جمهورية العراق - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة – قسم علوم الحياة

تقييم الكفاءة الوقائية للمستخلص المائي لاوراق نبات *Andrographis paniculata* في بعض المعايير الفسلجية والنسجية والجزيئية في ذكور الارانب البيض المعاملة بمادة البوتيل هيدروكسي تولوين

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

كتبت بواسطة :

زهراء عبد الحسين راهي الابراهيمي

بكالوريوس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء - علوم حياة 2016

باشراف :

ا.م.د. هبه علوان عبد السلام السلامي

المشرف الثاني

ا.م.د. زينب نزار جواد

ربيع الاول /1444 هـ **ايلول/2022 م**

بسم الله الرحمن الرحيم

" يُؤْتِي الْحِكْمَةَ مَنْ يَشَاءُ وَمَنْ
يُؤْتَ الْحِكْمَةَ فَقَدْ أُوتِيَ خَيْرًا كَثِيرًا
وَمَا يَذَّكَّرُ إِلَّا أُولُوا الْأَلْبَابِ "

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة / اية 269

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة: **(تقييم الكفاءة الوقائية للمستخلص المائي لاوراق نبات *Andrographis paniculata* في بعض المعايير الفسلجية والنسجية والجزينية في ذكور الارانب البيض المعاملة بمادة البوتيل هيدروكسي تولوين)** قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /علم الحيوان.

التوقيع:

الاسم : د. هبه علوان عبد السلام

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2022

التوقيع:

الاسم : د. زينب نزار جواد

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2022

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. نصير مرزا حمزة

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2022

اقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد أطلعنا على الرسالة الموسومة **تقييم الكفاءة الوقائية للمستخلص المائي لاوراق نبات *Andrographis paniculata* في بعض المعايير الفسلجية والنسجية والجزينية في ذكور الارانب البيض المعاملة بمادة البوتيل هيدروكسي تولوين** كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير / علم الحيوان/علم الفسلجة ، وبعد إجراء المناقشة العلمية وجد إنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز)

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:
الاسم: د. سحر محمود جواد
المرتبة العلمية: استاذ
مكان العمل: جامعة الكوفة / كلية التربية للبنات
التاريخ: / / 2022

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. اشواق كاظم عبيد
المرتبة العلمية: استاذ
مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ: / / 2022

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. الاء شاكر حنتوش
المرتبة العلمية: استاذ
مكان العمل: جامعة الكوفة / كلية العلوم
التاريخ: / / 2022

عضو ومشرف اول

التوقيع:
الاسم : د. هبه علوان عبد السلام
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : / / 2022

عضو ومشرف ثاني

التوقيع:
الاسم : د. زينب نزار جواد
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : / / 2022

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :
الاسم : د. حميدة عيدان سلمان
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : ٣١/٥/ 2022

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **تقييم الكفاءة الوقائية للمستخلص المائي لاوراق نبات *Andrographis paniculata* في بعض المعايير الفسلجية والنسجية والجزيئية في ذكور الارانب البيض المعاملة بمادة البوتيل هيدروكسي تولوين** 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. مسلم مالك الاسدي

المرتبة العلمية: استاذ

مكان العمل :جامعة كربلاء / كلية العلوم الاسلامية

التأريخ: / /2022

الإهداء

الى من له الاسماء الحسنى والفضل الذي لا نفاذ له المنزه في وحدانيته (الله رب العالمين)

الى من الصلاة عليه نورُ تبدأُ في الغمام المُظلمِ (محمد) باسط المعروف معدن الإنعام والحكم النبي المصطفى سيد الرسلِ

الى من هم سراج الله في الخلق يزهر (ال بيت محمد) من فيهم الهدى والوحي في الخير يُذكَر فأي بيت كبيت آل طه مجد الله ساكنيه وطهر

الى الغائب الذي ترقب العين نوره (صاحب الزمان الحجه المنتظر)

الى من تكتمل فيها الحياة وتقدس تلك التي مازالت يداها ارجوحتي تلك التي تعانق كآبة ايامي وتحيل ليلي انوارا هذه الذات الملائكية (أمي) عماد سعادتي ومسرتي

أبي) (الى ظلي الظليل والاغلى من نفسي التي بين جوانحي الرجل الذي يحرسني بعينيه والوذ الى ركنه مطمئنة

الى من هم السعادة لعيناي حين تلمحهم ، كنزي الثمين فخري وسندي والعمر بأكمله (اخوتي واخواتي)

الى كل من علمني حرفاً ..

الى اهلي واحبتي جميعا ..

زهراء

الشكر والتقدير

الحمد لله الذي تفرد بجلاله وكماله وعلاه .... فكم من ظامئ للعلم بفضلة ارواه وسهل له السبيل وذلل له الصعاب ورفعه بالعلم درجات. فالحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على من طابت الدنيا ببعثته وجاء بالآيات والحكم مُحَمَّد صفوة الباري وخيرته .. وعلى ال بيته احباء الله ونوره وسادة السادات ومنبع العلم الرصين من الطراز الاوحد . فبمن الله وفضله اعانني ووفقني لإتمام هذه الرسالة فاشكره شكرا جزيلا جالبا للمزيد من نعمه .

ها انا اقف على اعتاب النهاية في دراستي و مشواري هذا وانه لمن دواعي سروري حقا بعد ان وصلت الى هنا ان أعبر عن عميق شكري وبالغ امتناني الى من كانت معي وبجانبي منذ خطوتي الاولى في عملي وتشريفها لي وتفضلها بالأشراف على رسالتي استاذتي أ.م.د. هبة علوان عبد السلام فكان لها الفضل في اختيار موضوع البحث كما لم اجد منها سوى الإهتمام الشديد واللطف البالغ واستنهاضها لما فتر من همتي فقد شاركتني في مشاقي وقدمت لي النصائح المثمرة والتشجيع وافادتني ووجهتني بملاحظاتها ومعلوماتها العلمية السديدة . كما ادين الشكر و الامتنان العميق الى مشرفتي على الجانب الوراثي ا.م.د. زينب نزار جواد لما بذلته من جهد فقد كان شرف لي ان اعمل معها واستفيد من خبرتها ومعلوماتها والتي لم تتوانى في ابداء النصيحة او تعزيز ثقتي في نفسي زادك الله عطاء ووفقك لكل خير .

كما اتقدم بالشكر والتقدير الجزيل الى رئاسة جامعة كربلاء لإتاحتها الفرصة لي لإكمال دراستي واتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة والى منتسبي القسم كافة لما قدموه من دعم و تسهيلات ساعدت على اخراج هذه الرسالة على افضل وجه. ومن العرفان بالجميل والاقرار بالفضل اتقدم بعميق الشكر والامتنان الى الطبيب الاستشاري في الامراض النسجية الدكتور نزار جبار متعب / مستشفى الحسيني العام وا.د. اشواق كاظم عبيد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء لمساعدتهم لي في تشخيص النتائج النسجية .

زهراء

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة معرفة الدور الوقائي للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس *Andrographis paniculata* على بعض المعايير الفسلجية والنسجية والجزيئية في ذكور الارانب البيض المعاملة بمادة البوتيل هيدروكسي تولوين Butylated hydroxyltoluene (BHT) .

اجريت الدراسة في في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء والبيت الحيواني التابع الى كلية الطب البيطري / جامعة كربلاء للمدة من بداية شهر تشرين الثاني 2021 ولغاية شهر شباط 2022 تضمنت هذه الدراسة استخدام 100 ارنب من ذكور الارانب البيض *Oryctolagus cuniculus* التي تراوحت اعمارها بين 8-9 اشهر ومعدل اوزانها مابين 1500-2000 غرام ، تم تحضير المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس ، بعدها تم اجراء التجربة الاولى التي هدفت تحديد الجرعة المؤثرة النصفية (ED_{50}) للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس من خلال دراسة منحني الجرعة المؤثرة ، فقد تم استخدام 60 من ذكور الأرانب البالغة والتي قسمت عشوائيا الى ستة مجاميع متساوية (10 حيوان / مجموعة) وجرعت فمويا خمس جرع متزايدة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس يوميا (0،50 ،100 ، 150، 200 و 250 ملغم/كغم) ولمدة اربعة اسابيع ، جمعت عينات الدم بعد نهاية التجربة لدراسة المعايير التالية : تركيز المالونالديهايد (MDA) والكلوتاثيون المختزل (GSH) والكولسترول الكلي (TC) وتركيزالشحوم البروتينية عالية الكثافة (HDL) وكانت الجرعة المؤثرة النصفية للمستخلص تساوي (100 ملغم /كغم / و.ج).

تضمنت التجربة الثانية التي صممت لبيان الدور الوقائي للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس على التأثيرات السمية المستحثة بمادة البوتيل هيدروكسي تولوين BHT استخدام 40 من ذكور الأرانب البالغة والتي قسمت عشوائيا الى اربعة مجاميع متساوية (10 حيوان / مجموعة) ، جرعت المجموعة الاولى(G1) 1 مل/ كغم من زيت الذرة وعدت كمجموعة سيطرة ،وجرعت المجموعة الثانية (G2) 1 ملغم /كغم من BHT ، جرعت المجموعة الثالثة (G3) ب 100 ملغم /كغم من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس ، في حين جرعت حيوانات المجموعة الرابعة (G4) 1 ملغم /كغم من BHT و 100 ملغم /كغم من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس ولمدة شهر يوميا .

جمعت عينات الدم بعد تجويع الحيوانات Fasting blood sample بعد نهاية التجربة لدراسة المعايير التالية : تركيز انزيم ناقلة الاسبارتات (Aspartate transaminase (AST و الانزيم الناقل للامين (Alanine transaminase (ALT و انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase (ALP) و انزيم سوبر أكسيد ديسميوتاز (Superoxide dismutase (SOD و المالونالديهايد (Malondialdehyde (MDA و الكلوتاثيون المختزل (Reduced Glutathion (GSH و الشحوم البروتينية عالية الكثافة (High Density Lipoprotein (HDL و الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة (Low Density Lipoprotein (LDL و الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة جدا Very Low Density Lipoprotein (VLDL) و الدهون الثلاثية (Triacylglycerol (TAG و البيليروبن الكلي (Total Bilirubin (T-BIL و الالبومين Albumin ، اليوريا Urea و حامض اليوريك Uric acid و عامل التنخر الورمي نوع الفا (Tumor necrosis factor (TNF-α و الانترلوكين Interleukin 6 (IL-6) والسيتوكروم Cytochrome P450 ، اضافة الى قياس التعبير الجيني لجين *CD44* باستخدام تقنية Real – Time PCR .

اظهرت نتائج هذه التجربة ان التجريع الفموي ب BHT أدى الى حدوث ارتفاع معنوي (P<0.01) في معدل تركيز AST وALP و ALT و MDA و TC و LDL و T-BIL و Urea و Uric acid و TNF-α و IL-6 و انخفاض معنوي (P<0.01) في معدل تركيز Albumin و SOD و GSH و HDL و Cytochrome P450 وعدم وجود فروق معنوية (P>0.01) في معدل تركيز TAG و VLDL مقارنة مع مجموعة السيطرة .

فيما اظهرت المجموعة المعاملة ب ED_{50} للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس حدوث ارتفاع معنوي (P<0.01) في تركيز HDL و Albumin و GSH وانخفاض معنوي (P<0.01) في تركيز TAG و LDL و VLDL و MDA و T-BIL و Urea وعدم وجود فرق معنوي (P>0.01) في معدل تركيز AST وALP وALT و TC و Uric acid و SOD و TNF-α و IL-6 و Cytochrome P450 مقارنة مع مجموعة السيطرة .

كما بينت التجربة ان التجريع الفموي ب BHT مع التجريع الفموي بال ED_{50} من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس ادى الى حدوث ارتفاع معنوي في GSH وعدم وجود فروق معنوية (P>0.01) في معدل تركيز ALP و AST و ALT و TC و TAG و HDL و LDL و VLDL و MDA و SOD ،-T

BIL و Albumin و Urea و Uric acid و TNF-α و IL-6 و Cytochrome P450 مقارنة مع مجموعة السيطرة .

اظهرت نتائج الفحص الجزيئي لجين *CD44* وجود ارتفاع معنوي في تعبير الجين في المجموعة المعاملة بمادة BHT عند المقارنة بمجموعة السيطرة في حين لوحظ عدم وجود فرق معنوي في تعبير الجين بالمجموعة المعاملة بالمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس و BHTعند المقارنة بمجموعة السيطرة .

اظهرت نتائج الفحص النسجي ان التجريع الفموي ب BHT ولمدة شهر ادى الى حدوث تغيرات تنكسيه واضحة في نسيج الكبد مع احتقان في الوريد المركزي وارتشاح الخلايا الالتهابية حوله اضافة الى تغلظ وانحلال لانوية الخلايا الكبدية وتفجي واضح مع وجود تحلل مائي في الخلايا الكبدية مقارنة مع مجموعة السيطرة ، اما في نسيج الكلية فقد ادت المعاملة بمادة BHT الى حدوث احتقان وضمور وانكماش في الكبيبة البولية اضافة الى وجود زيادة في فسحة بومان وتحطم النبيبات البولية مع انسلاخ البطانة الداخلية للنبيبات البولية ،كما ادت الى حدوث تغيرات تنكسية في نسيج الطحال مع وجود احتقان و زيادة في اللب الاحمر Red pulp على حساب اللب الابيض White pulp مقارنة مع مجموعة السيطرة.

يستنتج من الدراسة الحالية ان مادة البوتيل هيدروكسي تولوين (BHT) تسببت بتاثيرات مرضية واضحة على الكبد ،الكلى والطحال وتؤكد ان المعاملة بالجرعة المؤثرة النصفية للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس (100 ملغم /كغم) لها دور وقائي ضد التلف الحاصل بفعل مادة BHT في ذكور الارانب البيض .

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
I	الخلاصة	
IV	المحتويات	
VIII	قائمة الجداول	
VIII	قائمة الاشكال والصور	
X	قائمة المختصرات	
	الفصل الأول المقدمة	
1	المقدمة	
	الفصل الثاني استعراض المراجع	
4	Butylated hydroxytoluene (BHT) بوتيل هيدروكسي تولوين	1-2
5	تواجد البوتيل هيدروكسي تولوين	2-2
6	التمثيل الغذائي للبوتيل هيدروكسي تولوين	3-2
8	التأثيرات السمية للبوتيل هيدروكسي تولوين على الجسم	4-2
9	Liver الكبد	5-2
11	Kidney الكلية	6-2
11	Spleen الطحال	7-2
12	Cytochrome P450 (CYP) السيتوكروم	8-2
13	Tumor Necrosis Factor (TNF-α) عامل التنخر الورمي	9-2
14	Interleukin 6 (IL-6) الانترلوكين	10-2
16	انزيمات الكبد	11-2
16	Alkaline Phosphatase (ALP) انزيم الفوسفاتيز القاعدي	1-11-2
16	Asparatate Transaminase (AST) الانزيمات الناقلة لمجموعة الأمين Alanine transaminase (ALT)	2-11-2
17	Albumin الالبومين	3-11-2
17	Superoxide Dismutase (SOD) الديسموتاز الفائق	12-2
18	Glutathione الجلوتاثيون	13-2
19	*CD44* جين	14-2
22	النبات الطبي المستخدم في هذه الدراسة (الاندروجرافيس)	15-2
23	المكونات الكيميائية لنبات الاندروجرافيس	16-2
24	الاستخدامات الطبية لنبات الأندروجرافيس	17-2
	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	
31	حيوانات التجربة	2-3

31	تحضير المستخلص المائي	3-3
32	تصميم التجربة	4-3
32	التجربة الأولى	1-4-3
33	التجربة الثانية	2-4-3
34	سحب الدم	1-2-4-3
35	قياس فعالية الانزيمات	5-3
35	تقدير فعالية الانزيمات الناقلة لمجموعة الأمين	1-5-3
37	تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم	2-5-3
39	تقدير فعالية انزيم سوبر أوكسيد دسميوتيز (SOD)	3-5-3
40	الفحوصات الكيموحيوية	6-3
40	تقدير تركيز المونالديهايد في مصل الدم	1-6-3
42	تقدير تركيز الكلوتاثيون المختزل في مصل الدم	2-6-3
43	تقدير تركيز الكوليسترول الكلي في مصل لدم	3-6-3
45	تقدير تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة في مصل الدم	4-6-3
46	تقدير تركيز الشحوم البروتينية الواطئة الكثافة	5-6-3
47	تقدير تركيز الشحوم البروتينية الواطئة الكثافة جدا	6-6-3
47	تقدير تركيز الكليسريدات الثلاثية	7-6-3
48	تقدير تركيز البيليروبين الكلي (T-Bil)	8-6-3
50	تقدير تركيز الالبومين Albumin	9-6-3
51	تقدير تركيز اليوريا Urea في المصل	10-6-3
52	تقدير تركيز حمض اليوريك Uric acid في المصل	11-6-3
54	قياس عامل التنخر الورمي والانترلوكين وانزيم Cytochrome P450	12-6-3
54	قياس عامل التنخر الورمي (TNF-α)	1-12-6-3
56	قياس الانترلوكين IL-6	2-12-6-3
57	قياس انزيم Cytochrome P450	3-12-6-3
58	الكشف الجزيئي	7-3
58	فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)	1-7-3
63	التحضيرات النسجية	8-3
64	التحليل الاحصائي	9-3
	الفصل الرابع النتائج	
66	تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس	1-4
66	تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في بعض المعايير الكيموحيوية	1-1-4
66	تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز المالوناالديهايد MDA في مصل ذكور الارانب	1-1-1-4
67	تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز الكلوتاثيون المختزل GSH في مصل ذكور الارانب	2-1-1-4

