*, 24(6), 472-495.
- Faller, A., Schünke, M., Schünke, G., French, O., & Taub, E. (2004).** The human body: an introduction to structure and function. (No Title).
- Ferlemi, A. V., & Lamari, F. N. (2016).** Berry leaves: An alternative source of bioactive natural products of nutritional and medicinal value. *Antioxidants*, 5(2), 17.
- Ferrari, C. K. B. (2000).** Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. *BIOLOGIA-BRATISLAVA*-, 55(6), 581-590.
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021).** Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135.
- Forsythe, P., & Paterson, S. (2014).** Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. *Veterinary Record*, 174(S2), 13-21.

- Freethi, R., Raj, A. V., Ponniraivan, K., Khan, M. R., & Sundhararajan, A. (2016).** Study of serum levels of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase in chronic kidney disease. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 5(3), 49-56.
- Freitas, K. M., Monteiro, J. C., Gomes, M. L., Taboga, S. R., & Dolder, H. (2012).** Cyclosporin A causes impairment of the ventral prostate tissue structure of Wistar rats. *Human & experimental toxicology*, 31(12), 1262-1270.
- Freitas, K. M., Monteiro, J. C., Gomes, M. L., Taboga, S. R., & Dolder, H. (2013).** *Heteropterys tomentosa* (A. Juss.) infusion counteracts Cyclosporin A side effects on the ventral prostate. *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 30.
- Friedman, and Young. (2001).** Effects of disease on clinical laboratory tests (4th ed.). AACC press .
- Fu, Y., Zhou, X., Chen, S., Sun, Y., Shen, Y., & Ye, X. (2015).** Chemical composition and antioxidant activity of Chinese wild raspberry (< em > *Rubus hirsutus* < / em > Thunb.). *LWT - Food Science and Technology*, 60, 1262–1268.
- Galigher and Kozoloff, P. (1964).** Essential practical microtechnique . Lea and Febiger, Philadelphia : 41 – 44 .
- Gaurav, H., Yadav, D., Maurya, A., Yadav, H., Yadav, R., Shukla, A. C., ... & Palazon, J. (2023).** Biodiversity, biochemical profiling, and pharmacocommercial applications of *Withania somnifera*: A review. *Molecules*, 28(3), 1208.
- Ghanem, K. Z., Ramadan, M. M., Mohamed, R. S., Mohawed, O. A., Yassen, N. N., Abdel-Aziz, S. A., & Mohamed, E. N. (2024).** Exploring the Adverse Impacts of Cyclosporine A and the Preventative Abilities of *Moringa oleifera*

- Seed Oil: A Therapeutic Approaches Contrary to Negative Effects. *Egyptian Journal of Chemistry*, 67(12), 387-397.
- Ghosh, P., Sica, A., Cippitelli, M., Subleski, J., Lahesmaa, R., Young, H. A., & Rice, N. R. (1996).** Activation of Nuclear Factor of Activated T Cells in a Cyclosporin A-resistant Pathway (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7700-7704.
- Gillett, N. A., & Chan, C. (2000).** Applications of immunohistochemistry in the evaluation of immunosuppressive agents. *Human & experimental toxicology*, 19(4), 251-254.
- Gil-Martínez, L., Mut-Salud, N., Ruiz-García, J. A., Falcón-Piñeiro, A., Maijón-Ferré, M., Baños, A., ... & Gómez-Caravaca, A. M. (2023).** Phytochemicals determination, and antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer activities of blackberry fruits. *Foods*, 12(7), 1505.
- Gomes, M. L., Monteiro, J. C., Freitas, K. M., Sbervelheri, M. M., & Dolder, H. (2011).** Association of the infusion of *Heteropterys aphrodisiaca* and endurance training brings spermatogenetic advantages. *Biological Research*, 44(3), 235-241.
- Goodman, C., Lyon, K. N., Scotto, A., Smith, C., Sebrell, T. A., Gentry, A. B., ... & Bimeczok, D. (2021).** A high-throughput metabolic microarray assay reveals antibacterial effects of black and red raspberries and blackberries against *Helicobacter pylori* infection. *Antibiotics*, 10(7), 845.
- Graham, J., & Woodhead, M. (2010).** Rubus. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits* (pp. 179–196). Springer.
- Grogg, J. B., Fronzaroli, J. N., Oliveira, P., Bode, P. K., Lorch, A., Issa, A., ... & Fankhauser, C. D. (2021).** Clinicopathological characteristics and outcomes in men with mesothelioma of the tunica vaginalis testis: analysis of published

case-series data. Journal of cancer research and clinical oncology, 147, 2671-2679.

Gruev, T., Petrushevska-Tozi, L., Chakalarovski, K., & Ivanovski, N. (2003). Effect of cyclosporine therapy in transplanted patients-diagnostic values of tubular markers. *Почитувани*, 35.

Guest, E., & Townsend, C. C. (1966). *Flora of Iraq: Leguminales* (Vol. 3). Ministry of Agriculture of the Republic of Iraq.

Gumus, K., Mirza, G. E., Cavanagh, H. D., & Karakucuk, S. (2009). Topical cyclosporine A as a steroid-sparing agent in steroid-dependent idiopathic ocular myositis with scleritis: a case report and review of the literature. *Eye & Contact Lens*, 35(5), 275-278.

Guyton, A.C. and Hall, J.E. (2016). Text book of Medical Physiology, 11th Elsevier Inc.

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

Hajaji, S., Jabri, M.-A., Sifaoui, I., Lopez-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., B'chir, F., Valladares, B., Pinero, J. E., Lorenzo-Morales, J., & Akkari, H. (2017). Amoebicidal, antimicrobial and in vitro ROS scavenging activities of Tunisian *Rubus ulmifolius* Schott, methanolic extract. *Experimental Parasitology*, 183, 224–230.