68	تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز الكوليستيرول الكلي TC في مصل ذكور الارانب	3-1-1-4
68	تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL-C في مصل ذكور الارانب	4-1-1-4
70	التجربة الثانية	2-4
70	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في انزيمات الكبد والبلروبن الكلي	1-2-4
70	التغيرات في معدل فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي	1-1-2-4
70	التغيرات في معدل فعالية الانزيمات الناقلة لمجموعة الامين	2-1-2-4
70	التغيرات في معدل تركيز البلروبن الكلي (T-BIL)	3-1-2-4
71	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في صورة الدهون	2-2-4
73	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في معدل تركيز الكلوتاثيون المختزل GSH و المالونالديهايد MDA و الديسموتاز الفائق (SOD)	3-2-4
73	التغيرات في معدل تركيز الكلوتاثيون المختزل GSH	1-3-2-4
74	التغيرات في معدل تركيز المالونالديهايد MDA	2-3-2-4
74	التغيرات في معدل تركيز الديسموتاز الفائق Superoxide (SOD) Dismutase	3-3-2-4
75	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في معدل تركيز Albumin , Uric acid , Urea	4-2-4
75	التغيرات في معدل تركيز اليوريا وحامض اليوريك	1-4-2-4
76	التغيرات في معدل تركيز الالبومين Albumin	2-4-2-4
77	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في معدل تركيز Interleukin 6 (IL-6) و السيتوكروم Cytochrome P450 (CYP) و TNF-α	5-2-4
77	التغيرات في معدل تركيز الانترلوكين (IL-6)	1-5-2-4
77	التغيرات في معدل تركيز TNF-α	2-5-2-4
77	التغيرات في معدل تركيز Cytochrome P450 (CYP)	3-5-2-4
78	الكشف الجزيئي باستخدام فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)	6-2-4
80	التغيرات النسجية	7-2-4
80	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الكبد	1-7-2-4
83	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الكلية	2-7-2-4
85	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الطحال	3-7-2-4
	الفصل الخامس	

المناقشة		
1-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في انزيمات الكبد	88
2-5	تاثير مستخلص نبات الاندروجرافس في انزيمات الكبد	90
3-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في صورة الدهون	91
4-5	تاثير مستخلص نبات الاندروجرافس في صورة الدهون	92
5-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في معدل تركيز الكلوتاثيون المختزل GSH و المالونالديهايد MDA و الديسموتاز الفائق (SOD) Superoxide dismutase	96
6-5	تاثير مستخلص نبات الاندروجرافس في معدل تركيز الكلوتاثيون المختزل GSHو المالونالديهايد MDA و الديسموتاز الفائق (SOD) Superoxide dismutase	97
7-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في معدل تركيز Urea ، Uric acid و Albumin	99
8-5	تاثير مستخلص نبات الاندروجرافس في معدل تركيز Urea ، Uric acid و Albumin	101
9-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في معدل Interleukin 6 ، عامل التنخر الورمي الفا TNF-α و السيتوكروم Cytochrome P450 (CYP)	102
10-5	تاثير المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في معدل تركيز Interleukin 6 ، عامل التنخر الورمي الفا TNF-α و السيتوكروم Cytochrome P450 (CYP)	107
11-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في التعبير الجيني لجين *CD44*	109
12-5	تاثير المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في التعبير الجيني لجين *CD44*	110
13-5	التغيرات النسجية	112
1-13-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في نسيج الكبد	112
2-13-5	تاثير مستخلص نبات الاندروجرافس في نسيج الكبد	113
3-13-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في نسيج الكلى	114
4-13-5	تاثير مستخلص نبات الاندروجرافس في نسيج الكلى	115
5-13-5	تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين في نسيج الطحال	116
6-13-5	تاثير مستخلص نبات الاندروجرافس في نسيج الطحال	118
الفصل السادس الاستنتاجات والتوصيات		
	الاستنتاجات	120
	التوصيات	121
	المصادر	122
	الخلاصة باللغة الإنكليزية	161

قائمة الجداول

التسلسل	العنوان	الصفحة
1-3	جدول الأجهزة المستخدمة حسب المنشأ والشركة	27
2-3	جدول الأدوات الزجاجية والبلاستيكية حسب المنشأ والشركة	28
3-3	جدول المواد الكيميائية حسب المنشأ والشركة	28
1-4	جدول تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في انزيمات الكبد والبلروبن الكلي في ذكور الارانب البيض	71
2-4	جدول تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في صورة الدهون في ذكور الارانب البيض	73
3-4	جدول تاثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في معدل تركيز GSH و MDA و SOD في ذكور الارانب البيض	75
4-4	جدول تأثير البوتيل هيدروكس تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في معدل تركيز ،Urea، Uric acid و Albumin في ذكور الارانب البيض	76
5-4	جدول تأثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في معدل تركيزالانترلوكين (IL-6) ، السيتوكروم (CYP P450) و TNFα في ذكور الارانب البيض	78
6-4	جدول تأثير البوتيل هيدروكسي تولوين والمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس على مستوى التعبير الجيني لجين *CD44* في ذكور الارانب البيض	79

قائمة الصور والاشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
1-2	شكل التركيب الكيميائي للبوتيل هيدروكسي تولوين	4
2-2	شكل موقع جين *CD44* في الارانب على كروموسوم 1	19
1-2	صورة نبات الاندروجرافس	23
1-3	شكل مخطط تصميم التجربة	30
1-4	شكل تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز المالونالديهايد MDA بعد اربعة اسابيع	67
2-4	شكل تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز الكلوتاثيون المختزل GSH بعد اربعة اسابيع	67
3-4	شكل تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز الكوليسترول الكلي TC بعد اربعة اسابيع	68
4-4	شكل تاثير الجرع المختلفة من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL بعد اربعة اسابيع	69
1-4	صورة تبين مقطع نسجي في نسيج الكبد لذكور الارانب البيض في مجموعة	80

	السيطرة	
2-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من BHT ولمدة شهر لذكور الارانب البيض ، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 200 X) في نسيج الكبد	81
3-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من BHT ولمدة شهر لذكور الارانب البيض ، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 400 X)في نسيج الكبد	81
4-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 100 ملغم / كغم المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الكبد لذكور الارانب البيض ولمدة شهر، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 200 X)	82
5-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من BHT مع التجريع الفموي ب 100 ملغم / كغم المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الكبد لذكور الارانب البيض ولمدة شهر، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 200 X)	82
6-4	صورة تبين مقطع نسجي في نسيج الكلية لذكور الارانب البيض في مجموعة السيطرة	83
7-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من BHT ولمدة شهر لذكور الارانب البيض ، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 200 X)في نسيج الكلية	84
8-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 100 ملغم / كغم المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الكلية لذكور الارانب البيض ولمدة شهر، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 200 X)	84
9-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من BHT مع التجريع الفموي ب 100 ملغم / كغم المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الكلية لذكور الارانب البيض ولمدة شهر، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين H&E 200 X)	85
10-4	صورة تبين مقطع نسجي في نسيج الطحال لذكور الارانب البيض في مجموعة السيطرة	86
11-4	صورة تبين التغيرات النسجية في نسيج الطحال بعد التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من BHT ولمدة شهر بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 200X)	86
12-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 100 ملغم / كغم المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الطحال لذكور الارانب البيض ولمدة شهر، بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H&E 200 X)	87
13-4	صورة تبين تأثير التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من BHT مع التجريع الفموي ب 100 ملغم / كغم المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس في نسيج الطحال لذكور الارانب البيض ولمدة شهر	87

قائمة المختصرات

المصطلحات	المختصرات
Acyl-CoA cholesterol acyltransferase	ACAT
Acetyl- coenzyme A carboxylase alpha	ACC-1
Alkaline Phosphatase	ALP
Alanine transaminase	ALT
Activator protein 1	AP-1
Apoptosis activating factor -1	Apaf-1
Antioxidant response element	ARE
Asparatate Transaminase	AST
Activating transcription factor 2	ATF-2
Butylated hydroxytoluene	BHT
BHT- quinone	BHT – Q
BHT - quinone - methide	BHT - QM
Cystic fibrosis	CF
Coronavirus disease 2019	COVID-19
Cyclooxygenase-2	COX-2
Complet randomized design	CRD
Cytochrome P450	CYP450
Deoxyribonucleic Acid	DNA
2,4 Dinitrophenyl hydrazine	DNPH
Epstein-Bar Virus	EBV
Extracellular matrix	ECM
Enzyme – Linked Immunosorbent Assay	ELISA
Electrophile response element	EpRE
Extracellular signal-regulated kinase	ERK
Glutamate cysteine ligase	GCL
Glomerular filtration rate	GFR
N-acetyl-glucosamine	GlcNAc
Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1	GOT1
Glutamic-oxaloacetic transaminase 2	GOT2
Glyco protein 130	gp130
Glutathione peroxidase	GPx
Reduced Glutathione	GSH
Glutathione reductase	GSH-RD
Glutathione synthetase	GSS
Glutathione disulfide	GSSG

Influenza A virus subtype	H1N1
Hydrogen peroxide	H_2O_2
Hepatic artery	HA
Hyaluronic acid	HA
Hipatitis B Virus	HBV
High Density Lipoprotein	HDL
3-Hydroxy -3- Methyl-Glutaryl-CoenzymeA	HMG-CoA
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	HMGCR
Human papillomavirus	HPV
Human papillomavirus	HPV
Hepatic stellate cells	HSCs
Herpes simple virus 1	HSV-1
Hepatic ischemia/reperfusion	I/R
I Kappa B kinase	IKK
Interleukin 6	IL-6
Nitric oxide synthase	iNOS
I-kappa-B	IκB
C-Jun N-terminal Kinase	JNK
Kelchlike ECH association protein 1	Keap 1
Least Significant difference	L.S.D
Low Density Lipoprotein	LDL
Least Significant difference	LSD
Liver sinusoidal endothelial cells	LSECs
Lanosterol synthase	LSS
A mitogen-activated protein kinase	MAPK
Malondialdehyde	MDA
Transmembrane Interleukin-6 Receptor	mIL-6R
Matrix metalloproteinase-9	MMP-9
Messenger RNA	mRNA
Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	NADPH
Nonalcoholic fatty liver disease	NAFLD
Nuclear Factor Kappa B	NF-κB
Nitric oxide	NO
Nuclear factor -erythroid-2 related factor 2	Nrf2
Superoxide anion	$O_2{\cdot}^-$
Peroxynitrite	ONOO-
Portal vein	PV
Quantitative Reverse Transcription Real – Time PCR	qRT –PCR

Ribonucleic acid	RNA
Reactive Nitrogen Species	RNS
Reactive Oxygen Species	ROS
Sever Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2	SARS-CoV-2
Soluble IL-6 Receptor	sIL-6R
Superoxide Dismutase	SOD
Sterol regulatory element – binding protein	SREBP
Soluble Tumor Necrosis Factor-α	sTNF-α
Triacylglycerol	TAG
Thiobarbituric acid	TBA
Total Bilirubin	T-BIL
Total Cholesterol	TC
Transmembrane Tumor Necrosis Factor- α	tmTNF-α
Tumor Necrosis Factor Receptor 1	TNFR1
Tumor Necrosis Factor Receptor 2	TNFR2
Tumor Necrosis Factor-α	TNF-α
Very Low Density Lipoprotein	VLDL
World Health Organization	WHO

المقدمة

Introduction

ان المضافات الغذائية هي مجموعة من المواد المصنعة التي يتم الحصول عليها من الحيوانات او النباتات أو بعض انواع المعادن، وقد تم استخدامها منذ القِدم لحفظ الأطعمة او للحفاظ على سلامتها ومنعها من التلف، اذ ان الغرض الرئيسي من إضافة تلك المواد إلى الأطعمة هو تعديل خصائصها او طعمها او لونها او رائحتها، و توجد انواع عديدة منها و لكل نوع دور معين في حفظ الاغذية ، وعلى الرغم من الفوائد التجارية التي ممكن ان تحققها تلك المواد الحافظة إلا أنها تسبب أضرارًا كبيرة على صحة الإنسان (Bimpizas-Pinis *et al* , 2022)

يعد مركب البوتيل هيدروكسي تولوين Butylated hydroxytoluene (BHT) من المركبات المهمة وهو احد المضافات الغذائية التي تستخدم بكثرة في صناعة الاغذية ، وهو من مشتقات الفينول ذات الخصائص المضادة للاكسدة التي تمنع الاكسدة الذاتية للمركبات العضوية غير المشبعة (Sharma & Singh, 2019) ، اذ تعد الاكسدة مشكله كبيرة وخطيرة تواجه عملية تصنيع المواد الغذائية لما تسببه من تاثير واضح على جودة الغذاء و تؤثر سلبا على النكهه واللون والطعم والرائحة في الطعام وكذلك تقلل من القيمة الغذائية للاغذية المصنعة (Alebic & Richter, 2021)

ان مركب ال BHT من اكثر انواع المضافات الغذائية المستخدمة لتحسين مذاق الطعام وهي مادة تم الموافقة عليها من قبل إدارة الغذاء والدواء الامريكية ، كما يصنفها الاتحاد الاوربي على انها امنه عند استخدامها بكميات منخفضة (Ghosh *et al*., 2020) ، اذ ان الاستخدام غير الصحيح والمفرط لمضادات الاكسدة الفينولية الاصطناعية هي من المسببات الرئيسية للسمية الخلوية وحدوث الاجهاد التاكسدي اضافة الى تاثيرها على الإصابة بالسرطان و اضطراب الغدد الصماء (Xu *et al*., 2021) .

نظرا للاستهلاك السريع والمتزايد للمواد الحافظة المضافة للأغذية حيث يتعرض الانسان و بشكل يومي لهذه المواد الكيميائية في الاغذية ومع تزايد استخدامها لفترات أطول يلاحظ ظهور العديد من المشاكل الصحية التي تهدد حياة الفرد (Pandey & Kumar, 2021) ، اذ تم التأكيد على ان

مادة البوتيل هيدروكسي تولوين تتراكم في الانسجة الدهنية وتسبب اضطراب في التمثيل الغذائي (Mean *et al* ,2018) ، كما وجد انها تسبب ضمور عضلات القلب والتهاب رئوي وتلف الخلايا العصبية (Al-Abdaly *et al*., 2021) ، اضافة الى تاثيره الضار على العديد من الأعضاء كالكبد والمعدة ودوره في زيادة في مستوى الكوليستيرول ونسبه الدهون في الدم (Yang *et al*., 2018) ، كما يمكن ان يؤدي استخدام الجرعات العالية من BHT الى خلل في انزيمات الكبد مع تنخر الكبد و زيادة في النشاط الانقسامي للخلايا الكبدية وتليف القنوات الصفراوية فضلا عن دورها في تحفيز اورام الكبد (Powell *et al*., 1986) .

تعد النباتات الطبية من أهم المصادر الرئيسة للعقاقير التي تستخدم في العلاجات الطبية (Nankaya *et al* .,2020) . و هي مركبات كيميائية ذات خصائص مهمة كـــونها تحتوي على مضادات الأكسدة ، نظرا للدور الوقائي للعديد من مضادات الأكسدة في علاج الكثير من حالات الإجهاد التأكسدي، جاءت فكرة استخدام نبات الاندروجرافس كمادة وقائية ضد الاعتلالات الفسلجية والنسجية والجزيئية التي ممكن ان تسببها مادة BHT نتيجة لامتلاكها العديد من الخواص العلاجية فضلا عن دوره كنبات مضاد للأكسدة نتيجة لامتلاكه كثير من عناصر الفيتوكيميكالز والعديد من المركبات الفعالة مثل مركب اندروجرافيوليد Andrographolide ونيواندروجرافيوليد Neoandrographolide و الاندروجرافوستيرين Andrographosterin والستيجماستيرول stigmasterol و الاندروغرافيدين Andrographidine ومركب الابيجينين apigenin ومركب اللوتولين luteolin التي تمكنها من اكتساح انواع الاوكسجين التفاعلية ROS مما يمنحها تأثيرات مضادة للأكسدة التي تحمي الجسم من العديد من المشاكل الصحية المتسببة بفعل الجذور الحرة ، ونظرا لقلة الدراسات التجريبية عن الأضرار الصحية التي تسببها مادة BHT ، ونتيجة لزيادة استخدام المنتجات الغذائية المعلبة والمحفوظة ، ولقلة الدراسات التي تناولت تأثير نبات الاندروجرافس لذا جاءت اهداف الدراسة الحالية كما يأتي :

دراسة الدور الوقائي للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس ضد الإجهاد التأكسدي المستحث بمادة BHT من خلال قياس تركيز المالونالديهايد MDA و الكلوتاثيون المختزل GSH .

دراسة تأثير مادة BHT على بعض المعايير الانزيمية (ALP, AST, ALT ,SOD) وبعض المعايير الكيموحيوية (HDL, LDL, TAG, VLDL, Albumin, T-BIL, Urea, Uric acid)

قياس عامل التنخر الورمي نوع الفا TNFα ، IL-6 و Cytochrome P 450

دراسة التلف النسجي المتسبب عن مادة BHT في نسيج الكبد ، الكلى و الطحال

دراسة الدور الوقائي للمستخلص المائي لاوراق نبات الاندروجرافس على انسجة الكبد ، الكلى و الطحال .

دراسة جزيئية لاحد الجينات المسؤولة عن الاعتلالات الكبدية (CD44)

استعراض المراجع

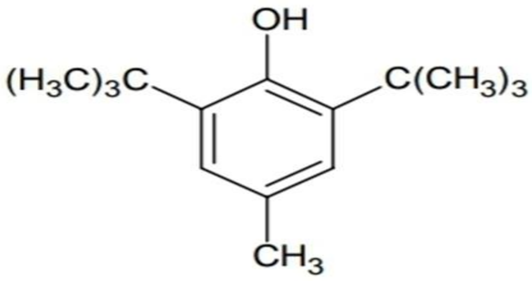
Literature Review

1-2 بوتيل هيدروكسي تولوين Butylated hydroxytoluene (BHT)

الاسم الكيميائي : 4-methyl-2,6-ditertiarybutylphenol

التسميات الأخرى: 3,5-di-tret-butyl-4hydroxytoluene ; 2,6-di-tret-buty-p-cresol ; 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol ; Ionol (Kuchana *et al*., 2019)

البوتيل هيدروكسي تولوين Butylated hydroxytoluene (BHT) هي ماده بلورية بيضاء اللون (EFSA , 2012) ذات صيغة كيميائية $C_{15}H_{24}O$ ووزن جزيئي 220.36 غم/مول ودرجة انصهار 70درجه سيليزية ورمزها التجاري E 321 وهو مركب محب للدهون (Husoy *et al*.,2019) ، تعد مادة ال BHT من اكثر مضادات الاكسده شيوعا التي تستخدم في العديد من الصناعات الغذائية حتى هذا اليوم ((Higgins *et al* , 2019



الشكل (1-2) التركيب الكيميائي للبوتيل هيدروكسي تولوين (Jakubczyk & Michalkiewicz, 2018)

يتم اضافة كميات قليلة من المواد الحافظة لغرض تحسين جودة الطعم واطالة مدة الصلاحية للطعام اثناء انتاجه ولحماية الطعام من التلف او التزن (Pandey & Kumar, 2021 ;Zamzam *et al*., 2019)، يعد مركب ال BHT من المركبات المهمة ومن مشتقات الفينول ذات الخصائص المضادة للاكسدة التي تمنع الاكسدة الذاتية للمركبات العضوية غير المشبعة (Sharma & Singh, 2019) ، اذ تعد الاكسدة مشكله كبيرة وخطيرة تواجه عملية تصنيع المواد

الغذائية لما تسببه من تأثير واضح على جودة الغذاء و تؤثر سلبا على النكهه واللون والطعم والرائحة في الطعام وكذلك تقلل من القيمة الغذائية للأغذية المصنعة (Alebic & Richter, 2021)

تقوم الحلقة العطرية في مركب BHT بتثبيت أنواع الاكسجين التفاعلية ذات الجذور الحرة (ROS) عن طريق عزلها حيث تعمل مركبات الفينول هذه كمواد كابحة لل ROS وذلك عن طريق منح ذرة هيدروجين الى جذور الاوكسجين المشتقة من الاحماض الدهنية (Delanghe *et al*., 2021)

يعد BHT من اكثر انواع المضافات الغذائية المستخدمة لتحسين مذاق الطعام وهي مادة تم الموافقة عليها من قبل إدارة الغذاء والدواء الامريكية ومعترف بها كما يصنفها الاتحاد الاوربي على انها امنه عند استخدامها بكميات منخفضة ، ووفقا لتوصيات منظمة الأغذية والزراعة التابعة للولايات المتحدة ومنظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO) ان يقتصر حد الاستهلاك اليومي لمادة BHT في الأطعمة على 0-0.125 ملغم/كغم في حين ان النطاق المقبول لل BHT من قبل المجتمع الاقتصادي الأوربي هو 0-0.05 ملغم/كغم (Ghosh *et al*., 2020) ، اذ ان الاستخدام غير الصحيح والمفرط لمضادات الاكسدة الفينولية الاصطناعية هي من مسببات الإصابة بالسرطان والسمية الخلوية وتحريض الاجهاد التأكسدي وتأثيرات اضطراب الغدد الصماء (Xu *et al*., 2021)

2-2 تواجد البوتيل هيدروكسي تولوين Occurrence of Butylated hydroxyltoluene (BHT)

يعد البوتيل هيدروكسي تولوين المادة المضافة الأكثر شيوعا في الاطعمة ، اذ تستتخدم في العديد من المنتجات الغذائية في جميع انحاء العالم و توجد بشكل رئيسي في عدد هائل من المنتجات المتوفرة في الاسواق بما في ذلك رقائق البطاطا وحلويات الأطفال والاغذية المعلبه والمخبوزات والاغذية المطبوخة كما لوحظ اضافته في الاونه الاخيرة الى الاعلاف الحيوانية (Dey & Neogi ,2019)

تم اكتشاف ال BHT في عام 1947 حيث تم استخدامه في البداية في صناعات البترول والمواد اللاصقة ثم تم تمديد نطاق استخدامه ليشمل المواد الأخرى مثل مستحضرات التجميل (جل

الاستحمام و الصابون) والمستحضرات الصيدلانية مثل المراهم وكبسولات الجيلاتين كما شمل استخدامه الدهانات واضيف بشكل خاص الى مخاليط الخبز والمكسرات وعلب الحساء والعلكة (Hartwig *et al.*, 2020) ، كما يتواجد بشكل واسع أيضا في المطاط والزيوت المعدنية والمواد المضافة للوقود وكذلك يستخدم في احبار الطباعة (Tortosa *et al.*, 2020)

3-2 التمثيل الغذائي للبوتيل هيدروكسي تولوين Metabolism of Butylated hydroxyltoluene (BHT)

يتم التمثيل الغذائي لمركب ال BHT في مختلف الانسجة الجسمية وبشكل اساسي في الخلايا الكبدية ، فعندما يتم تناول مركب البوتيل هيدروكسي تولوين الموجود في الاغذية يمتص هذا المركب عن طريق الجهاز الهضمي بسهوله ثم يذهب بعد ذلك خلال مجرى الدم و يوزع على الانسجة الجسمية المختلفة وخاصة الكبد و يحدث استقلاب لهذا المركب بشكل اساسي في الميكروسومات الكبدية وذلك من خلال اتحاد الكبريتات وحمض الجلوكورونيك ثم يفرز بعد ذلك خلال البول او البراز او الصفراء (Obiwulu ., 2020) ، ان نسبة كبيرة من نواتج BHT تفرز في الصفراء ثم يعاد امتصاصها من القناة الهضمية (Daniel & Gage,1965). ان معرفة التمثيل الغذائي للبوتيل هيدروكسي تولوين مهمة جدا لتقدير سميته على مختلف الانسجة الجسمية، حيث ذكرت الابحاث ان عملية الايض لمركب ال BHT ينتج عنها مستقلبات خطيرة قد تكون اكثر خطورة من المركب الاولي، والتي قد تتراكم في الاعضاء التي لها دور بعملية التمثيل الغذائي بشكل اكبر من غيرها وهذا بدوره يحدث سمية مضاعفة ، فهو قد يعزز نمو العديد من الاورام من خلال الرابطة التساهمية مع البروتينات كما يمكن ان يتسبب في إحداث تلف في الحمض النووي DNA (Zhang *et al.*,2020).

أظهرت العديد من دراسات التمثيل الغذائي لمركب ال BHT أن التفاعلات الكيميائية للمركب أثناء عملية الايض يمكن أن تبدا في عدة مواضع لجزيئة المركب ، اذ يمكن ان تحصل على الحلقة الاروماتية Aromatic ring وفي مجموعة الميثيل Methyl group وكذلك في مجموعات ثلاثي بوتيل Tert - butyl groups (Hartwig *et al.*,2020). و يمكن ان يتايض مركب ال BHT في الكبد عبر نظام السيتوكروم P450 بوجود العديد من العوامل المساعدة في ميكروسومات الكبد بما في ذلك NADPH و O_2 (Lanigan & Yamarik,2002) ، ويعد مسار السيتوكروم

P450 هو المسار الرئيسي لتكوين مستقبلات هذا المركب (Erratico *et al.*,2012) . فبعد دخوله الى مايكروسومات الكبد يخضع الى مسارات استقلابية تعمل على اضافة مجاميع الهيدروكسيل Hydroxylation لبدائل الالكيل Alkyl substituents لمركب ال BHT مما ينتج عنه مستقلبات مثل 4-Hydroxymethyl و الذي يتأكسد بعد ذلك الى مشتقات البنزلديهايد Benzaldehyde وحمض البنزويكBenzoic acid ، والمستقلب BHT – BuOH الذي تحدث له عملية هدرلة (اضافة هيدروكسيل) Hydroxylation في مجموعة ميثيل البنزيل Benzylic methyl group لانتاج ديول Diol والتي يتم تأكسدها بشكل اكبر الى مشتقات هيدروكسي بنزلديهايد Hydroxybenzaldehyde (Lanigan & Yamarik,2002). كما يعد مستقلب BHT-OOH والذي ينتج من ايض ال BHT في الميكروسومات الكبدية بمساعدة ال NADPH من المستقلبات الاكثر سمية والذي يمكنه التحول الى مواد اكثر خطورة ، فهو يمتلك الفة عالية للتفاعل مع مجموعات الهيم ، و له القدرة على انتاج الجذور الحرة ومركبات خطرة اخرى من خلال تفاعلات مختلفة ، وبذلك يعد هذا المركب اكثر تاثيرا بعشر اضعاف في حدوث ضرر الانسجة الجسمية واكثر سمية للكبد من المركب الاولي (BHT) (Witschi *et al.*,1989).

تتم عملية الاخراج لمركب ال BHT ومستقلباته المختلفة في الادرار او البراز او يمكن ان تتراكم في الأنسجة الدهنية (Hartwig *et al.*,2020). وتتنوع المستقلبات التي تفرز خارج الجسم خلال البول او البراز او الصفراء حيث تم التعرف على مركب حمض هيدروكسي بنزويك 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoic acid (BHT-acid) و S-(3,5-di-Tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-N-acetylcysteine وكميات مختلفة من كحول هيدروكسي بنزيل 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl alcohol(BHT-alcohol) وهيدروكسي بنزلديهايد 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde (BHT-aldehyde) وكذلك هيدروكسي فينيل ايثان 1,2-bis-(3,5-di-tert-butyl-4hydroxyphenyl)ethane(BHT-dimer) بالاضافة الى نواتج استقلاب اخرى نتيجة عمليات الايض مثل بنزوكوينون 2,6-di-tert-butyl-p-benzoquinone و بوتيل هيدروكينون 2,6-di-tert-butylhydroquinone في البول والبراز ، كما يمكن العثور على الكثير من المستقلبات في العصارة الصفراوية منها ميثيد الكينون (BHT-quinone methide) (Conning & Phillips,1986)

4-2 التأثيرات السمية للبوتيل هيدروكسي تولوين على الجسم Toxic Effect of Butylated Hydroxyltoluene on the body

نظرا للاستهلاك السريع والمتزايد للمواد الحافظة المضافة للأغذية ادى ذلك الى ظهور الكثير من الدراسات للكشف عن الاثار الضارة لهذه المواد (Chiang *et al*., 2021) ، اذ يتعرض الانسان و بشكل يومي لهذه المواد الكيميائية في الاغذية مع تزايد استخدامها لفترات أطول يلاحظ ظهور العديد من المشاكل الصحية التي تهدد حياة الفرد (Pandey & Kumar, 2021) ، وفي أبحاث سابقة تم التأكيد على ان مادة البوتيل هيدروكسي تولوين تتراكم في الانسجة الدهنية وتنتشر بشكل اكبر في البشر منه في الفئران وقد يكون هذا الاختلاف راجعا الى الاختلاف في التمثيل الغذائي (Mean *et al* ,2018) ، ففي دراسه أجريت على الجرذان من قبل (Al-Abdaly *et al*., 2021) تم استخدام مادة ال BHT عن طريق الفم بعد تعرضها للحرارة لوحظ انخفاض كبير في النشاط الحركي للجرذان المجرعة ب BHT المسخن بعد تناولها جرعة 250 ملغم /كغم و 500 ملغم /كغم اضافة الى ضمور عضلات القلب والتهاب وانتفاخ رئوي وتنكس في الخلايا العصبية وتغيرات النسجية المرضية في الدماغ والأنشطة السلوكية للكائنات ويرجح الباحثون ان تسخين مادة BHT يمكن ان يكون سبب في تكوين الجذور الحرة من بيروكسيد الدهون التي تنشا من العمليات الكيميائية والحرارية في الأطعمة المختلفة مما يؤدي الى خلل في الوظائف والخصائص الحسية والحركية والعديد من التغيرات المرضية الخطيرة .

اضافة الى تسببه في العديد من الاضطرابات الرئوية والتسمم الحاد (Liu *et al* , 2016) . كما يمكن لبعض الجرعات من BHT التسبب في الاورام الغدية بالإضافة الى زيادة اوازن الغدد مثل الغدة الدرقية كما يمكن للمادة ان تتداخل مع نشاط عوامل تخثر الدم التي تعتمد على فيتامين K في الفئران Vitamin k-dependent blood clotting factors (Derks *et al*.,2021) كما يحتمل ان يؤثر BHT على معدل التنظيم الهرموني (Pop *et al*.,2018)

كذلك قد يسبب استخدام BHT الى حصول تحسس في بعض الاعضاء مثل المعدة والامعاء بالإضافة الى انتاج البيروكسيد (Ribeiro *et al*., 2019) كما وتمتلك المادة تأثيرا ضارا على الاحياء المائية وتسبب اضطراب في وظائف القلب لبعض الكائنات الحية (Yang *et al*., 2018) ، كما يمكن ان يؤدي استخدام الجرعات العالية من BHT في الجرذان الى زيادة نشاط

انزيم Transaminase وتنخر الكبد مع ظهور زيادة في النشاط الانقسامي لخلايا الكبد وتفاعلات التهابية وتليف واضرار في القنوات الصفراوية وتحفيز اورام الكبد (Powell *et al.*, 1986) ، وقد يعد BHT ومستقلباته في غاية الخطورة في التسبب بتلف الحمض النووي والسمية الجينية (Felter *et al.*,2021).

كما اشار Sun *et al.* (2021) في دراسته ان BHT قد قلل من وزن جسم الأم في بداية الحمل بشكل كبير وسبب انخفاض في وزن الرحم بشكل ملحوظ ويؤثر على تشكل بطانة الرحم ويسبب اضطرابات متعددة اي يحتمل ان يسبب ال BHT السمية الانجابية وسبب تاثيرات واضحة على تطور بطانة الرحم وهذا يشكل تخوف من تعرض الامهات للمادة . كما ذكر (Abo-EL-Sooud *et al.*,2018) ان ل BHT تأثيرًا سلبيًا على جهاز المناعة البشري فبشكل واضح يؤثر على الاستجابة المناعية ويغير من مستوى كريات الدم المختلفة في الجسم ويقلل من كفاءة الخلايا كما يمتلك تأثيرا على الاستجابة المناعية اثناء اخذ بعض اللقاحات . كما قد يسبب آثارا جانبية في الجهاز التناسلي ويحدث خلل في الميتكوندريا ويجهد الشبكة الإندوبلازمية (Ham *et al.*,2020)

5-2 الكبد Liver

ان الكبد عضو ذو كتلة كبيرة يتميز بلونه البني المحمر المليء بالدم وهو أكبر عضو في الجسم ويشكل 2٪ من وزن البالغين. يقع في الجزء الأيمن والأعلى من البطن (Zarei *et al.*,2019) ينقسم تشريحيا الى اربع فصوص الفص الايمن والفص الايسر والفص المربعي Quadrate lobe والفص المذنب Caudate lobe و تقسم هذه الفصوص بواسطة اربطة وهي الرباط الوريدي Ligamentum venosum والرباط المدور Ligamentum teres والرباط المنجلي Falciforme ligamentum (Ibrahim ,2020).