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

- Hall, J. A., Waisglass, S. E., Mathews, K. A., & Tait, J. (2003).** Oral cyclosporin in the treatment of end-stage ear disease: a pilot study. *Veterinary Dermatology*, 14, 212.
- Hall, J. E. (2016).** Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, Jordanian Edition E-Book. Elsevier Health Sciences.
- He, Z., Qiu, J., Li, J., Zhao, D., Chen, G., & Chen, L. (2013, March).** Long-term effects of conversion from cyclosporine to rapamycin on testicular function and morphology in a rat transplantation model. In *Transplantation proceedings* (Vol. 45, No. 2, pp. 763-769). Elsevier.
- He, Z., Qiu, J., Li, J., Zhao, D., Chen, G., & Chen, L. (2013, March).** Long-term effects of conversion from cyclosporine to rapamycin on testicular function and morphology in a rat transplantation model. In *Transplantation proceedings* (Vol. 45, No. 2, pp. 763-769). Elsevier
- Holt, D. W., Johnston, A., Roberts, N. B., Tredger, J. M., & Trull, A. K. (1994).** Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring: report of the Association of Clinical Biochemists task force. *Annals of clinical biochemistry*, 31(5), 420-446.
- Hoseinpouran, M., Khaki, A. and Nazem, H(2015).** Assessment of antioxidant properties of allium cepa on serum antioxidants and spermatogenesis after consuming tartrazine in rat. *Biomedicine*, 7(4).
- Huang, X., Wu, Y., Zhang, S., Yang, H., Wu, W., Lyu, L., & Li, W. (2022).** Variation in bioactive compounds and antioxidant activity of Rubus fruits at different developmental stages. *Foods*, 11(8), 1169.
- Hudson, N. M. C. (1999).** Rethinking cystic fibrosis pathology glutathione system dysfunction and glutathione augmentation theory. *J. Pedia.*, 19, 129.
- Hummer, K. E. (2010).** Rubus pharmacology: antiquity to the present. *HortScience*, 45(11), 1587-1591.

- Hutson, J. C. (2006).** Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Experimental Biology and Medicine*, 231(1), 1-7.
- Ibraheem, S. R. (2022).** Effects of *Avena sativa* and *Glycyrrhiza glabra* leaves extracts on immune responses in serum cytokine and liver enzyme levels in NIH mice. *Archives of Razi Institute*, 77(5), 1845.
- Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K., & Shimoda, S. (2009, September).** Liver architecture, cell function, and disease. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 31, pp. 399-409). Springer-Verlag.
- Iwasaki, M., Fuse, H., & Katayama, T. (1995).** Histological and endocrinological investigations of cyclosporine effects on the rat testis. *Andrologia*, 27(3), 185-189
- Jadalhaq, A. M. I. (2011).** Risk of cigarette smoking on male fertility in Gaza Governorate, Gaza Strip.
- Jamalan, M., Ghaffari, M. A., Hoseinzadeh, P., Hashemitabar, M., & Zeinali, M. (2016).** Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. *International journal of fertility & sterility*, 10(2), 215.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017).** Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 7(1), 1–7.
- Jana, K., Jana, S., & Samanta, P. K. (2006).** Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats: possible an estrogenic mode of action. *Reproductive biology and endocrinology*, 4(1),
- Jeon YJ, Kim YS (2011).** Cyclosporine A inhibits albumin synthesis in Huh7 cells. *Korean J. Int. Med.* 26: 314-319.
- Junior, T. K., de Moura, C., Cruz, T. M., Marques, M. B., Carmo, M. A. V. D., Deolindo, C. T. P., ... & Granato, D. (2023).** Optimization of the green

chemistry-like extraction of phenolic compounds from grape (*Vitis labrusca* L.) and blackberry (*Rubus fruticosus* L.) seeds with concomitant biological and antioxidant activity assessments. *Plants*, 12(14), 2618.

Kant, V., Kumar Verma, P., & Kumar, P. (2009). Immunosuppressive drug therapy: An overview. *Journal of Immunology and Immunopathology*, 11(2), 21-32.

Kapturczak, M. H., Meier-Kriesche, H. U., & Kaplan, B. (2004). Pharmacology of calcineurin antagonists. In *Transplantation*, 36(2), S25-S32. Elsevier.

Karawya, F. S., & El-Nahas, A. F. (2006). The protective effect of vitamin C on Azathioprine induced seminiferous tubular structural changes and cytogenetic toxicity in albino rats. *Cancer Therapy*, 4, 125-134.

Kareem, M. A., & Obeid, A. K. (2020). Evaluation of The Effect of Aqueous Extract of *Lepidium Sativum* Seed on The Adverse Effects of Rat Liver Injury Induced by Sodium Nitrite. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 12(4), 4212-4216.

Karna, K. K. (2021). Re" Costus afer leaf extract protects against testicle damage caused by cyclosporine A in adult male Wistar rats through an antioxidant mechanism". *Andrologia*, 53(7), e13863.

Kebede, T., Gadisa, E., & Tufa, A. (2021). Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. *PloS One*, 16(3), e0249253.

Khadhim ,H. A. (2022).A Physiological - Histological - Molecular Study to Evaluate the Role of the Naringin nanocomposite in Improving the Efficiency of the Male Reproductive System in Albino Rats Treated with Cyclosporine. phd College of Education - Department of Biology. University of Al-Qadisiya. Republic of Iraq.