يعد من اهم اعضاء الجسم وله دور اساسي في تحويل المواد السامه الى عناصر يمكن للجسم التخلص منها ، يتألف من الشريان الكبدي Hepatic artery (HA) و الوريد البابي Portal vein (PV) ويعملان معا حيث يوفر الشريان الكبدي الدم المؤكسج الى الكبد بينما يجلب الوريد البابي الدم غير المؤكسج ومزيج هذين الاثنين يكون في الجيوب الكبدية Sinusoids التي توزع

بشكل موحد في جميع انحاء الكبد وهي عبارة عن شبكة ثلاثية الابعاد تمتد بين صفوف خلايا الكبد و الخلايا الظهارية المسؤولة عن عملية التمثيل الغذائي التي تحدث في الكبد (Lorente *et al.*,2020) ، يقوم الكبد بتصفية الدم بالكامل وينقسم الوريد البابي والشريان الكبدي إلى فروع أصغر وأصغر بطريقة شجيرية وصولاً إلى الفصيصات Lobules (Torres Rojas *et al.*,2021)

تعد فصيصات الكبد Liver lobules الوحدة الوظيفية والتشريحية الاساسية للكبد التي تتكون من حبال كبدية Hepatic cords أو صفائح كبدية Hepatic plates مع اوردة مركزية Central veins واوردة بابية Portal veins في كل طرف ، يوجد نوعان من الخلايا الظهارية المكونة للنسيج الكبدي هما الخلايا الكبدية Hepatocytes والخلايا الصفراوية Cholangiocytes ويعد الكبد عضو قابل للتجدد وعملية تجديد خلايا الكبد هذه امرا مهما للحفاظ على وظائفه وحجمه سواء كان ذلك في الحالة الطبيعية او بعد الاصابه (Huang *et al.*,2022)

يؤدي الكبد العديد من الوظائف المهمة عن طريق امتصاص واستقلاب وافراز المواد المذابة مثل ايض الدهون (تكوين الدهون) والكربوهيدرات (تكوين الجلوكوز) والبروتينات (انتاج الهبتوجلوبين Heptoglobin والالبومين وعوامل التخثر Clotting factors) الهيموجلوبين ، الأملاح الصفراوية ، الحديد ، الفيتامينات بالإضافة الى ايض الأدوية (Albuquerque-Souza & Sahingur ,2022) ، كما يعد الكبد عضو مناعي لأنه مسؤول عن إنتاج غالبية الجزيئات المناعية في الدورة الدموية (Wang *et al.*,2021 a)

تمتلك الدورة الدموية الدقيقة للكبد والمتكونه اساسا من الخلايا البطانية الجيبية للكبد Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) والخلايا النجمية الكبدية Hepatic Stellate cells (HSCs) و الخلايا الضامة الكبدية Hepatic macrophages دور اساسي في استتباب الكبد Liver homeostasis عن طريق الحفاظ على وظيفة خلايا الكبد وتنظيم عمل الاوعية الدموية والسيطرة على الالتهابات وضعف هذه الدورة الدموية الدقيقة في الكبد هو احد الاليات الرئيسية لتحفيز تطور امراض الكبد (Gracia-Sancho *et al.*,2019)

6-2 الكلية Kidney

تكون الكلى في الثدييات على شكل حبة فاصولياء تقع في الجزء الخلفي من البطن على كل جانب من جوانب العمود الفقري ، ينخفض مستوى الكلية اليمنى عن اليسرى و يختلف وزن الكلى باختلاف مساحة سطح الجسم والعمر والجنس ، تستلم الكلى حوالي 25% من النتاج القلبي ، ويجري 85% من الدم الداخل للكلية في القشرة و 14% في اللب الخارجي و 1% فقط في اللب الداخلي (Radi, 2019) ، تتكون الكلى في البشر من حوالي مليون نيفرون والتي تتكون من اكثر من 40 نوع مختلف من الخلايا (Lake *et al.*, 2019)،ان الوظيفة الاساسية للكلى هي تنقية الدم المار بها من الفضلات من خلال زيادة معدل الترشيح الكبيبي Glomerular filtration rate (GFR) ، وعندما يكون عدد النيفرون مرتفع لايحتاج كل نفرون الى العمل بأقصى سعة لذلك يمكن المحافظة على وظائف الكلى الطبيعية حتى بعد فقدان النيفرون الأساسي وهذا هو السبب الذي يجعل الأشخاص الاصحاء قادرين على التبرع بالكلى ويفقدون 50% من اجمالي النيفرون ويحافظون على معدل الترشيح الكبيبي الطبيعي (Kramer, 2019)

تؤدي الكلى العديد من الوظائف المهمة والضرورية بما في ذلك إزالة الفضلات النيتروجينية و تنظيم مستوى الماء في الجسم والمحافظة على التوازن الحامضي-القاعدي وتوازن الكهارل وتنشيط الكالسيتريول Calcitriol وهرمون الارثروبويتين Erythropoietin و الهرمونات التي تنظم ضغط الدم (Park *et al.*, 2018; Takemoto & Naganuma, 2012) ، تنجز الوظائف الكلوية من خلال ثلاث عمليات رئيسية هي الترشيح Filtration وإعادة الامتصاص Reabsorption والافراز Secretion (Alelign & Petros, 2018) وتعد الكلى من اكثر الاعضاء عرضة للسمية الناتجة عن الادوية بسبب الحجم الكبير للدم الواصل اليها من القلب وكذلك وجود انزيمات استقلاب الدواء التي تسمح بالتعرض لتركيزات عالية من المستحضرات الصيدلانية او مستقلباتها (Chamanza *et al.*, 2019)

7-2 الطحال Spleen

يعد الطحال من اكبر الأعضاء اللمفاوية في الجسم يأخذ موقعا في الربع العلوي الايسر من تجويف البطن والطحال السليم هو عضو ناعم قابل للتفتت يأخذ لونا ارجوانيا غامقا ويتميز بسطح املس

ويختلف هذا العضو في الحجم والشكل والوزن طوله حوالي 12 سم وعرضه 7 سم وسمكه 3 سم ويبلغ وزنه في المتوسط 150 غم (Mahadevan, 2019)

يقوم الطحال بتنفيذ العديد من الوظائف كونه اكبر الأعضاء اللمفاوية حيث يقوم بترشيح المواد الغريبة من الدم وكذلك يعمل كموقع رئيسي لتكوين الكريات الحمراء وتكوين الدم ويعمل كموقع لتخزين الحديد وكريات الدم الحمراء والصفائح الدموية ويقوم بانتاج الاجسام المضادة ويزيل البكتيريا ويتناقص حجم هذا العضو مع التقدم في العمر (Coco & Leanza, 2019)

يعد الطحال مسؤولا عن التفاعلات المناعية ضد مسببات الامراض في الدورة الدموية حيث يرتبط غياب هذا العضو المهم بزيادة القابلية للانتشار الجهازي والعدوى المميتة بمختلف مسببات الامراض (Hermida *et al.*, 2018) ، يمكن ان يحتوي الطحال على خزين من الدم يبلغ 200 الى 250 مل (Engan *et al.*, 2020) .

8-2 السيتوكروم Cytochrome P450 (CYP)

السيتوكروم P450 (CYP) هو عائلة كبيرة من البروتينات المتواجدة في الحيوانات والنباتات وكذلك في الكائنات الحية الدقيقة و تتميز باحتوائها على الهيم Heme لذلك تسمى بروتينات الدم وتشترك جميع إنزيمات CYP في بنية عامة ثلاثية الأبعاد Three dimensional structure تشبه شكل مثلث مقلوب وكذلك تنتمي إنزيمات CYP إلى فئة إنزيمات Monooxygenase التي تدمج فقط ذرة واحدة من الأكسجين الجزيئي في المواد الاساس Substrate التي تعمل عليها ويتم التعبير عنها في جميع الانسجة تقريبا وغالبا في الغشاء الشبكي الإندوبلازمي وكذلك في الأجزاء الخلوية الأخرى مثل سطح الخلية وايضا في الميتوكوندريا ولكن تقع بشكل اكبر في الكبد والأمعاء الدقيقة والكلى (Feng *et al.*,2021;Elfaki *et al.*,2018) . كما تتواجد في الرئتين والدماغ (Stipp & Acco,2021) والأغشية الداخلية للميتوكوندريا للأنسجة الستيرويدية Steroidogenic tissues مثل قشرة الغدة الكظرية والمبيض والثدي والمشيمة، ولها دور مهم في التخليق الحيوي لاحماض الصفراء ، وأيض المركبات المختلفة الداخلة للجسم مثل الأدوية والملوثات البيئية والمواد المسرطنة و تلعب دورا مهما ورئيسيا في استقلاب الفيتامينات ، وأكسدة الأحماض الدهنية غير المشبعة ، وتخليق الكولسترول ومختلف عمليات الاكسدة والاختزال (Manikandan & Nagini, 2018).

يمكن من خلال عملية التمثيل الغذائي بواسطة السيتوكروم P450 استقلاب عدة مركبات ، وان استقلاب مركب واحد قد يؤدي الى نشوء مستقلبات مختلفة و مع ذلك ، قد يؤدي ايض و تنشيط المواد الكيميائية بوساطة السيتوكروم إلى تنشيط وتكوين المركبات والمستقلبات التفاعلية الخطرة المسببة للسمية والامراض المختلفة. وكان يعتقد في البداية أن CYP هو إنزيم واحد و يعتقد أنه موجود بشكل حصري تقريبا في الكبد ولكن لاحقا عرف ان جينات CYP موجودة في كل مكان تقريبا اذ تتواجد في جميع أشكال الحياة من بدائيات النوى إلى البشر (Esteves *et al.*,2021).

يعود اسم انزيمات (Cytochrome P450) لكونها مرتبطة بأغشية داخل الخلايا Bound to membranes within a cells (Cyto) وتحتوي على صبغة الهيم Heme Pigment و تمتص الضوء بطول موجي 450 نانومتر عندما تتعرض لأول أكسيد الكربون CO ، ويمكن ان يتغير تعبير انزيمات السيتوكروم عند التعرض للسموم والادوية والمواد الكيميائية المختلفة وكذلك يمكن أن تتأثر بالعوامل الوراثية والفسيولوجية والفيزيولوجية المرضية و البيئية (Wu *et al.*,2021; Lynch & Price,2007) . ويمكن ان يتم تصنيف انزيمات السيتوكروم P450 حسب تشابه تسلسل الاحماض الامينية وتشارك انزيمات السيتوكروم أيضا في مجموعة من العمليات الفيزيولوجية المرضية مثل أنواع مختلفة من السرطان أو أمراض القلب والأوعية الدموية (Machalz *et al.*,2021).

9-2 عامل التنخر الورمي (TNF-α) Tumor Necrosis Factor-α

عامل التنخر الورمي TNF-α هو بروتين ذو وزن جزيئي 17 كيلو دالتون ، يتكون من 157 حامض اميني وهو احد اهم السيتوكينات الالتهابية حدد لأول مرة على انه عامل مضاد للاورام يسبب تنخر الورم ويعد وسيط مركزي للالتهابات المزمنة وتطور الأورام الخبيثة (Tan *et al.*, 2019) ، اذ بينت الدراسات دوره الفعال في تنشيط موت الخلايا المبرمج وتعزيز الجهاز المناعي وهو مهم للحفاظ على الخلية وتنظيم عملية التمثيل الغذائي ، و يمكن ان يكون اما وقائي كما هو الحال في دفاع المضيف او ضار للخلايا حيث يختلف تركيزه اعتمادا على سبب الإصابة (Zhao *et al.*, 2020) ، يتم تصنيعه بشكل أساسي بواسطة خلايا الدم البيضاء الوحيدة والخلايا البلعمية Macrophages و كذلك بواسطة الخلايا اللمفاوية Lymphocytes وخلايا العضلات الملساء Smooth muscle cells والبطانية Endothelial cells والارومات الليفية

والأنسجة Cardiac myocytes وخلايا عضلة القلب (Cai *et al*., 2020) Fibroblasts الدهنية Adipose tissue وخلايا الدماغ Brain cells مثل الخلايا الدبقية الصغيرة Microglia والخلايا النجمية Astrocytes وبسبب خصائصه المسببة للالتهابات فقد عُد مشاركا في الفيزيولوجيا المرضية لأمراض المناعة الذاتية وكذلك مرض التهاب الأمعاء وبسبب إشارات TNF α - المتغيرة فقد ارتبط بالاضطرابات الأيضية على سبيل المثال السمنة ودنف السرطان Cancer cachexia والاضطرابات النفسية والعصبية مثل فقدان الشهية العصبي Anorexia nervosa ومرض الزهايمر والاكتئاب الشديد والخدر Narcolepsy (Patsalos *et al*.,2020).

يتم ترميز عامل التنخر الورمي TNF-α بواسطة جين TNFA (Mercogliano *et al*., 2021) ، ويحتوي جين TNFA على مواقع ربط لعدة عوامل استنساخ مما يؤدي الى مرونة عالية في النسخ والاستجابة لمختلف المحفزات (Rolski & Błyszczuk, 2020)، و يتواجد عامل التنخر الورمي الفا بشكلين الشكل القابل للذوبان Soluble form والشكل عبر الغشاء Transmembrane form ، ينتج عامل التنخر الورمي الفا في البداية بشكله الاولي والذي يدعى بعامل التنخر الورمي الفا عبر الغشاء (tmTNF-α) Transmembrane TNF-α ، لأنه يثبت على غشاء الخلايا ويخضع هذا الشكل الى التحويل بواسطة انزيم محول يدعى الانزيم المحول لعامل التنخر الورمي الفا TNF-α-converting enzyme (TACE) ليصبح بالشكل القابل للذوبان soluble TNF-α (sTNF-α) (Jang *et al*.,2021) ، ويرتبط عامل التنخر الورمي الفا بمستقبلاته وهي TNF Receptor 1 (TNFR1) و المستقبل الثاني TNF Receptor 2 (TNFR2) ويتم التعبير عن المستقبل الاول في جميع الانسجة وهو المستقبل الرئيسي للإشارات بينما يتم التعبير عن المستقبل الثاني بشكل عام في الخلايا المناعية ويسهل الاستجابات الحيوية المحدودة (Mortaz *et al*.,2021).

10-2 الانترلوكين Interleukin 6 (IL-6)

الانترلوكين هو سايتوكاينين ينتج استجابة لتلف الانسجة وحدوث الالتهابات ، يتم انتاجه في جميع انواع الخلايا تقريبا بما في ذلك الخلايا الليفية Fibroblasts والخلايا الكيراتينية Keratinocytes والخلايا البطانية الوعائية Vascular Endothelial cells والخلايا

البدينة Mast cells والخلايا العصبية Nervous cells والخلايا اللمفاوية التائية T cells والخلايا البائية B cells والعديد من الخلايا الاخرى (Velazquez-Salinas *et al.*, 2019) ، والسيتوكاينينات هي بروتينات صغيرة قابلة للذوبان في السوائل الجسمية وفي الخلايا العصبية تعمل على نقل الإشارات الى الخلايا المجاورة او ترسل إشارات الى أعضاء بعيدة من خلال مستقبلات معينة (Kang *et al.*, 2020)

يعد الانترلوكين IL-6 من العلامات التشخيصية المهمة للعديد من الامراض حيث ان الزيادة في تركيزه تكون مرتبطة بزيادة مستويات البروتينات الالتهابية في المراحل المتقدمة من الاصابات الكبدية مثل ال C-reactive protein ، كما يزداد في حالة الامراض الوعائية القلبية وتصلب الشرايين و نقص تروية العضلة القلبية Ischemia (Soares *et al.*, 2020) ، كما يحفز المستوى المرتفع من IL-6 تطور الالتهابات ومقاومة الانسولين واحداث خلل في الخلايا البائية ، كما ان له دور مضاد للالتهاب وفي بعض الاحيان يحفز التمثيل الغذائي للكلوكوز وذلك بسبب آلية تحويل اشارات الانترلوكين المعقدة ، اذ يعمل عبر عدة مسارات مثل المسار الكلاسيكي المضاد للالتهاب والاخر المحفز للالتهاب (Akbari & Hassan-Zadeh, 2018) .

قد تحدث اوضاع مختلفة لإشارات الانترلوكين حيث يمكن ان تبدأ اشاراته عندما يرتبط ال IL-6 بمستقبله المسمى مستقبل الانترلوكين عبر الغشاء Transmembrane IL-6 Receptor (mIL-6R) او القابل للذوبان Soluble IL-6 Receptor (sIL-6R) وجزيء تحويل الاشارة المسمى Glyco protein 130(gb130) والذي يعبر عنه في جميع الخلايا ، حيث تؤدي هذه المسارات المختلفة واختلاف التعبير عن المستقبلات او الارتباط بها الى تفسير الوظائف المتعددة لل IL-6 و يمكن أن يؤدي التعبير المفرط لل IL-6 والخلل الذي يحصل في تنظيم طرق مسار إشارات IL-6 إلى حدوث اضطرابات التهابية واضطرابات المناعة الذاتية بالإضافة إلى تطور السرطان (Uciechowski & Dempke, 2020)

مؤخرا تم تسجيل مستويات متزايدة منه في مرضى COVID -19 خاصة في المراحل المتقدمة من المرض ، اذ يعد احد اهم العلامات التشخيصية للإصابة ، حيث تم استخدام العديد من الادوية التي تثبط مسارات IL-6 لغرض تقليل الاضرار وتقليل اطلاق السايتوكاينينات الالتهابية الناجمة عن

الاصابة ب SARS-CoV-2 وبالتالي مقاومة الالتهابات الناجمة عن الاصابة بهذا المرض (Potere *et al* , 2021)

11-2 انزيمات الكبد :

1-11-2 انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphatase (ALP)

هو انزيم يتواجد في انسجة الجسم المختلفة وذو خصائص فيزيائية وكيميائية مميزة، يتواجد في الغشاء القنيوي للخلية الكبدية ، كما يوجد بمستويات مختلفة في المشيمة والغشاء المخاطي اللفائفي والكلى والعظام ويتم تجهيز معظم الفوسفاتيز القلوي في مصل الدم (اكثر من 80%) من الكبد والعظام وكميات قليلة من الأمعاء (Babu *et al*.,2020) وقد لوحظ وجود كميات متزايدة من ALP في الدم عند حدوث ضرر في الخلايا الكبدية ، اذ يتراوح مستوى ALP الطبيعي من 42 الى 147 وحدة دولية / لتر (Hasan *et al*., 2018)

ان المستويات غير الطبيعية لل (ALP) في الدم مؤشر لاصابة الكبد والمرارة واضطرابات العظام حيث يرتبط مستواه المرتفع في المصل بامراض القلب والاوعية الدموية وداء السكري نوع 2 وارتفاع ضغط الدم وخلل الدهون في الدم (Park *et al*., 2020) ، التهاب البنكرياس الصفراوي Biliary pancreatitis ، ويزاد تركيزه في حالة الاصابة باليرقان الانسدادي Obstructive jaundice اذ لوحظ ارتفاع ال ALP الى اكثر من 200 وحدة/لتر في حالات انسداد القنوات الصفراوية (Farhan *et al*., 2020)

2-11-2 الانزيمات الناقلة لمجموعة الأمين Asparatate Transaminase (AST) Alanine transaminase (ALT)

يتواجد انزيم AST على شكلين هما AST او يسمى (GOT1) Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1 في السايتوبلازم و AST او(GOT2) glutamic-Oxaloacetic transaminase 2 في الميتوكوندريا ،حيث يتواجد هذا الانزيم في العديد من الانسجة مثل القلب والكبد والعضلات الهيكلية وكذلك الكلى والدماغ والمستوى المرتفع ل AST

مؤشر لاصابة الانسجة مثل تحطم الغشاء البلازمي للخلايا او حدوث موت الخلايا المبرمج كما يزداد مستواه في حالة احتشاء عضلة القلب Ischemia (Ndrepepa, 2021)

كل من ALT و AST لها وظائف في عملية التمثيل الغذائي حيث تحفز هذه الانزيمات عملية التمثيل الغذائي للأحماض الأمينية ، يتواجد انزيم ALT بشكل اساسي في الكبد حيث يتواجد في العصارة الخلوية cytosol كما يوجد هذا الانزيم في العديد من الاعضاء الاخرى مثل القلب والعضلات الهيكلية (Nakajima *et al*.,2022; Visaria *et al*.,2020) . اذ يشير ارتفاع هذا الانزيم في الدم الى احتمالية إصابة خلايا الكبد ومدى شدتها (Aggarwal *et al*., 2020) و يعد قياس مستوى ALT مهما في تحديد امراض الكبد مثل التهاب الكبد الفيروسي ومرض الكبد الكحولي او مرض الكبد الدهني غير الكحولي Nonalcoholic fatty liver (NAFLD) disease كذلك يزداد في حالات نقص التروية (ischemia) ، داء السكري النوع 2 ، التصلب العصبي ،السمنة ، مقاومة الانسولين ومتلازمة التمثيل الغذائي (Cho *et al*., 2020 ; Bekkelund, 2021)

3-11-2 الالبومين Albumin

يحتوي مصل الدم على كميات كبيرة من البروتينات ويعد الالبومين البروتين الأساسي الموجود في الدم ويشكل حوالي 55% من بروتينات الدم وينتج في الكبد ويكون بشكل كروي صغيرو وزن جزيئي يبلغ حوالي 66.5 كيلو دالتون (Parodi *et al*., 2019)

يؤدي الالبومين العديد من الوظائف المهمة منها الحفاظ على ضغط الدم الازموزي و فضلا عن دوره في نقل الهرمونات والفيتامينات والأدوية المختلفة و كذلك الكاتيونات ثنائية التكافؤ مثل الزنك والكالسيوم في جميع انحاء الجسم (Spada *et al*., 2021)

12-2 الديسموتاز الفائق Superoxide Dismutase (SOD)

هو من اهم انزيمات مضادات الاكسدة التي تتواجد داخل وخارج اغشية الخلايا ، يقوم هذا الانزيم بتحفيز تفكيك جذور الاكسيد الفائق Superoxide radical (O_2-) الى بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide (H_2O_2) الذي يتحول لاحقا الى ماء واوكسجين بواسطة انزيم الكاتاليز

Catalase والجلوتاثيون بيروكسيديز Glutathione peroxidase وهذا بدوره يقلل من خطورة جذر الاكسيد الفائق (O_2-) (Zhu *et al.*, 2019) .

يعد هذا الانزيم اول انزيم استقلاب حقيقي لانواع الاوكسجين التفاعلية (ROS) له دور مهم في تجديد وإصلاح الخلايا عن طريق تقليل الاضرار الناجمة عن الجذور الحرة وبالتالي منع الامراض (Bisht, 2018) ، يتواجد هذا الانزيم في الثدييات بثلاث اشكال تسمى بحسب ايونات المعادن التي ترتبط بها كعامل مساعد وهي النحاس والزنك والمنغنيز الشكل SOD1 (Cu,Zn-SOD) في العصارة الخلوية والغشاء البيني للمايتكوندريا والشكل SOD2 (Mn-SOD) في المايتوكوندريا بينما الشكل SOD3 (Cu,Zn-SOD) في الحيز خارج الخلية ، كما يشارك ال SOD أيضا في إزالة جذور بيروكسي نيتريت peroxynitrite (ONOO-) المتكون من تفاعل أكسيد النتريك مع O_2– (Rosa *et al.*, 2021) يرتبط هذا الانزيم بعدة مشاكل صحية للإنسان بما في ذلك الاضطرابات المرتبطة بكريات الدم الحمراء RBC-related disorders وتكيس المبايض Cystic fibrosis (CF) وكذلك امراض الثدي الخبيثة ومتلازمة الألم بعد استئصال المرارة وأيضا التصلب الجانبي الضموري (Amyotrophic lateral sclerosis) وموت الخلايا المبرمج العصبي والايدز والسرطان كما اشاربعض الباحثين الى وجود علاقة بين مستويات ال SOD واحتمالية الاصابة بمرض الزهايمر (Younus, 2018).

13-2 الجلوتاثيون Glutathione

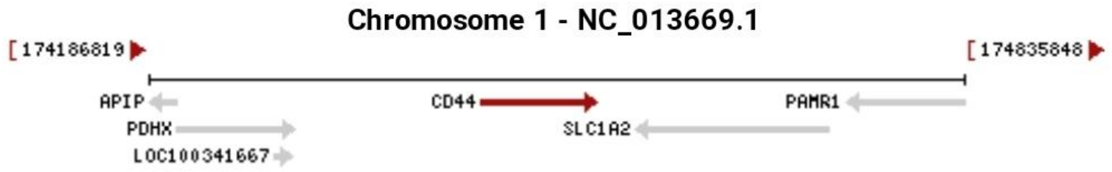
يعد الجلوتاثيون من اهم العوامل التي تساهم في تقليل الضرر التاكسدي و هو احد اهم وسائل الدفاع ضد الجذور الحرة (Goutzourelas *et al.*, 2018) ، وهو عبارة عن تركيب ثلاثي الببتيد يتكون من ارتباط ثلاثة احماض امينية هي السيستين Cysteine والجلوتاميت Glutamate والكلايسين Glycine حيث يوجد المركب بشكلين هما الشكل المؤكسد GSSG والشكل المختزل rGSH حيث يتضمن تكوين الأخير خطوتين تشمل انزيمين هما Glutamate Cysteine ligase (GCL) والأخر هو Glutathione synthetase (GSS) (Coco-Bassey *et al.*, 2019)

يعد الجلوتاثيون هو المادة الأساس التي يعمل عليها انزيم جلوتاثيون بيروكسيديز peroxidase Glutathione (Gaucher *et al.*, 2018) ، كما له دور وقائي ضد أنواع الاكسجين التفاعلية ROS)) خلال التفاعلات مع الانزيمات المرتبطة به مثل الجلوتاثيون بيروكسيديز في الانسجة المختلفة ، كما يقوم الجلوتاثيون بيروكسيديز بتحفيز اختزال جذر بيروكسيد الهيدروجين وتقليل عملية بيروكسيدية الدهون (Adeoye *et al.*, 2018) ، وهو من اكثر مضادات الاكسدة وفرة في الخلايا ويرتبط انخفاض مستوى GSH بالكثير من الامراض المزمنة والامراض المرتبطة بالعمر (Braidy et al., 2019)

ان التركيز المتزايد للشكل المختزل من الجلوتاثيون يبين دوره الرئيسي في العديد من العمليات البايلوجية المهمة مثل إزالة السموم فضلا عن الدفاع المضاد للفيروسات وفي تعزيز الاستجابة المناعية (Silvagno *et al.*, 2020)

14-2 جين *CD44*

يسمى جين *CD44* بـ(CD44 molecule (Indian blood group) ، وتسميته العلمية في الارانب Oryctolagus cuniculus (rabbit) ، يتواجد هذا الجين في اللبائن وفي العديد من الكائنات الحية ، ويتخذ مواقع مختلفة في كروموسومات اللبائن حيث يقع في الارانب على كرموسوم 1 ، ويقع في الانسان على كرموسوم 11 (Xu *et al.*,2020) ، ويقع على كرموسوم 2 في الفئران ويحتوي على اعداد مختلفة من الاكسونات حسب الكائنات الحية (Chen *et al.*,2020



.(;Sherman *et al.*,1994

الشكل (2-2) موقع جين *CD44* في الارانب على كروموسوم 1 (NCBI)

يلعب تعبير الجين العديد من الوظائف المهمة حيث انه يحافظ على بناء الانسجة من خلال تنظيم ارتباط الخلايا مع بعضها ، كما انه يساهم في هجرة الخلايا وتكاثرها وكذلك تكوين الاوعية الدموية (Dorschner *et al.*,2020) ، كما ان له دورا هاما في تنشيط الخلايا التائية ويشارك في وظيفة

الخلايا اللمفاوية ، وله دور في تحفيز مستقبلات المستضدات ، كما انه يشارك في التمثيل الغذائي للدهون من خلال تنظيم التعبير عن الجينات المشاركة في مسار التمثيل الغذائي للدهون (Jiang *et al.*,2020)، يزداد التعبير الجيني لهذا الجين في مختلف الحالات المرضية مثل امراض الكبد حيث اوضحت الدراسات ان تعبير جين *CD44* يزداد في المرضى الذين يعانون من الاعتلالات الكبدية على سبيل المثال اعتلال الكبد الاحتقاني Congestive hepatopathy (CH) وهو مرض يتطور تدريجيا ليسبب تليف الكبد وسرطان الكبد حيث يعد التهاب الكبد هو العامل الدافع لتليف الكبد وان تطور هذا الالتهاب يرفع تعبير جين *CD44* (Osawa *et al.*,2021) ، وذلك لمشاركته في الاستجابات الالتهابية المتضمنة تنشيط السيتوكينات المحفزة للالتهاب وهجرة الخلايا الضامة والعدلات (Hollingsworth *et al.*,2007) .

يعد جين *CD44* علامة مهمة للخلايا الجذعية السرطانية (CSC) لعدد من الاورام السرطانية مثل سرطان الثدي والقولون والمرارة والمعدة والكبد والمبيض والبنكرياس والبروستات، كما أن *CD44* له علاقة بانتشار الاورام الخبيثة كسرطان القولون وسرطان الثدي ، ويمكن استخدامه كمؤشر تنبؤي في سرطان الرئة (Xiao *et al.*,2018)، حيث يشارك ال *CD44* بقوة في انتشار الاورام الخبيثة لأنه يسهل التصاق الخلايا بالأوعية الدموية والهجرة عبر البطانة ،كما ويساعد على مقاومة الأدوية والعلاج الاشعاعي والكيميائي (Medrano-González *et al* .,2021)،

يشفر جين *CD44* البروتين السكري CD44 و هو بروتين مرتبط بالعمليات الحيوية المختلفة، كالالتهاب والاستجابات المناعية والتئام الجروح وتطور السرطان. (Müller *et al.*,2020)

يعمل البروتين على تحفيز الاشارات من خلال التفاعل مع عوامل النمو المرتبطة بسطح الخلية والانزيمات والسيتوكينات ويرتبط البروتين CD44 بحامض الهيالورونيك Hyaluronic acid (HA) مما يؤدي الى تجميع CD44 خارج الخلية الامر الذي يؤدي الى تنشيط الكينيزات kinase المختلفة التي تؤدي الى هجرة الخلايا (Ouhtit *et al.*,2018) و الهيالورونان HA هو جليكوز امينو جليكان غير مسلفن Nonsulfated glycosaminoglycan يشمل وحدات N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) و وحمض الجلوكورونيك (Glucuronic acid) وهو احد المكونات للنسيج خارج الخلية Extracellular matrix (ECM) ،وان لهذا الارتباط اهمية في حماية الانسجة وسلامتها الميكانيكية الحيوية الناتجة عن خصائصها الفيزيوكيميائية .يرتبط HA

بالماء ويشكل مواد هلامية لزجة تتفاعل مع البروتيوجلايكان Proteoglycans والجزيئات الكبيرة خارج الخلية مما يساعد في تشكيل النسيج خارج الخلية ، والتعبير الخاطئ لل HA يرتبط بالامراض كالسرطانات واضطرابات اخرى عديدة (Tammi *et al*.,2008) .

كما يلعب الارتباط بين بروتين CD44 و HA دورا هاما في حدوث تغيرات داخل الخلايا و ينشط مسارات متعددة تشارك في التصاق الخلية والهجرة والانتشار ومن المسارات التي يتم تنشيطها من خلال ربط CD44-HA هي بروتين Ras وكيناز البروتين المنشط بالميتوجين Mitogen – activated protein kinase وكذلك الفوسفواينوزيتايد 3- كاينيز Phosphoinositide 3-kinase وفي بعض السرطانات يؤدي تنشيط HA لـ CD44 إلى زيادة في تعبير جين *Bcl* المضاد لموت الخلايا المبرمج ، مما يؤدي الى تكاثر الخلايا السرطانية وبقائها (Chen *et al*.,2018)، ولا يقتصر ارتباط وتفاعل ال CD44 مع الهيالورونيك فقط وانما يتفاعل ويرتبط ايضا مع العديد من الروابط بما في ذلك الكولاجين والأوستيوبونتين Osteopontin والعديد من البروتينات المعدنية Metalloproteinases وهذا الارتباط مهم في اعادة ترتيب الهيكل الخلوي (Azevedo *et al*.,2018).

يشير ارتباط بروتين البلازما Osteopontin مع بروتين CD44 الى التنبؤ بالإصابة بالسرطان ويعزز اشارات الخلية المشاركة في تطور الورم (Weber *et al*.,1996) ، ويساعد هذا الارتباط ايضا الى تنشيط مسارات تعزز حركة الخلايا السرطانية وبقائها على قيد الحياة (denhardt *et al*.,2001) . ويمكن ان يساهم التفاعل والارتباط بين حمض الهيالورونيك والكولاجين والفيبرونكتين والبروتينات المعدنية و CD44 الى تنشيط الخلايا الليمفاوية والضامة و الكريات البيض وتجميعها لذلك يعد مشاركا في التفاعلات المناعية (Dzudzilo *et al*.,2021) .