- Khan, M., Shobha, J. C., Mohan, I. K., Rao Naidu, M. U., Prayag, A., & Kutala, V. K. (2006).** Spirulina attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 26(5), 444- 451.
- Khattab, H. H., & Mansoury, M. M. (2020).** Costus afer leaf extract protects against testicle damage caused by cyclosporine A in adult male Wistar rats through an antioxidant mechanism. *Andrologia*, 52(5), e13561.
- Khudiar, K. K., & Hussein, G. J. (2017).** Effect of alcoholic extract of *Salvia officinalis* leaves on some physiological parameters aspects in acrylamide-treated rats. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 5(1), 47-55.
- Korolczuk, A., Caban, K., Amarowicz, M., Czechowska, G., & Irla-Miduch, J. (2016).** Oxidative stress and liver morphology in experimental cyclosporine A-induced hepatotoxicity. *BioMed research international*, 2016(1), 5823271.
- Kosasa T.S. (1981).** Measurement of Human Luteinizing Hormone. *Journal of Reproductive Medicine*, 26: 201-6
- Krauze-Baranowska, M., Glód, D., Kula, M., Majdan, M., Halasa, R., Matkowski, A., Kozłowska, W., & Kawiak, A. (2014).** Chemical composition and biological activity of *Rubus idaeus* shoots—a traditional herbal remedy of Eastern Europe. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1–12.
- Krueger, B. A., Trakshel, G. M., Sluss, P. M., & Maines, M. D. (1991).** Cyclosporin-mediated depression of luteinizing hormone receptors and heme biosynthesis in rat testes: a possible mechanism for decrease in serum testosterone. *Endocrinology*, 129(5), 2647-2654.
- Kuzu, M.; Yıldırım, S.; Kandemir, F.M.; Küçükler, S.; Çağlayan, C.; Türk, E.; Dörtbudak, M.B.(2019).** Protective effect of morin on doxorubicin-induced hepatorenal toxicity in rats. *Chem Biol Interact*, 308, 89–100.

- Lai, Q., Luo, Z., Wu, C., Lai, S., Wei, H., Li, T., ... & Yu, Y. (2017).** Attenuation of cyclosporine A induced nephrotoxicity by schisandrin B through suppression of oxidative stress, apoptosis and autophagy. *International Immunopharmacology*, 52, 15-23.
- Lally, C., Healy, E., & Ryan, M. P. (1999).** Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney international*, 56(4), 1254-1257.
- Lee, N. P., Mruk, D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2003).** Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis ?. *Biology of Reproduction*, 68(2), 489-508.
- Lin, Y., Zhang, J., Lei, W., Li, M., Zhang, Z., Lu, Y., ... & Chen, Y. (2019).** Diltiazem aggravates testicular function impairment induced by cyclosporine A or tacrolimus in unilateral nephrectomised rats. *Andrologia*, 51(5), e13251.
- MacDonald, A., Herbison, G. P., Showell, M., & Farquhar, C. M. (2010).** The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Human reproduction update*, 16(3), 293-311.
- Majeed, S. F., Hamza, N. M., & Obeid, A. K. (2023).** Study of the toxicological effects of flower of Hibiscus sabdariffa aqueous extract on some histological parameters of the kidneys in albino rat. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2414, No. 1). AIP Publishing.
- Malik, J., Choudhary, S., Mandal, S. C., Sarup, P., & Pahuja, S. (2022).** Oxidative Stress and Male Infertility: Role of Herbal Drugs. In *Oxidative Stress and Toxicity in Reproductive Biology and Medicine: A Comprehensive Update on Male Infertility Volume II* (pp. 137-159). Cham: Springer International Publishing.
- Mantovani, A., Byrne, C. D., Scorletti, E., Mantzoros, C. S., & Targher, G. (2020).** Efficacy and safety of anti-hyperglycaemic drugs in patients with non-

alcoholic fatty liver disease with or without diabetes: An updated systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes & metabolism*, 46(6), 427-441.

Manzoor, M. F., Hussain, A., Tazeddinova, D., Abylgazinova, A., & Xu, B. (2022). [Retracted] Assessing the Nutritional-Value-Based Therapeutic Potentials and Non-Destructive Approaches for Mulberry Fruit Assessment: An Overview. *Computational intelligence and neuroscience*, 2022(1), 6531483.

Martin, R. R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B., & Tzanetakis, I. E. (2013). Viruses and virus diseases of Rubus. *Plant Disease*, 97(2), 168–182.

Martins, M. S., Gonçalves, A. C., Alves, G., & Silva, L. R. (2023). Blackberries and mulberries: Berries with significant health-promoting properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12024.

Martins, M. S., Rodrigues, M., Flores-Félix, J. D., Garcia-Viguera, C., Moreno, D. A., Alves, G., ... & Gonçalves, A. C. (2024). The effect of phenolic-rich extracts of Rubus fruticosus, R. ulmifolius and Morus nigra on oxidative stress and caco-2 inhibition growth. *Nutrients*, 16(9), 1361.

Maslov, O., Komisarenko, M., Golik, M., Kolisnyk, S., Tkachenko, O., Kolisnyk, I., ... & Altukhov, A. (2023). Study of total antioxidant capacity of red raspberry (Rubus idaeus L.) shoots. *Vitae*, 30(1).

Mazzaferro, V., Porter, K. A., Scotti-Foglieni, C. L., Venkataramanan, R., Makowka, L., Rossaro, L., ... & Starzl, T. E. (1990). The hepatotropic influence of cyclosporine. *Surgery*, 107(5), 533.

McLachlan, R. I., O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., De Kretser, D. M., Pratis, K., & Robertson, D. M. (2002). Identification of specific sites of

- hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Recent progress in hormone research, 57(1), 149-179.
- Mehiou, A., Alla, C., Akissi, Z. L. E., Lucau-Danila, A., Bouanani, N., Legssyer, A., Hilbert, J.-L., Sahpaz, S., & Ziyat, A. (2024).** Rubus ulmifolius schott: A comprehensive review of its botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacological effects. *Journal of Berry Research*, 14(4), 301–328.
- Meng, Q., Manghwar, H., & Hu, W. (2022).** Study on supergenus Rubus L.: Edible, medicinal, and phylogenetic characterization. *Plants*, 11(9), 1211.
- Midzak, A. S., Liu, J., Zirkin, B. R., & Chen, H. (2007).** Effect of myxothiazol on Leydig cell steroidogenesis: inhibition of luteinizing hormone-mediated testosterone synthesis but stimulation of basal steroidogenesis. *Endocrinology*, 148(6), 2583-2590
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., & Milatović, D. (2011).** Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34(1), 1-9.
- Monteiro, J. C., Predes, F. S., Matta, S. L., & Dolder, H. (2008).** Heteropterys aphrodisiaca infusion reduces the collateral effects of cyclosporine A on the testis. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 291(7), 809-817.
- Morakinyo, A. O., Iranloye, B. O., Daramola, A. O., & Adegoke, O. A. (2011).** Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress. *Advances in medical sciences*, 56(1), 95-105.
- Morris, R. G. (2003).** Cyclosporin therapeutic drug monitoring-an established service revisited. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24(2), 33.

- Mostafavi-Pour Z, Khademi F, Zal F, Sardarian AR, Amini F (2013).** In vitro analysis of CsA-induced hepatotoxicity in HepG2 cell line: oxidative stress and $\alpha 2$ and $\beta 1$ integrin subunits expression. *Hepat. Mon.* 13(8): e11447
- Mukherjee, P. K., Bahadur, S., Harwansh, R. K., Biswas, S., & Banerjee, S. (2017).** Paradigm shift in natural product research: traditional medicine inspired approaches. *Phytochemistry Reviews*, 16, 803–826.
- Muniyandi, K., George, E., Sathyanarayanan, S., George, B. P., Abrahamse, H., Thamburaj, S., & Thangaraj, P. (2019).** Phenolics, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of *Rubus* fruits from Western Ghats, India. *Food Science and Human Wellness*, 8(1), 73-81.
- Naeem, M., Markus, M. R., Mousa, M., Schipf, S., Dörr, M., Steveling, A., ... & Ittermann, T. (2022).** Associations of liver volume and other markers of hepatic steatosis with all-cause mortality in the general population. *Liver International*, 42(3), 575-584.
- Nagy, A. M., Abdelhameed, M. F., Elkarim, A. S. A., Sarker, T. C., AbdelGawad, A. M., Elshamy, A. I., & Hammam, A. M. (2024).** Enhancement of female rat fertility via ethanolic extract from *Nigella sativa* L.(Black Cumin) seeds assessed via HPLC-ESI-MS/MS and molecular docking. *Molecules*, 29(3), 735.
- Nagy, A. M., Abdelhameed, M. F., Rihan, S., Diab, K. A., El-Saied, M., Mohamed, S. S., ... & Hammam, A. M. M. (2024).** Rosemary officinalis extract mitigates potassium dichromate-induced testicular degeneration in male rats: Insights from the Nrf2 and its target genes signaling pathway. *Toxicology Reports*, 13, 101700.
- Nair, N., Bedwal, R. S., & Mathur, R. S. (1995).** Effect of adrenalectomy and adrenalectomy+ hydrocortisone treatment on histopathological, biochemical

- and zinc and copper profiles in rat testes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 33(9), 655-663.
- Nair, N., Bedwal, R. S., & Mathur, R. S. (2002).** Effect of adrenalectomy on rat epididymidis. *Cell*, 176, 4-96.
- Najafi, G., Farokhi, F., Jalali, A. S., & Akbarizadeh, Z. (2016).** Protection against cyclosporine-induced reprotoxicity by *Satureja khuzestanica* essential oil in male rats. *International journal of fertility & sterility*, 9(4), 548.
- Newsome, P., Francque, S., Harrison, S., Ratzu, V., Van Gaal, L., Calanna, S., ... & Sanyal, A. (2019).** Effect of semaglutide on liver enzymes and markers of inflammation in subjects with type 2 diabetes and/or obesity. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 50(2), 193-203.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R. M., & Bernardi, P. (1996).** Interactions of Cyclophilin with the Mitochondrial Inner Membrane and Regulation of the Permeability Transition Pore, a Cyclosporin A-sensitive Channel (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 2185-2192
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015).** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.
- Okatan, V. (2018).** Phenolic compounds and phytochemicals in fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from the Aegean region in Turkey. *Folia Horticulturae*, 30(1), 93.
- Olive, P. L. and Banáth, J. P. (2006).** The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), 23–29.
- Owens, C. W. I. and Belcher, R. V. (1965).** A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochemical Journal*, 94(3): 705–711.
- Ozkan, G., Kamiloglu, S., Ozdal, T., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2016).** Potential use of Turkish medicinal plants in the treatment of various diseases. *Molecules*, 21(3), 257.

- Pan, X., Wang, X., Wang, X., Zhang, W., Sun, Z., Liang, X., ... & Li, Z. (2018).** Protective effects of new Wenshen Shengjing Decoction on cyclosporine induced impairment of testosterone synthesis and spermatogenic apoptosis. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(1), 813-821.
- Pandit, A.; Sachdeva, T. and Bafna, P. (2012).** Drug-induced hepato-toxicity: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(5): 233- 243.
- Panizzi, L., Caponi, C., Catalano, S., Cioni, P. L., & Morelli, I. (2002).** In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 165–168.
- Pant, P., Pandey, S., & Dall’Acqua, S. (2021).** The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: A literature review. *Chemistry & Biodiversity*, 18(11), e2100345.
- Pari, L., & Sivasankari, R. (2008).** Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundamental & clinical pharmacology*, 22(4), 395-401.
- Peces, R., De la Torre, M., & Urrea, J. M. (1994).** Pituitary-testicular function in cyclosporin-treated renal transplant patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 9(10), 1453-1455.
- Petrovska, B. B. (2012).** Historical review of medicinal plants’ usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1.
- Qin, X., and Chen, Z. (2019).** Metabolic dependence of cyclosporine A on cell proliferation of human non-small cell lung cancer A549 cells and its implication in post-transplant malignancy. *Oncology reports*, 41(5), 2997-3004.
- Quideau, S., & Feldman, K. S. (1996).** Ellagitannin chemistry. *Chemical Reviews*, 96(1), 475–504.