كما ويساهم الCD44 في مقاومة الأنسولين المرتبط بالسمنة في العضلات والكبد والأنسجة الدهنية من خلال الارتباط بروابطه HA و Osteopontin. اذ ينظم CD44 ايض الجلوكوز والدهون في الأنسجة ، ويساهم في التسبب في أمراض التمثيل الغذائي المزمنة ، بما في ذلك السمنة والسكري حيث يؤدي تنظيم CD44 الناتج عن الهيالورونيك منخفض الوزن الجزيئي الى جعل الخلايا البائية اكثر عرضة لهجوم المناعة الذاتية ويضعف افراز الانسولين ويزيد من حالة فرط سكر الدم (Weng *et al*.,2022)

يظهر CD44 اشكال مختلفة منها (CD44s و CD44v) اضافة للعديد من الاشكال الاخرى ،منها ما هو مرتبط بالعديد من الاورام مثلا الشكل CD44v4-5 المرتبط بسرطان المريء الحرشفي ،و CD44v5-6 المرتبط بسرطان الرئة الغدي ، CD44v7-8 المرتبط بسرطان الخلايا الكبدية وعنق الرحم ، CD44v7-10 المرتبط بسرطان البروستات ، CD44v8-10 المرتبط بسرطان الثدي والمعدة والرئة ، CD44v4-10 المرتبط بسرطان الامعاء ، المرتبط بسرطان CD44v6 البنكرياس ، والكثير من الاشكال الاخرى المعبر عنها مع امراض سرطانية في اعضاء مختلفة (Mesrati *et al*., 2021).

15-2 النبات الطبي المستخدم في هذه الدراسة (الاندروجرافس)

الاسم الشائع : ملك المرارة

الاسم الإنجليزي : King of bitter

الاسم العلمي : *Andrographis paniculata*

وهو نبات عشبي سنوي موطنه الهند وسيريلانكا ويزرع على نطاق واسع في مناطق اسيا ويستخدم كعلاج عشبي تقليدي في هونغ كونغ والفلبين وماليزيا واندونيسيا (Firdous *et al*., 2020) ، يعرف هذا النبات باسم ملك المر بسبب مذاقه الشديد المرارة (Therasa *et al*., 2020) ، تم استخدامه ايضا في الطب التقليدي القديم في مختلف انحاء العالم (Sharma & Sharma ,2018)

ينمو هذا النبات أيضا بشكل متفرق على جانب الطريق ويلاحظ أيضا بين شقوق الجدران وفي الأراضي المنخفضة و التلال كما يلاحظ نمو هذا النبات في الأراضي البور (Cheepsattayakorn *et al*., 2021) ، فهو يمتاز بتفرعات واضحة ويزدهر سنويا من كانون الاول الى نيسان وينمو في الأراضي المنبسطة والمزارع والمواطن الرطبة وفي شواطئ البحر ويزرع كذلك في الحديقة والأماكن ذات الظل والغابات (Hossain *et al*., 2021)

يبلغ ارتفاع النبات من 30-110 سم و يكون الجذع رباعي الزوايا ونحيف ومتشعب للغاية ذو قوام هش سهل الانكسار ذو لون اخضر داكن ومربع في المقطع العرضي والأوراق بسيطة متقابلة رمحية الشكل طولها 2-12 سم وعرضها 1-3 سم ، حواف الأوراق حادة وكاملة ومتموجة قليلا

والزهرة ذات لون ابيض مع بقع وردية ارجوانية على البتلات والبذور ذات لون بني مصفر (Verma *et al.*, 2019).

صورة (2-1) نبات الاندروجرافس *Andrographis paniculata* (Palanikani *et al.*, 2020)

16-2 المكونات الكيميائية لنبات الاندروجرافس Chemical Components of *Andrographis paniculata*

يحتوي نبات الاندروجرافس نسبة عالية من الصابونيات Saponins ، القلويدات Alkaloids ، التيربينويدات Terpenoids ، الفينولات Phenols ، الفلافونويد Flavonoids و التانينات Tanins (Nagajothi *et al.*, 2018) ، وقد تم عزل مايقارب 135 مركب من هذا النبات منها 40 فلافونويد و 82 تربين Terpenes و كذلك 3 استيروييد Steroids بالإضافة الى 10 من المركبات الأخرى في النبات (Aminah *et al.*, 2021)

تحتوي عشبة الاندروجرافس على كثير من عناصر الفيتوكيميكالز Phytochemicals منها مركب الاندروجرافيلويد Andrographolide وهو ديتيربين لاكتون ثنائي الحلقات ويعد المادة النشطة بيولوجيا في النبات (Ketterman *et al*., 2020) يعود نشاط المركب الرئيسي هذا الى احتوائه على مجموعات هيدروجين اليفاتيه على ذرات كربون C-11 والتي يمكن ان تعمل كمانح للهيدروجين وبذلك يعمل على ازاحة الجذور الحرة (Andriani *et al*., 2018) ، كما يحتوي على العديد من المركبات الرئيسية النشطة الأخرى في الأوراق مثل مركب نيو اندروجرافيوليد Neoandrographolide و14-Deoxy-12-hydroxyandrographolide بالإضافة الى مركب 14-Deoxyandrographolide (Lim *et al*., 2021) ، كما يتضمن النبات على مركبات الاندروجرافوستيرين Andrographosterin والستيجماستيرول Stigmasterol (Rasool et al., 2018) و الاندروغرافيدين Andrographidine ومركب الابيجينين Apigenin ومركب اللوتولين Luteolin (Rafi *et al*., 2020) ، وتم تسجيل العديد من المركبات الأخرى ضمن أوراق النبات منها الاندروجرافين Andrographine ومركب البانيكولين Panicoline و البانيكوليد Paniculide والميثوكسي فلافون Methoxyflavone (Divisha *et al*., 2018) .

17-2 الاستخدامات الطبية لنبات الاندروجرافس Medicinal Uses of *Andrographis paniculata*

يستخدم نبات الاندروجرافس في علاج انواع عديدة من السرطان نظرا لاحتوائه على العديد من المركبات الفعالة ، فعادة ما تعالج الأورام السرطانية باستخدام العلاجات الكيميائية وهو علاج سريري رئيسي يستخدم للسيطرة على الأورام الخبيثة لذلك توجه الاطباء للبحث عن علاجات بديلة للتخلص من الاثار الجانبية المرتبطة بالعلاجات الكيميائية (Singh *et al*.,2018; Cheung *et al*.,2022) ، كما اثبت دوره في كونه مضاد للفيروسات (Wang *et al*., 2018 ; Gupta *et al*., 2017) حيث اثبتت فاعلية النبات ضد فيروس الانفلونزا A ال (H1N1) Influenza A virus subtype وفيروس التهاب الكبد B (HBV) Hipatitis B وفيروس الهربس البسيط 1 (HSV-1) Herpes simple virus وفيروس الحليمي البشري (HPV) Human

وكذلك له دور فعال ضد فيروس ابشتاين بار(EBV) Epstein-Bar papillomavirus (Murugan *et al*., 2021)، ومؤخرا تم استخدام نبات الاندروجرافس والمركبات الفعالة المستخرجة من هذا النبات مثل ال Andrographolide كعلاج فعال مضاد لفيروس كورونا المرتبط بالمتلازمة التنفسية الحادة النوع 2 ومايسمى اختصارا بال SARS-CoV-2 مما يفتح افاق جديدة في إمكانية استخدام مستخلصات نبات الاندروجرافس في علاج فيروس كورونا المستجد COVID-19 (Sa-Ngiamsuntorn *et al*.,2021) ، كما يقوم النبات بتحفيز الأنشطة المناعية في الجسم (Li *et al*., 2018 a) و يعمل كطارد للديدان (Bhattacharjee *et al*., 2020) وله دور وقائي ضد مرض السل والزحار واحتشاء عضلة القلب وتجلط الدم (Akilandeswari *et al*., 2019)

فضلا عن استخدامه لعلاج مختلف الامراض مثل الاسهال والحمى ونزلات البرد ومضاد للأكسدة و حماية القلب و الاوعية الدموية (Dai *et al*., 2019; Mussard *et al*.,2019 ; Wintachai *et al*.,2015;Akbar ,2011; Mishra *et al*., 2011) ، كما تم استخدام نبات الاندروجرافس كمادة علاجية لفرط سكر الدم و لتصلب الشرايين Anti-atherosclerotic مع تاثيرات وقائية ملحوظة للكبد (Dai *et al*., 2019; Jaiyesimi *et al*., 2020)

كشفت الأبحاث عن دور الاندروجرافس في كونه ذو خصائص وقائية لامراض الكلى ومضاد جيد للفطريات antifungal (Rastogi *et al*.,2014)، ،وتم دراسة الكثير من الأنشطة المحتملة للمركب النشط الرئيسي Andrographolide في النبات في مقاومة السمية والحماية العصبية وكذلك دوره المضاد للسمنة (Casamonti *et al*., 2019) ، ومضاد للالتهابات Palanikani *et al*.,2020) فقد اثبت النبات دوره في علاج التهابات البلعوم والحنجرة والتهاب الرئة والتهاب المسالك البولية والتهاب الدماغ بالإضافة الى علاج عسر الهضم ودوره المضاد للاسهال والتقرح والتهاب الجلد (Rajanna *et al*., 2021) مؤخرا تم دراسة النشاط المحتمل للنبات ضد شيخوخة الجلد باستخدام المستخلص الميثانولي من مركبات النبات ضد الاجهاد التاكسدي من حيث تخفيض انتاج أنواع الاكسجين التفاعلية ROS وتخفيض مستوى عامل التنخر الورمي نوع الفا TNF-α في الخلايا البشرية البالغة اذ اظهر المستخلص فعاليته ضد تلف البشرة (Mussard *et al*., 2020 a) كما اشارت العديد من الابحاث الى استخدام نبات الاندروجرافس كمعزز للمناعة ضد حمى الضنك مما أدى الى انخفاض الإصابات في المرض الى المعدل الطبيعي وهذا اثبت فعالية النبات ومركباته

الكيميائية المتعددة في كونها مثبط ومضاد للفيروس (Ramalingam *et al*., 2018) ، كما تم استخدام النبات كدواء خافض للحرارة وذو تأثيرات مسكنه في العلاجات الصينية التقليدية (Sun *et al*.,2019) ،بالإضافة الى ذلك تم استخدام المستخلص الايثانولي لنبات الاندروجرافس لتصنيع الجسيمات النانوية الفضية الخضراء وتم تقييمها من حيث الفعالية وتبين من النتائج ان الجسيمات النانوية الخضراء ذات فعالية عالية ضد طفيليات الفيلاريا Filarial parasites البالغة في الجسم الحي مقارنة بمستخلص الأوراق الخام للنبات (Yadav *et al*.,2020)

كما تم دراسة إمكانية الاندروجرافس على تنشيط الصفائح الدموية في عشرة متطوعين اصحاء بعد إعطاء جرامين من *A.paniculata* ثلاث مرات في يوم واحد وتم سحب الدم قبل وبعد ساعتين و 24 ساعة من إعطاء النبات لتحليل تاثيره على تراكم الصفائح الدموية حيث كشفت الدراسة عن انخفاض تراكم الصفائح الدموية بعد إعطاء الاندروجرافس (Sirikarin *et al*., 2018) .

المواد وطرائق العمل
Materials and Methods

1-3 المواد Materials

1-1-3الأجهزة

جدول (3-1) الأجهزة المستخدمة حسب المنشأ والشركة

الشركة	المنشأ	الاجهزة
Geneaid	Taiwan	أعمدة ربط Rb column
LG	USA	ثلاجة Refrigerator
Bioneer	Korea	جهاز PCR
Bioneer	Korea	جهاز Real – Time PCR
Gallen Kamp	England	جهاز التقطير Water Distillator
Bioneer	Korea	جهاز الطرد Exispin vortex centrifuge المركزي
Gallen Kamp	England	جهاز الطرد المركزي Centrifuge
Hettich	Germany	جهاز الطرد المركزي المبرد Cooling Centrifuge
Daihan Labtech	Korea	حاضنة Digital Incubator
Gallen Kamp	England	حمام مائي Water Bath
Histoline	Italy	صفيحة ساخنه Hot Plate
Binder	Germany	فرن كهربائي Electric Oven
Jeio Tech	Korea	كابينة بيولوجية Laminar flow cabinet
PMPHD 60 f	Japan	كاميرا رقمية Camera Digital
Olympus	Japan	مجهر ضوئي Light microscope
Leitz wetzlar	England	المشراح الدوار Rotary microtome
National	Italy	مطحنة كهربائية Electric Grinder
Apple 203	Japan	مطياف ضوئي Spectrophotometer
MMK	China	ميزان الكتروني Electric balance
Dubuque	USA	مازج Vortex

3-1-2 الأدوات

جدول (3-2) الأدوات الزجاجية والبلاستيكية حسب المنشأ والشركة

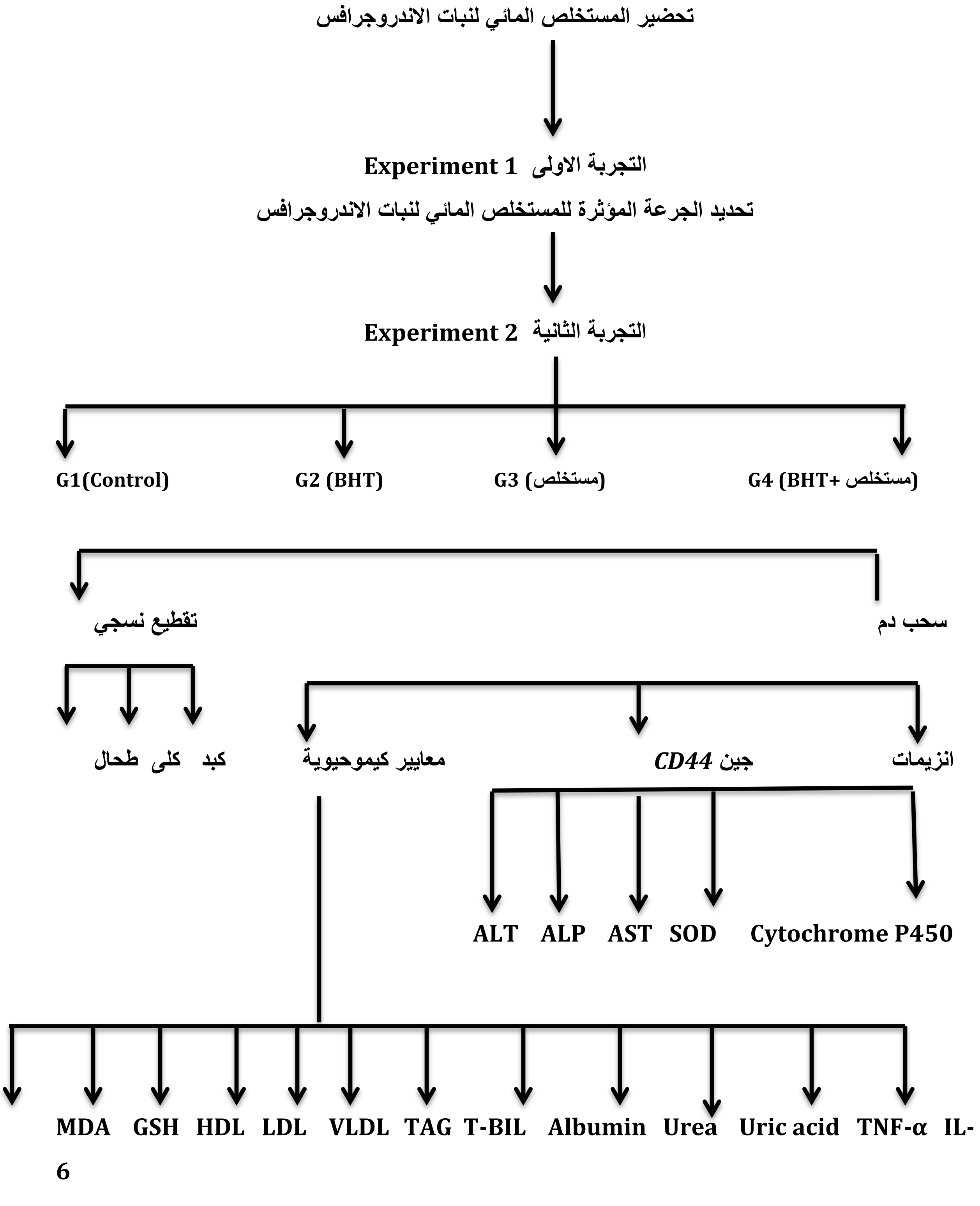
الأدوات الزجاجية والبلاستيكية	المنشأ	الشركة
أدوات بلاستيكية مختلفة الاحجام	Denmark	Nunclon
انابيب اختبار بلاستيكية plastic test tube	Germany	Esplf
انابيب جامعة Collecting Tube	Taiwan	Geneaid
انابيب جل تيوب Gel tube	Germany	Harshman
انابيب غير حاوية على مادة مانعة للتخثر	Jordan	Gold star
انابيب مانعة للتخثر EDTA tube	Jordan	Gold star
انبوبة اختبار Eppendrof Tube	Canda	BioBasic
زجاجيات مختلفة الاحجام Pyrex	England	Volac
شرائح زجاجية Slides	China	China MHECO
عدة تشريح Dissecting Set	Pakestan	S.I.E
عمود زجاجي	China	China MHECO
ماصات اوتوماتيكية Automatic Micropipetts	Canda	BioBasic
ماصات دقيقة باحجام مختلفة micropipetts	Germany	Human
مجرعة فموية	Italy	Roma
محاقن طبية Disposable syringes	S.A.R	Medical ject