- Rajfer, J., Sikka, S. C., Lemmi, C., & Koyle, M. A. (1987).** Cyclosporine inhibits testosterone biosynthesis in the rat testis. *Endocrinology*, 121(2), 586-589.
- Rezzani, R. (2004).** Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 39(2), 85-128.
- Ruiz-Rodríguez, B. M., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., de Cortes Sánchez-Mata, M., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., & Tardío, J. (2014).** Wild *Arbutus unedo* L. and *Rubus ulmifolius* Schott fruits are underutilized sources of valuable bioactive compounds with antioxidant capacity. *Fruits*, 69(6), 435-448.
- Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., & Talebi, A. R. (2016).** Etiologies of sperm oxidative stress. *International journal of reproductive biomedicine*, 14(4), 231.
- Sadik, H., Ouazzania, C., Moustaghfir, A., El Ghammarti, S., Er-Ramly, A., Touzani, A., ... & Balouch, L. (2024).** Nutritional Qualities of Different Commercial Raspberries Consumed in Morocco. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 8(4), 6868-6876.
- Safarnavadeh, T., & Rastegarpanah, M. (2011).** Antioxidants and infertility treatment, the role of *Satureja Khuzestanica*: A mini-systematic review. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 9(2), 61.
- Salinas-Carmona, M. C., Pérez, L. I., Galan, K., & Vázquez, A. V. (2009).** Immunosuppressive drugs have different effect on B lymphocyte subsets and IgM antibody production in immunized BALB/c mice. *Autoimmunity*, 42(6), 537-544.
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A., & Manzano-Agugliaro, F. (2020).** Worldwide research trends on medicinal plants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10), 3376.

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

Schlegel, P. N., & Katzovitz, M. A. (2020). Male reproductive physiology. *Urologic Principles and Practice*, 41-62.

Schmelzer, G. H., Gurib-Fakim, A., & Schmelzer, G. H. (Eds.). (2008). *Medicinal plants* (Vol. 11). Prota.

Schulz, M., Borges, G. D. S. C., Gonzaga, L. V., Seraglio, S. K. T., Olivo, I. S., Azevedo, M. S., ... Fett, R. (2015). Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. *Food Research International*, 77, 125–131.

Schulz, M., Seraglio, S. K. T., Della Betta, F., Nehring, P., Valese, A. C., Daguer, H., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2019). Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food Research International*, 122, 627–634.

Seethalakshmi, L., Flores, C. A. R. L. O. S., Khauli, R. B., Diamond, D. A., & Menon, M. (1990a). Evaluation of the effect of experimental cyclosporine toxicity on male reproduction and renal function. Reversal by concomitant human chorionic gonadotropin administration. *Transplantation*, 49(1), 17-19.

Seethalakshmi, L., Flores, C., Carboni, A. A., Bala, R., Diamond, D. A., & Menon, M. (1990c). Cyclosporine: its effects on testicular function and fertility in the prepubertal rat. *Journal of andrology*, 11(1), 17-24.

Seethalakshmi, L., Flores, C., Malhotra, R. K., Pallias, J. D., Tharakan, D., Khauli, R. B., & Menon, M. (1992). The mechanism of cyclosporine's action in the inhibition of testosterone biosynthesis by rat Leydig cells in vitro. *Transplantation*, 53(1), 190-195.

- Seraglio, S. K. T., Schulz, M., Nehring, P., Della Betta, F., Valese, A. C., Daguer, H., ... Costa, A. C. O. (2018).** Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. *Food Chemistry*, 239, 649–656.
- Serrya, M. S., Nader, M. A., & Abdelmageed, M. E. (2021).** Hepatoprotective effect of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib against cyclosporine-A induced liver injury in rats through blocking the Bax/Cytochrome C/caspase-3 apoptotic signaling pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(6), 1-13.
- Shah, H. M. S., Singh, Z., Kaur, J., Hasan, M. U., Woodward, A., & Afrifa-Yamoah, E. (2023).** Trends in maintaining postharvest freshness and quality of Rubus berries. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(6), 4600–4643.
- Sharma, R. K., Pasqualotto, F. F., Nelson, D. R., & Agarwal, A(2001) .** Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*, 22(4), 575-583.
- Sikka, S. C., Bhasin, S., Coy, D. C., Koyle, M. A., Swerdloff, R. S., & Rajfer, J. (1988a).** Effects of cyclosporine on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat: mechanism of action. *Endocrinology*, 123(2), 1069-1074.
- Simoni, M., Gromoll, J., & Nieschlag, E. (1997).** The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine reviews*, 18(6), 739-773.
- Singh, R. P., Sharad, S., & Kapur, S. (2004).** Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. *J Indian Acad Clin Med*, 5(3), 218-225.
- Sinha-Hikim, I., Artaza, J., Woodhouse, L., Gonzalez-Cadavid, N., Singh, A.B., Lee, M.I., Storer, T.W., Casaburi, R., Shen, R. and Bhasin, S. (2002).** Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is

associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283 (1), E154-164.

Siwicki, M., Gort-Freitas, N. A., Messemaker, M., Bill, R., Gungabeesoon, J., Engblom, C., ... & Pittet, M. J. (2021). Resident Kupffer cells and neutrophils drive liver toxicity in cancer immunotherapy. *Science immunology*, 6(61), eabi7083.

Skrovankova, S., Ercisli, S., Ozkan, G., Ilhan, G., Sagbas, H. I., Karatas, N., ... & Mlcek, J. (2022). Diversity of phytochemical and antioxidant characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruits from Turkey. *Antioxidants*, 11(7), 1339.

Socha, M. W., Flis, W., Wartęga, M., Szambelan, M., Pietrus, M., & Kazdepka-Ziemińska, A. (2023). Raspberry leaves and extracts-molecular mechanism of action and its effectiveness on human cervical ripening and the induction of labor. *Nutrients*, 15(14), 3206.

Son, Y. O., Hitron, J. A., Wang, X., Chang, Q., Pan, J., Zhang, Z., ... & Shi, X. (2010). Cr (VI) induces mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis through reactive oxygen species-mediated p53 activation in JB6 C141 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 245(2), 226-235.

Speit, G.; & Rothfuss, A. (2012). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In *DNA Repair Protocols* : 79–90. Springer.

Squire, L., Berg, D., Bloom, F. E., Du Lac, S., Ghosh, A., & Spitzer, N. C. (Eds.). (2012). *Fundamental neuroscience*. Academic press. (Squire et al. 2012)

Srinivas, M., Agarwala, S., Gupta, S. D., Das, S. N., Jha, P., Misro, M. M., & Mitra, D. K. (1998). Effect of cyclosporine on fertility in male rats. *Pediatric surgery international*, 13(5-6), 388-391.

- Sukhorum, W., & Iamsaard, S. (2017).** Changes in testicular function proteins and sperm acrosome status in rats treated with valproic acid. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(8), 1585-1592.
- Suvarna , S.K. , Lyaton , C. and Bancroft , J. D. (2013) .** Bancroft ,s Theory and practice of histological technique . Seven ed. Elsevier Limited, China. Xiv-604.
- Tabarki, S., Aouadhi, C., Mechergui, K., Hammi, K. M., Ksouri, R., Raies, A., & Toumi, L. (2017).** Comparison of phytochemical composition and biological activities of *Rubus ulmifolius* extracts originating from four regions of Tunisia. *Chemistry & Biodiversity*, 14(1), e1600168.
- Tao, J., Zhang, Y., Soong, T. W., & Li, S. (2006).** Expression of urocortin 2 and its inhibitory effects on intracellular ca^{2+} via L-type voltage-gated calcium channels in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neuropsychopharmacology* , 31(12), 2600-2609.
- Tapia, C., Nessel, T. A., & Zito, P. M. (2018).** Cyclosporine.
- Tedesco, D., & Haragsim, L. (2012).** Cyclosporine: a review. *Journal of transplantation*, 2012(1), 230386.
- Telailia, N., & Hacène, F. R. I. H. (2020).** A physical psychological factor in immunostimulation activity and homeostasis safeguarding. *Authorea Preprints*, 2020,1-10
- Thongboon, L., Senarat, S., Kettratad, J., Huskul, A., Jiraungkoorskul, W., Poolprasert, P., ... & Wongthamwanich, N. (2017).** Microanatomical structure of the dog-faced water snake (*Cerberus rynchops*) from Thailand: A functional unit of the kidney. *Veterinary Integrative Sciences*, 15(3), 189-197.
- Tietz, N. W. (1986).** Textbook of clinical chemistry . ,W.B. Saunders Philadelphia.

- Tietz, N. W. (1995).** Clinical guide to laboratory tests. In Clinical guide to laboratory tests (pp. 1096-1096).
- Tirmenstein, M. A., Nicholls-Grzowski, F. A., Zhang, J. G., & Fariss, M. W. (2000).** Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chemico-biological interactions*, 127(3), 201-217
- Tokunaga, T., Morshed, S. R., Otsuki, S., Takayama, F., Satoh, T., Hashimoto, K.,... & Sakagami, H. (2003).** Effect of antioxidants, oxidants, metals and saliva on cytotoxicity induction by sodium fluoride. *Anticancer research*, 23(5A), 3719-3726.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. H. (2018).** Principles of anatomy and physiology. John Wiley & sons.
- Treuting, P. M., Dintzis, S. M., & Montine, K. S. (2018).** Comparative Anatomy and Histology. In *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*, Second Edition
- Triggiani, D., & Franconi, R. (2018).** *Rubus ulmifolius*: traditional, current and future pharmaceutical uses. *Current Traditional Medicine*, 4(3), 192–203.
- Trull, A., Hughes, V., Cooper, D., Wilkins, M., Gimson, A., Friend, P., ... & Park, G. (2002).** Influence of albumin supplementation on tacrolimus and cyclosporine therapy early after liver transplantation. *Liver transplantation*, 8(3), 224-232.
- Tugwell, P. (1995).** International consensus recommendations on cyclosporin use in rheumatoid arthritis. *Drugs*, 50(Suppl 1), 48-56.
- Türk, G., Sönmez, M., Çeribaşı, A. O., Yüce, A., & Ateşşahin, A. (2010).** Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages

- associated with oxidative stress by ellagic acid. *International immunopharmacology*, 10(2), 177-182.
- Türk, G., Sönmez, M., Çeribaşı, A. O., Yüce, A., & Ateşşahin, A. (2010).** Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damage associated with oxidative stress by ellagic acid. *International immunopharmacology*, 10(2), 177-182.
- Uz E, Uz B, Kaya A, Akdeniz D, Ruzgaresen NB, Uz E, Turgut F, Bayrak R, and Akcay A (2012).** Protective effect of erdosteine on cyclosporine induced chronic nephrotoxicity in rats. *Nephro-Urol. Mon.* 3(4): 280–284.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007)** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44 -84 .
- Vangaveti, S., Das, P., & Kumar, V. L. (2021).** Metformin and silymarin afford protection in cyclosporine A induced hepatorenal toxicity in rat by modulating redox status and inflammation. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 35(1), e22614.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021).** Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.
- Vega, E. N., Molina, A. K., Pereira, C., Dias, M. I., Heleno, S. A., Rodrigues, P., ... & Barros, L. (2021).** Anthocyanins from *Rubus fruticosus* L. and *Morus nigra* L. applied as food colorants: A natural alternative. *Plants*, 10(6), 1181.
- Venugopal, R., & Liu, R. H. (2012).** Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. *Food Science and Human Wellness*, 1(1), 1-13.

- Venugopal, R., & Liu, R. H. (2018).** Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. *Food Science and Human Wellness*, 1(1), 1-13.
- Virtanen, H. E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K. M., Skakkebaek, N. E., & Toppari, J. (2005).** Testicular dysgenesis syndrome and the development and occurrence of male reproductive disorders. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(2), 501-505.
- Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., & Masson, P. (2017).** Chronic kidney disease. *The lancet*, 389(10075), 1238-1252.
- Weiji, N., Elseendoorm, T.J. and Lentjes, E.G. (2004).** Supplementation with antioxidant micronutrients and cancer patients treated with cisplatin based chemotherapy: A randomized double blind placebo-controlled study. *E. Ur. Journal Cancer*, 40(11), 1713-1723.
- Williams, K. H., Shackel, N. A., Gorrell, M. D., McLennan, S. V., & Twigg, S. M. (2013).** Diabetes and nonalcoholic fatty liver disease: a pathogenic duo. *Endocrine reviews*, 34(1), 84-129.
- Wopara, I.; Uwakwe, A.A.;Modo, E.U.; Ikenazor, H.O.; Offor, H. and Ofodile ,J.O. (2018).** Possible effect of *Sphenocentrum jollyanum*, *Baphia nitida* and seeds of *Pinus koraiensis* and sildenafil sodium, potassium, urea and creatinine levels of albino rats. *Int. Journal. Biol. Res.*, 3(2): 45-50.
- Wu, Q., Wang, X., Nepovimova, E., Wang, Y., Yang, H., & Kuca, K. (2018).** Mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity: Oxidative stress, autophagy, and signalings. *Food and chemical toxicology*, 118, 889-907.
- Yao, Y., Zang, Y., Qu, J., Tang, M., & Zhang, T. (2019).** The toxicity of metallic nanoparticles on liver: the subcellular damages, mechanisms, and outcomes. *International journal of nanomedicine*, 8787-8804.