3-1-3 المواد الكيميائية Chemical Material

جدول (3-3) المواد الكيميائية حسب المنشأ والشركة

المادة	المنشأ	الشركة
بوادئ Oligo Primers	Korea	Bioneer
بوادئ Primers	Korea	Bioneer
زايلين Xylene	England	BDH
شمع البرافين Paraffin Wax	Germany	Merck
صبغة هيماتوكسين و الايوسين	England	BDH

		Hemotoxyline & Eosin
Bioneer	Korea	عدة 2x Green Star qPCR master mix
Taiwan	Geneaid	عدة استخلاص ال GENEZOL RNA ™ TriRNA Pure Kit
Bioneer	Korea	عدة تصنيع الحمض النووي cDNA AccuPower® RocketScript™ RT Master Mix, RNase H Minus
Atlas	U.S.A	عدة تقدير الكولسترول TC والدهون الثلاثية TG والشحوم البروتيني عالية الكثافة HDL- C
Biomerieux	France	عدة قياس ALP
Giesse	Italy	عدة قياس SOD
Biolabo	France	عدة قياس الالبومين Albumin
Kono bioech	Japan	عدة قياس الانترلوكين 6
Linear chemicals S.L.	Spain	عدة قياس البليروبن الكلي T-Bil
Kono bioech	Japan	عدة قياس السيتوكروم Cytochrome P450
Biomerieux	France	عدة قياس اليوريا Urea
Linear chemicals S.L.	Spain	عدة قياس حمض اليوريك Uric acid
Kono bioech	Japan	عدة قياس عامل التنخر الورمي TNF-α
BDH	England	فورمالين Formalin
BDH	England	كحول اثيلي Ethanol
BDH	England	كلوروفورم Chloroform
BDH	England	كندا بلسم Canada balsam
Eastman	USA	مادة BHT



شكل (3-1) مخطط تصميم التجربة

2-3 حيوانات التجربة

تضمنت هذه الدراسة استخدام 100 ارنب من ذكور الارانب البيض *Oryctolagus cuniculus* التي تراوحت اعمارها بين 8-9 اشهر ومعدل اوزانها مابين 1500-2000 غرام تم شرائها من الأسواق المحلية وتم وضعها في اقفاص اعدت لهذا الغرض ، اجريت الدراسة في البيت الحيواني التابع الى كلية الطب البيطري – جامعة كربلاء ، تم اخضاع الحيوانات للظروف المختبرية الخاصة بدرجة حرارة 25 م وبتهوية مناسبة وظروف الضوء والظلام ب 12 ساعة ضوء و 12 ساعة ظلام ، استعملت في تغذيتها عليقة من البلت المركز concentrate pullet والتي تتكون من (10 % بروتين خام ، 20 % فول الصويا ، 35 % طحين الحنطة ، 35 % ذرة ، بالإضافة الى الفيتامينات والمعادن 1 ملغم/كغم) تم ترك الحيوانات مدة أسبوعين للتأقلم مع الظروف المختبرية المعدة مسبقا قبل استعمالها .

3-3 تحضير المستخلص المائي

استهدفت التجربة الأولى تحضير المستخلص المائي لنبات *Andrographis paniculata* تم شراء النبات من الأسواق المحلية (معشب ابن سينا) وتم تصنيف النبات كالاتي :

Class : Dicotyledonae

Subclass : Gamopellatae

Order : Personales

Family : Acanthoideae

Genus : *Andrographis*

Species : *Andrographis paniculata*

(Hossain *et al*.,2014)

تم استخدام 20 غم من المسحوق الجاف تم مزجه مع 400 مل من الماء المقطر ، استعمل الخلاط الكهربائي وترك بدرجة حرارة الغرفة وذلك لمدة 24 ساعة ، استعملت طبقات عديدة من الشاش الطبي لغرض ترشيح الخليط والتخلص من العوالق، بعد ذلك طرد مركزيا بسرعة 3000 دورة / دقيقة ل 10 دقائق ، تم ترشيح المستخلص باوراق الترشيح نوع Whatman No. 0.1 وذلك للحصول على محلول رائق . استعمل الفرن الكهربائي في تجفيف المستخلص وذلك بدرجة حرارة 40 م وحفظ في الثلاجة لحين استعماله (Hernandezi et al ,1994)

تم اعتماد الطريقة أعلاه في تحضير مستخلص نبات الاندروجرافس وذلك مع بعض التحويرات وكما يلي :

طحنت الأوراق الجافة جيدا باستعمال المطحنة الكهربائية و نقعت بالماء المقطر لمدة 24 ساعة مع تحريكها باستمرار وتم ترشيحها وباستعمال طبقات الشاش الطبي وقطع القماش الناعم والنظيف ، بعد ذلك تم صب المنقوع في اواني زجاجية نظيفة ومعقمة لغرض تجفيفه على هواء المروحة فقط ثم حفظ المستخلص في الثلاجة الى حين استخدامه.

4-3 تصميم التجربة Experiment Design

1-4-3 التجربة الأولى Experiment 1

صممت هذه التجربة لتحديد الجرعة المؤثرة ED_{50} من المستخلص المائي لنبات *Andrographis paniculata* وتتضمن هذه التجربة استخدام 60 من ذكور الارانب البيض قسمت الى ستة مجاميع (10 حيوان / مجموعة) تم تجريعها فمويا ويوميا لمدة أربعة أسابيع وعلى النحو التالي :

المجموعة الأولى : أعطيت 1 مل / كغم من الماء الاعتيادي وعدت كمجموعة سيطرة

المجموعة الثانية : أعطيت 50 ملغم/ كغم من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافيس

المجموعة الثالثة : أعطيت 100 ملغم / كغم من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافيس

المجموعة الرابعة : أعطيت 150 ملغم / كغم من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافيس

المجموعة الخامسة : أعطيت 200 ملغم / كغم من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافيس

المجموعة السادسة : أعطيت 250 ملغم / كغم من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافيس

تم سحب عينات الدم بعد مرور شهر واحد ، سحب 5 مل من الدم مباشرة من القلب باستخدام محاقن طبية معقمة بسعة 5مل وضع الدم بعد ذلك في انابيب خاصة غير حاوية على مادة مانعة للتخثر ثم فصل المصل بواسطة جهاز الطرد المركزي Centerfuge لقياس المعايير التالية :

1 - تركيز المالونالديهايد Malondialdehyde (MDA)

2 - تركيز الكلوتاثيون المختزل Reduced Glutathion (GSH)

3 - تركيز الكولسترول الكلي Total Cholesterol (TC)

4 - تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة High Density Lipoprotein (HDL)

2-4-3 التجربة الثانية Experiment 2

استخدم 40 من ذكور الارانب البيض قسمت الى اربعة مجاميع (10 حيوان / مجموعة) :

المجموعة الأولى : جرعت فمويا ب 1 مل من زيت الذرة وعدت مجموعة سيطرة

المجموعة الثانية : جرعت فمويا بجرعة (1mg /kg) من مادة BHT

المجموعة الثالثة : جرعت فمويا بالجرعة المؤثرة ED50 (100 mg/kg) من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافيس

المجموعة الرابعة : جرعت فمويا ب (1mg/kg) من مادة BHT + الجرعة المؤثرة ED50 (100 mg/kg) من المستخلص المائي لنبات الاندروجرافيس

1-2-4-3 سحب الدم

سحبت عينات الدم بعد تجويع الحيوانات طوال الليل وذلك بعد مرور شهر ، تم سحب 5 مل من الدم مباشرة من القلب باستخدام محاقن طبية معقمة بسعة 5 مل ، بعد ذلك تم وضع الدم في انابيب خاصة غير حاوية على مادة مانعة للتخثر وفصل المصل بواسطة جهاز الطرد المركزي Centerfuge بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة لقياس المعايير التالية :

1 - المعايير الانزيمية

فعالية انزيم ناقلة الاسبارتات Aspartate transaminase (AST)

فعالية انزيم الناقل للامين Alanine transaminase (ALT)

فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase (ALP)

فعالية انزيم سوبر أكسيد ديسميوتاز Superoxide dismutase (SOD)

2 – المعايير الكيموحيوية

تركيز المالونالديهايد Malondialdehyde (MDA)

تركيز الكلوتاثيون المختزل Reduced Glutathion (GSH)

تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة High Density Lipoprotein (HDL)

تركيز الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة Low Density Lipoprotein (LDL)

تركيز الشحوم البروتينية منخفضة الكثافة جدا Very Low Density Lipoprotein (VLDL)

تركيز الدهون الثلاثية Triacylglycerol (TAG)

تركيز البيليروبن الكلي Total Bilirubin (T-BIL)

تركيز الالبومين Albumin

تركيز اليوريا Urea

تركيز حمض اليوريك Uric acid

تركيز عامل التنخر الورمي نوع الفا Tumor necrosis factor (TNF-α)

تركيز الانترلوكين Interleukin 6 (IL-6)

تركيزالسيتوكروم Cytochrome P450

5-3 قياس فعالية الانزيمات

أجريت قياسات فعالية الانزيمات باستخدام عدة التحاليل (Kits) الخاصة بكل انزيم بالاعتماد على الطريقة المناعية Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) من خلال استخدام جهاز ELISA Reader من نوع Axiom Minireader الألماني المنشأ وتم اجراء الخطوات لقياس فعالية الانزيمات من خلال اتباع الخطوات المرافقة لكل طقم وكالاتي :

1-5-3 تقدير فعالية الانزيمات الناقلة لمجموعة الأمين Alanine transaminase (ALT) & Asparate transaminase (AST)

لغرض تقدير فعالية الانزيمات الناقلة للامين ALT و AST تم اتباع الطريقة اللونية المستخدمة من قبل العالمين Bergmeyer and Bernt (1974) وذلك باستخدام عدة التحاليل الجاهزة من شركة Giesse الإيطالية .

الكواشف المستخدمة :

1-المحلول الدارئ او المنظم Buffer Solution

يحتوي هذا المحلول على تركيز 100ملي مول/ لتر من منظم الفوسفات Phosphate Buffer مع مقدار 7.4 من الاس الهيدروجيني وتركيز 100 ملي مول /لتر من الاسبارتيت L-aspartate و α-ketoglutarate بتركيز 2 ملي مول / لتر ويكون المحلول جاهزا للاستخدام ويحافظ على استقرارة في درجة حرارة 8-2 مئوية .

2- محلول ثنائي فنيل هايدرازين 2,4 Dinitrophenyl hydrazine DNPH

تم استخدام هذا المحلول بتركيز 2 ملي مول / لتر بعد ذلك استخدم لتر من الماء المقطر لتخفيف محتوى علبة واحدة من الكاشف ثم تم ترك المحلول بدرجة 8-2 م ليستقر عند حفظه .

3- المحلول القياسي Standard Solution

تم استخدام محلول البايروفيت بتركيز 1 مل واضيف له محلول منظم الفوسفات phosphate Buffer بتركيز 4 مل ورقم هيدروجيني 7.4 .

محاليل العمل : تم عمل مجموعة من انابيب الاختبار وكما يلي :

1- محلول البلانك Blank Solution

وضع 0.5 مل من المحلول الدارئ في انبوبة اختبار وتم إضافة 100 مايكروليتر من الماء المقطر اليها مع رجها جيدا .

2-محلول الاختبار Test Solution

وضع 0.5 من المحلول الدارئ في انبوبة اختبار وتم إضافة 100 مايكروليتر من مصل الدم اليها ورجت جيدا .

3-محلول السيطرة Control Solution

وضع 0.5 من المحلول الدارئ في انبوبة اختبار ثالثة

4- المحلول القياسي

تم استخدام انبوبة اختبار رابعة وضع فيها المحلول الدارئ بتركيز 0.5 مل واضيف اليها المحلول القياسي بتركيز 100 مايكروليتر ورجت جيدا .

طريقة العمل :

وضعت الانابيب الأربعة في حمام مائي لمدة 60 دقيقة وبدرجة حرارة 37 سيليزية وذلك عند قياس AST بينما كانت المدة 30 دقيقة عند قياس ALT ، بعد ذلك اضيف 0.5 مل من 4.2 مولاري ثنائي فنيل هايدرازين DNPH الى الانابيب الأربعة ورجت جيدا ثم تم إضافة مصل الدم بتركيز 0.1 مل الى محلول السيطرة وبعد مرور 20 دقيقة تم إضافة 5 مل من 0.4 مولاري هيدروكسيد الصوديوم الى الانابيب الأربعة وتم تركها لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة ، كما تمت معايرة جهاز المطياف الضوئي أولا بالماء المقطر وثانيا بالكاشف بطول موجي 516 نانومتر .

الحسابات : قرأت امتصاصية جميع الانابيب وتم استخدام المعادلة الاتية لحساب فعالية الانزيمين

AST في المصل (وحدة دولية /لتر) = $\frac{\text{الاختبار} - \text{السيطرة}}{\text{القياسي} - \text{البلانك}}$ x 133

ALT في المصل (وحدة دولية /لتر) = $\frac{\text{الاختبار} - \text{السيطرة}}{\text{القياسي} - \text{البلانك}}$ x 67

2-5-3 تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في مصل الدم Determination Alkaline Phosphatase (ALP) Activity in Blood Serum

المبدأ الأساس Basic Principle

قدرت فعالية انزيم ALP استنادا الى طريقة (Engvall and Perlmann, 1971) من خلال استخدام العدة الجاهزة kit وباستخدام الطريقة الانزيمية وهي طريقة لونية تعتمد على استخدام المادة الأساس (substrate) التي يعمل عليها الفوسفاتيز القاعدي (Alkaline Phosphatase)

المحاليل المستخدمة Reagents Used

1-محلول المادة المنظمة Substrate Buffer Solution

يحتوي على تركيز (5) ملي مول / لتر من مركب (Disodium Phenyl Phosphate) مع تركيز (50) ملي مول / لتر من محلول (Carbonate-Bio Carbonate) في دالة حامضية (PH = 10) .

2- المحلول القياسي Standard Solution

يتكون من مركب الفينول بتركيز 20 ملي مول /لتر

3- المحلول المثبط Inhibitor Solution

يحتوي على تركيز 60 ملي مول /لتر من مركب (potassium ferricanide) مع 75 غرام /لتر من مركب (Sodium Arsenate) .

4- المحلول الملون Color Solution

يحتوي على تركيز 60 ملي مول /لتر من مركب (4-Amino-Antipyrine) .

طريقة العمل Procedure

1- محلول الاختبار Test Solution

تم وضع 2 مليلتر في انبوبة اختبار من المادة الأساس ثم وضعت في حمام مائي بدرجة 37 سيليزية لمدة 5 دقائق ، بعدها تم إضافة 50 مايكروليتر من مصل الدم واعيدت الانبوبة الى الحمام المائي لمدة 15 دقيقة وبدرجة الحرارة نفسها ، وتم إضافة 0.5 مليلتر من المحلول المثبط اليها ومزج جيدا وبعدها إضيف المحلول الملون بتركيز 0.5 مليلتر .

2- محلول السيطرة Control Solution

وضع 2 مليلتر في انبوبة اختبار من المادة الأساس ثم تم وضعها في حمام مائي لمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة 37 سيليزية ، تم إضافة 0.5 مليليتر من المحلول المثبط وبعد ان مزجت جيدا تم إضافة 0.5 مليليتر من المحلول الملون وبعدما مزجت جيدا اضيف اليها 50 مايكروليتر من مصل الدم .

3- المحلول القياسي Standard Solution

تم وضع 2 مليلتر في انبوبة اختبار من المادة الأساس بعدها تم وضعها في حمام مائي لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 37 سيليزية ، ثم تم إضافة 50 مايكروليتر من المحلول القياسي، بعدها اعيدت الانبوبة الى الحمام المائي لمدة 15 دقيقة بدرجة الحرارة ذاتها كما تم إضافة 0.5 مليليتر من المحلول المثبط للانبوبة ومزجت جيدا ويلي ذلك إضافة 0.5 مليلتر من المحلول الملون .