- Yazdani, I., Majdani, R., Ghasemnejad-Berenji, M., & Dehpour, A. R. (2019).** Comparison of multiple doses of cyclosporine A on germ cell apoptosis and epididymal sperm parameters after testicular ischemia/reperfusion in rats. *Experimental and molecular pathology*, 110, 104271.
- Ye, L., Su, Z. J., & Ge, R. S. (2011).** Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*, 16(12), 9983-10001.
- Ye, Y., Chen, W., and Gu, M. (2020).** Serum globulin and albumin to globulin ratio as potential diagnostic biomarkers for periprosthetic joint infection: a retrospective review. *Journal Orthop Surg Res* 15, 459 .
- Yilmaz, D. E., Kirschner, K., Demirci, H., Himmerkus, N., Bachmann, S., & Mutig, K. (2022).** Immunosuppressive calcineurin inhibitor cyclosporine A induces proapoptotic endoplasmic reticulum stress in renal tubular cells. *Journal of Biological Chemistry*, 298(3), 101589.
- Young, D. S., & Friedman, R. B. (2001).** Effects of disease on clinical laboratory tests. (No Title).
- Zeinab, M. A. A., Eman, M. M., & Gehan, A. A. (2014).** Effect of cyclosporine-A on the structure of adult albino rat testis and the role of lycopene supplementation: a histological and immunohistochemical study. *Egyptian Journal of Histology*, 37 (2), 292-303.
- Zengin, G., Ferrante, C., Senkardes, I., Gevrenova, R., Zheleva-Dimitrova, D., Menghini, L., Orlando, G., Recinella, L., Chiavaroli, A., & Leone, S. (2019).** Multidirectional biological investigation and phytochemical profile of *Rubus sanctus* and *Rubus ibericus*. *Food and Chemical Toxicology*, 127, 237–250.
- Zhang, S., Chen, W., & Zhu, C. (2021).** Liver Structure. *Artificial Liver*, 21-47.

- Zhong, Z., Arteel, G. E., Connor, H. D., Yin, M., Frankenberg, M. V., Stachlewitz, R. F., ... & Thurman, R. G. (1998).** Cyclosporin A increases hypoxia and free radical production in rat kidneys: prevention by dietary glycine. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 275(4), 595-604.
- Zhuo, J. L., & Li, X. C. (2013).** Proximal nephron. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1079.
- Zia-Ul-Haq, M., Riaz, M., De Feo, V., Jaafar, H. Z. E., & Moga, M. (2014).** Rubus fruticosus L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules*, 19(8), 10998–11029.
- Zirkin, B. R. (1998).** Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. In *Seminars in cell & developmental biology*, 9(4), 417-421.
- Živković, L., Topalović, D., Đelić, N., Popović, P., Marković, M., Gunjić, I., & Spremo-Potparević, B. (2024).** The basic principles of DNA damage detection by the alkaline comet assay. *Arhiv za farmaciju*, 74(4), 556-558.

Abstract

The current study aimed to investigate the protective effect of the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* fruit in male albino rats treated with cyclosporine (CsA) by studying some histological, physiological, and genetic changes. The study revealed the chemical content of the aqueous extract of raspberry fruit and characterized the compounds using Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS). Nine chemical compounds were identified: 12,9-Octadecadienoic acid / Hexadecanoic acid, cyclohexyl ester / Methyl trans-9-octadecenoate / 2-Chloroethyl linoleate / Dimethylcyclohexene 4,4 / Ethylimidazole 2- / Pentanedinitrile, 2-methyl / -Dioxolane, 2-phenyl 1,3- / 2-Amino-2-oxoethyl acetate

The study was conducted in the holy Karbala Governorate during the period extending from mid-October 2024 to the end of February 2025. The study was implemented in the animal house of the College of Pharmacy / University of Karbala and in the laboratories of the College of Education for Pure Sciences / Department of Biology.

Forty-eight adult male rats, weighing between (230-250 g) and aged between (12-14) weeks, were divided into two experiments. The first experiment was to test the effective dose of the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* plant. It included determining the most effective concentration of the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* plant among three ascending concentrations (200, 300, 400 mg/kg). Its protective role against oxidative stress caused by treatment with cyclosporine was tested for 30 days. (24) male white rats were used and divided systematically into four groups, with (6) animals for each group. The first group was the negative control group, which received normal water, and the first prevention group was dosed orally with the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* at a concentration of (200 mg/kg) of body weight, 4 hours before being dosed with cyclosporine at a concentration of (0.2) mg/kg. The second prevention group received an oral dose of 300 mg/kg of *Rubus ulmifolius* aqueous extract, 4 hours before receiving 0.2 mg/kg of cyclosporine. The

third prevention group received an oral dose of 400 mg/kg of raspberry aqueous extract, 4 hours before receiving 0.2 mg/kg of cyclosporine. Twenty-four hours after the last dose, blood samples were drawn by cardiac puncture and left for 30 minutes to clot. They were then centrifuged (3,000 rpm for 15 minutes) to separate the serum, which was used to estimate superoxide dismutase (SOD) activity, which has been used as an indicator of the extract's effectiveness against the oxidative stress caused by cyclosporine treatment. The second experiment used (24) white male rats, which were randomly distributed into four groups (6 rats per group). The first was left untreated and was considered the negative control group (G1). The second group (G2) was dosed every other day with cyclosporine at a concentration of (0.2) mg/kg of body weight for a period of (30) days and was considered the positive control group. The third group (G3) was dosed daily with the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* at a concentration of (400) mg/kg of body weight for a period of (30) days. As for the fourth group (G4), it was dosed daily with the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* at a concentration of (400 mg/kg) of body weight, 4 hours before being orally dosed with cyclosporine at a concentration of (0.2 mg/kg) every other day for a period of 30 days.

Blood samples were collected for the above groups one month after dosing. Histological sections of the liver, kidneys, and testes were taken to study the histological changes, which included: measuring the diameters of the hepatocytes, sinusoids, and central vein diameters, as well as measuring the diameters of the glomerulus, proximal convoluted tubule, and distal convoluted tubule. Blood serum was taken to measure the following biochemical parameters: levels of liver enzymes Aspartate transaminase (AST), Alanine transaminase (ALT), Alkaline phosphatas, and estimating the concentration rate of total protein, albumin, globulin, urea, creatinine, Malondialdehyde (MDA), and glutathione. Glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) concentration, and serum levels of testicular hormones including testosterone, luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) were measured. A comet assay, also called the liver comet test, was also performed to measure the rate of DNA damage.

Dosing experimental animals with cyclosporine (CsA) resulted in histological changes in the liver, represented by congestion and dilation of the central vein, severe irregularity of the hepatic cords, congestion and dilation of the portal vein, severe infiltration of inflammatory cells with dilation of the hepatic sinusoids, degeneration and necrosis of hepatocytes. A significant increase ($P < 0.05$) was observed in the average diameters of the hepatocytes, sinusoids, and central vein compared to the negative control group. The histological changes of the kidney were represented by atrophy of the glomerulus, increased Bowman's space, and destruction of the walls of the urinary tubules, with congestion of the blood vessels between the renal tubules, sloughing of the lining epithelium, infiltration of inflammatory cells, hemorrhage between the renal tubules, degeneration of the urinary tubule cells, and necrosis of the tubular lining, with a significant decrease ($P < 0.05$) in the average diameters of the glomerulus, the proximal convoluted tubule, and the distal convoluted tubule. As for the histological changes specific to the testis, they were represented by the presence of interstitial spaces between the seminiferous tubules, and there were few sperm in the tubule cavities, with a reduction and disintegration of the interstitial tissue, a decrease in the Leydig cells, a decrease in the size of the germinal epithelial cell layer, degeneration of the germinal layer, and disintegration of its cells, compared to the negative control group (G1). A significant increase ($P < 0.05$) was observed in the average levels of liver enzymes (AST, ALT, ALP), urea, creatinine, and MDA, while a significant decrease ($P < 0.05$) was observed in the average levels of total protein, albumin, globulin, GSH, SOD, CAT, and testosterone (LH) (FSH). Oral administration of the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* to rats in the G3 did not show any histological changes in the liver, kidney, and testicular tissues compared to the negative control group (G1). There were no significant differences in the average diameters of both the liver and kidneys in the G3 compared to the negative control group. A significant increase ($P < 0.05$) was observed in the level of total protein, globulin, albumin, GSH, SOD, and testosterone (LH) (FSH) for the G3 compared with the positive control group (G2). A significant decrease ($P < 0.05$) occurred in the level

of enzymes (ALP, AST, ALT), urea and creatinine levels, and in the level of MDA in the G3 compared with G2.

In the fourth group (G4), the tissue was closer to normal compared to the negative control group (G1). As for the diameter rate, a significant decrease ($P<0.05$) was observed in both groups for the diameter rate of each of the hepatocytes, central vein, and sinusoids compared to the positive control group (G2). As for the kidney tissue, the histological changes in the fourth group (G4) were represented by no clear damage to the glomerulus, and the tissue was closer to normal. There was the presence of Bowman's capsule and Bowman's space with the normal structure of the distal and proximal urinary tubules compared to the positive control group (G2). There was a significant increase ($P<0.05$) in the diameter rate of each of the glomerulus, the proximal convoluted tubule, and the distal convoluted tubule compared to the positive control group (G2), respectively. As for the histological changes in the testicular tissue in the G4, the tissue was observed to be closer to normal, as sperm-generating cells appeared, and their cavities were filled with sperm, with the presence of Leydig cells in the interstitial tissue and an increase in the number of cell layers. The germinal epithelium that forms sperm. The results of the current study also showed that the group treated with aqueous extract of *Rubus ulmifolius* at a concentration of (400) mg/kg with cyclosporine showed a significant decrease ($P<0.05$) in the levels of liver enzymes (ALT, AST, ALP), urea, creatinine and MDA and a significant increase ($P<0.05$) in the levels of total protein, globulin, albumin, SOD, GSH, CAT, and the levels of testosterone ,LH and FSH compared to the positive control group (G2). Regarding the genetic aspect of liver tissue, a significant increase ($P<0.05$) was observed in the rate of DNA molecule fragmentation in the second group (G2) dosed with (0.2) mg/kg cyclosporine compared to the negative control group (G1).

While there was a significant decrease ($P<0.05$) in the percentage of DNA fragmentation in the third group (G3), which was treated with the aqueous extract of mulberry fruit, and also in the G4, which was treated with the aqueous extract of *Rubus*

ulmifolius four hours before cyclosporine, compared to the positive control group (G2). The current study concludes the effectiveness of the aqueous extract of *Rubus ulmifolius* at a concentration of 400 mg/kg in inhibiting free radical activity and reducing cyclosporine-induced oxidative stress in liver, kidney and testicular tissue, as well as some functional and genetic parameters in male albino rats.



University of Kerbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology

**Histological, physiological and genetic study of the effect of
the aqueous extract of the fruits of the raspberry plant
Rubus ulmifolius on oxidative stress induced by cyclosporine
in male albino rats**

**Submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences /
University of Kerbala as part of the requirements for obtaining a of master
degree in Biology**

written By

Ahmed Hassan Hadi Aboud Al-Saadi

Supervised By

Prof.Dr. Ashwaq Kadhem Obaid

Prof.Dr. Liqaa Hasson Saqban

July 2025 A.D

Muharram1447A.H