4- المحلول الثابت Blank Solution

وضع 2 مليليتر من المادة الأساس في انبوبة اختبار ثم نقلت الى حمام مائي لمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة 37 سيليزية ثم تم إضافة 0.5 مليليتر من المحلول المثبط وبعد مزجها جيدا اضيف 0.5 مليليتر من المحلول الملون مع استمرار المزج بالشكل المطلوب، بعدها تم إضافة 50 مايكروليتر من الماء المقطر . تم وضع جميع الانابيب لمدة 10 دقائق في مكان مظلم ثم قرات الامتصاصية عند طول موجي 510 نانوميتر مقابل محلول الكفء.

الحسابات Calculation

تم حساب فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP) في العينة وفق القانون الاتي :

$$\frac{\text{شدة امتصاصية محلول الاختبار – امتصاصية محلول السيطرة}}{\text{شدة امتصاصية المحلول القياسي}} \times \text{تركيز المحلول القياسي بوحدة (U/L)}$$

3-5-3 تقدير فعالية إنزيم سوبر أوكسيد دسميوتيز (SOD)

Determination of Superoxide Dismutase Activity in Blood (SOD)

المبدأ الأساس: Basin Principle

قدرت فعالية إنزيم سوبر أوكسيد دسميوتيز وذلك باستخدام طريقة التفاعل الضوئي - الكيميائـي (Modified photochemical method) بأستخدام صبغة Nitroblue Tetrazolum (NBT) حيث تضمنت هذ الطريقة استخدام سيانيد الصوديوم كمثبط لانزيم البيروكسيديز,وتكون هذه الطريقة لتقدير فعالية انزيم SOD غير مباشرة من خلال ظهور تغير في الكثافة الضوئية للفورمازين المتكون من اختزال 0.5 لصبغـــــة نايتروبلوتترازوليوم(NBT) الذي بدوره يتولد من تشعيع مصـــل الـــــدم (Chandrakar *et al*., 2016) إذ أن الانخفاض في الكثافة الضوئية للفورمازين دلالة على زيادة فعالية إنزيم(SOD) .

تحضير الكواشف: Preparation of Reagent

1. محلول الفوسفات المنظم بتركيز (50 mmol) و pH7.8 ويحتوي على 0.1 mmol EDTA و Triton X-100 (0.025%) .
2. محلول ميثونين L – Methionine Solution 0.2M
3. محلول 1.75mM نايتروبلوتتر ازوليوم ثنائي الهيدروكلوريك
4. ترايتون 1% Triton (X-100)
5. رايبوفلافين Riboflavin solution (117mmol)
6. محلول سيانيد الصوديوم Sodium cyanide solution 2 mmol
7. محلول التفاعل Reaction mixture solution يحضر بمزج117 مل من المحلول (1) و1.25 مل من محلول (2) و 1.0 مل من المحلول (3) و 0.75 مل من المحلول (4)

طريقة العمل: Procedure

وضعت طريقة العمل لتقدير فعالية انزيم سوبر اوكسيد دسميوتيز حسب الجدول الاتي :

Control	Blank	Test	المحاليل
3 µl	3 µl	3 ml	Reaction Mixture

Sodium Cyanide	40 µl	40 µl	40 µl
Serum	150 µl	_	_
Working Buffer S.	0.523 ml	0.15+0.523 ml	0.15+0.523 ml
Riboflavin (B2)	40 µl	40 µl	40 µl

تم حضن الأنابيب بدرجة 37 م لمدة 6 دقائق ثم تم تشعيع جميع الانابيب عدا الكفى باستخدام مصباح فلورسنت 20 واط مثبت بصندوق مغلق لمدة 10 دقائق وبدرجة 25 درجة مئوية ثم تم قياس شدة الامتصاص عند 560 نانوميتر بعد التصفير على الكفى .

50% inhibition =1 Unit of SOD

$$SOD\ activity = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \div 50\% \times \frac{System\ Volume}{Samble\ Volume}$$

حيث :

A0= امتصاصية المادة القياسية

A1= امتصاصية العينة

(Zhang *et al.*, 2016)

6-3 الفحوصات الكيموحيوية

1-6-3 تقدير تركيز المالونالديهايد في مصل الدم Malondialdehyde (MDA)

تم استخدام طريقة تفاعل حامض الثايوباربيتيورك Thiobarbituric acid (TBA) حيث استخدم جهاز المطياف الضوئي لقياس تركيز المالونلديهايد Malondialdehyde (MDA)

الذي يعد احد النواتج الرئيسية لعملية اكسدة الدهون ومستواه يعد مؤشر لهذه العملية والقياس يعتمد على التفاعل بين المالونالديهايد وال (TBA) (Muslih *et al.*,2001)

المحاليل المستخدمة

1- محلول الثايوبارباتيورك (TBA- solution)

حضر هذا المحلول باذابة 0.6 غم من مادة TBA في 100 مللتر من الصودا الكاوية وذلك بتركيز 0.05 مولالي باستخدام القليل من التسخين وتم تحضير هذا المحلول عند الاستعمال .

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

حضر بتركيزين الأول هو 17.5 يتم تحضيره باذابة 17.5 غم من مادة TCA في 100 مللتر من الماء المقطر ، اما التركيز الثاني ال 70 % تم تحضيره باذابة 70 غم من المادة نفسها في 100 مللتر من الماء المقطر ، ووضع في الثلاجة الى حين الاستخدام .

طريقة العمل

1- تم اخذ 150 مايكروليتر من مصل الدم واضيف اليه 1 مل من محلول TCA بتركيز 17.5 % ثم تم إضافة 1 مللتر من محلول TBA الى المزيج ورج جيدا ثم حضنت هذه الانابيب في الماء المغلي لمدة 15 دقيقة .

2- تم تبريد العينات اضيف اليها 1 مللتر من محلول TCA بتركيز 70 % وبعد ذلك ترك هذا المزيج بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 20 دقيقة .

3- تم فصل الراشح وذلك باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق

4- تم استخدام جهاز المطياف الضوئي لقراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 532 نانوميتر وتم حساب مستوى MDA حسب المعادلة التالية :

تركيز المالونالديهايد (ميكرومول / مول) = امتصاصية العينة عند 532 نانوميتر / Eo x L

X معامل التخفيف

اذ ان :

L= light path (1 cm) .

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

0.15 /

معامل التخفيف = 6.7 = 1 ml vol. Used in Ref

2-6-3 تقدير تركيز الكلوتاثيون المختزل في مصل الدم Reduced Glutathione (GSH)

تم قياس تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم وذلك باستخدام طريقة كاشف المان Ellmans المتبعة من قبل AL-Zamely (2001)

المحاليل المستخدمة

1- محلول حامض السلفوسالسيليك sulfosalicylic acid solution

تم تحضيره باذابة 4 غم من حامض السلفوسالسيليك في 100 ملليلتر من الماء المقطر وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام .

2- محلول دارئ الفوسفات phosphate buffer solution

تم تحضيره بمزج (0.6 M KH_2PO_4) و (0.08 M Na_2HPO_4)، بعدها تم ضبط الاس الهيدروجيني عند 8 .

3- محلول كاشف المان Ellmans

تم تحضيره بتركيز 0.1 ملي مول وذلك باذابة 0.00396 غم من مادة 5-5 dithio bis 2- nitrobenzoic acid (DTNB) في 100 ملليلتر من المحلول المنظم وبعد ذلك تم حفظ الكاشف في الثلاجة .

طريقة العمل

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

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

3- في انبوبة اختبار سحب 150 مايكروليتر من الراشح واضيف اليه 4.5 مللتر من كاشف المان Ellmans 0.1 ملي مول وترك لمدة 5 دقائق .

4- باستخدام جهاز المطياف الضوئي تم قراءة الامتصاصية بطول موجي 412 نانوميتر.

تم حساب تركيز الكلوتاثيون في مصل الدم باستخدام المعادلة التالية :

تركيز الكلوتاثيون (ميكرومول / مول) = العينة عند 412 نانوميتر / Eo X L

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

L= light path (cm)

3-6-3 تقدير تركيز الكوليسترول الكلي في مصل الدم Total Cholesterol (TC)

تم تقدير تركيز الكوليستيرول في مصل الدم بالطريقة الانزيمية وفقا لطريقة Allani (1974) اذ تعتمد هذه الطريقة على تحويل Cholesterol Esterase بوجود الاوكسجين (O_2) وانزيم Cholesterol Oxidase ، اللذان يعملان على اكسدة الكوليسترول الحر المتكون نتيجة التفاعل الاول الى (Cholest -4en-3one) و (Hydrogen Peroxidase) وهذا الاخير يتفاعل مع الفينول Phenol و 4- Aminoantipyrinel وبوجود انزيم

Peroxidase ليكون كيتون امين Quinoneoimine وردي اللون وكما موضح في المعادلات الاتية :

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

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

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

طريقة العمل

تم استخدام ثلاث انابيب اختبار هي العينة Sample ، المحلول القياسي Standard والكفئ Blank وحسب الجدول التالي :

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

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

الحسابات

تم حساب تركيز الكوليسترول الكلي وفقا للقانون الاتي :

$$\text{Total Cholesterol Mg/dl} = \frac{\text{sample}}{\text{Standard}} \times n$$

اذ ان :

N = 200 وهو تركيز المحلول القياسي.

Sample= الامتصاصية الضوئية لعينة المصل .

Standard = الامتصاصية الضوئية للمحلول القياسي .

4-6-3 تقدير تركيز الشحوم البروتينية عالية الكثافة في مصل الدم High Density Lipoprotein (HDL)

تم تقدير تركيزالشحوم البروتينية عالية الكثافة HDL cholesterol وفقا لطريقة Burstein (1970)وهي طريقة انزيمية تعتمد على ترسيب دقائق الاستحلاب (الكيلوسية) و LDL و VLDL المتواجدة في مصل الدم وذلك بإضافة معامل الترسيب Precipitating reagent الى مصل العينات وبعد نهاية العملية تم وضع العينات في جهاز الطرد المركزي وبعد عملية الترسيب يتكون محلول رائق يحتوي على HDL والذي يمكن قياس مستوى الكوليسترول فيه باستخدام كاشف Reagent A من عدة تقدير مستوى الكوليسترول .

طريقة العمل

تتضمن عملية تقدير مستوى HDL cholesterol خطوتين هما :

1- الترسيب

تم استخدام هذه الخطوة لتحضير الراشح (الرائق) بإضافة 0.5 مل من محلول الترسيب Reagent 1 الى 0.5 مل من مصل الدم وبعد مزجه جيدا ترك لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة بعد ذلك تم وضعه في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعة 3000 دورة / دقيقة .

2- تقدير كمية HDL cholesterol

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

المحاليل	Blank	Sample	Standard
محلول رائق من Sample		0.5 µ	
Standard			
Blank	0.5 µ		
Working Reagent	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

بعد ذلك تم إضافة 2.0 مل من Reagent A الى المحاليل الثلاثة المذكورة أعلاه ومزجت جيدا ثم تم تركها لمدة 5 دقائق في حمام مائي بدرجة 37 م وقرأت الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 510 نانوميتر .

الحسابات

تم حساب تركيز HDL cholesterol وفقا للقانون التالي :

S.HDL-Cocentration = sample ×C.STD×2 Standard

اذ ان :

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

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

5-6-3 تقدير تركيز الشحوم البروتينة الواطئة الكثافة Low Density Lipoprotein (LDL)

تم حساب تركيز ال LDL في مصل الدم اعتمادا على المعادلة التالية :

LDL = TCH – (HDL + TG/5) (Friedewald *et al.*,1972)

6-6-3 تقدير تركيز الشحوم البروتينة الواطئة الكثافة جدا Very Low Density Lipoprotein (VLDL)

تم حساب تركيز VLDL في مصل الدم وفقا للمعادلة الاتية :

VLDL = Triglyceride concentration / 5 (Friedewald *et al.*, 1972)

7-6-3 تقدير تركيز الكليسريدات الثلاثية Triacylglycerol (TAG)

تم استخدام طريقة Fassati and Principe (1982) في تقدير تركيز الكليسريدات الثلاثية اذ تعتمد هذه الطريقة على استخدام سلسلة من التفاعلات الكيميائية لغرض تحويل الكليسريدات الثلاثية الموجودة في مصل الدم الى كيتون امين وردي اللون اثناء وجود عدد من الانزيمات كما في التفاعلات الاتية :

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

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

Glycero1-3-phsphate

oxidase

Glycerol -3 - phosphate+ O_2 ⟶ Dihydroxyacetone phosphate $+H_2O_2$

$2H_2O_2$ +Parachlorophenol +4 –aminoantipyrine —Peroxidase→ Quinonea mine $+4H_2O$

طريقة العمل :

تم استخدم ثلاث انابيب اختبار هي المحلول القياسي Standard والعينة Sample والكفئ Blank وحسب الجدول التالي :

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

بعد ذلك تم إضافة محلول العمل Working reagent بواقع 1 مل الى العينة والمحلول القياسي والكفئ وتم مزج المحاليل جيدا ووضعت في الحمام المائي بدرجة 37 مئوية ولمدة 5 دقائق ثم استخدم جهاز المطياف الضوئي لقراءة الامتصاصية بطول موجي قدره 505 نانوميتر .

الحسابات :

تم حساب تركيز الدهون الثلاثية TAG وفق المعادلة الاتية :

Triglyceride concentration = sample × n standard

اذ ان :

N = 200 ويعتبر تركيز المحلول القياسي

Sample = الامتصاصية الضوئية لعينة المصل

Standard = الامتصاصية الضوئية للمحلول القياسي

8-6-3 تقدير تركيز البيليروبين الكلي (T-Bil) في مصل الدم :

تم استخدام طريقة Burtis *et al* (1994) في تقدير تركيز البليروبين الكلي .

مبدأ العمل :

يحدد مقياس الطيف الضوئي للبيليروبين ، من خلال اقتران البيليروبين مع حامض Sulfanilic diazotized بوجود مادة الكافيين للحصول على صبغة الازو (azo) ويستخدم جهاز المطياف الضوئي لقياس شدة اللون .

الكواشف Reagent :

الكاشف 1 (sulfanilic acid solution)	
sulfanilic acid	29 mmol/L
HCI	0.17 N
الكاشف2 (sodium nitrite solution)	
sodium nitrite	25 mmol /L
الكاشف3 (caffeine solution)	
Caffeine	0.26 mol /L
Sodium benzoate	0.52 mol/ L
الكاشف4 (tartrate solution)	
Tartrate	0.93 mol /L
NaOH	1.9 N

طريقة العمل Procedure :

كما مبين في الجدول التالي :

الكواشف	Sample blank	Sample
الكاشف 1	200 µl	200 µl
الكاشف 2	---	50 µl
الكاشف 3	1000 µl	1000 µl
العينة	200 µl	200 µl
تمزج سوية لمدة 10-60 دقيقة عند درجة حرارة 25 C بعدها يضاف الكاشف الرابع		
الكاشف 4	1000 µl	1000 µl
تمزج لمدة 5-30 دقيقة عند درجة حرارة 20-25 C تقرأ امتصاصية العينة عند الطول الموجي 578 نانوميتر		

9-6-3 تقدير تركيز الالبومين Albumin في مصل الدم

المبدا الأساس :

تم استخدام طريقة برومو كريسول الأخضر Bromocresol Green BCG التي استخدم فيها عدة التحاليل الجاهزة من شركة (Biolabo) الفرنسية لتقدير مستوى الالبومين وتعتمد هذه الطريقة على كمية الالبومين الذي يرتبط مع الكاشف (3 , 3 ,5 ,5 , - رباعي برومو – ميتا كريسول كبريتات الفيثالين) المسمى برومو كريسول الأخضر الذي يكون معقد البومين – بروموكريسول الأخضر Albumin – BCG Complex ذو اللون الأخضر وتقاس شدته عند طول موجي (630) نانوميتر في المطياف الضوئي (Hallbach *et al*.,1991; Tiez, 2006)

المحاليل المستخدمة :

1-محلول بروموكريسول الأخضر BCG Solution

يتكون هذا المحلول من 3 ملي مول /لتر من حامض السكسنيك مع 167 مايكرومول /لتر من (BCG) و 50 ملي مول /لتر من هيدروكسيد الصوديوم و تركيز 1 غم/لتر من Polyoxyyethylene monolauryl ether بدالة حامضية تبلغ 4.2 .

2- المحلول القياسي بتركيز 5 غم/ديسيلتر

طريقة العمل :

1-تم وضع 2.5 مل من محلول BCG في انبوبة اختبار واضيف 5 مايكروليتر من مصل الدم اليها ومزج جيدا .

2- تم وضع 2.5 مل محلول BCG في انبوبة اختبار واضيف 5 مايكروليتر من المحلول القياسي ومزج جيدا .

3- تم وضع 2.5 مليليتر من محلول BCG في انبوبة اختبار واضيف 5 مايكروليتر من الماء المقطر ومزج جيدا .

بعد ان مزجت الانابيب الثلاث تم قراءة الامصاصية بعد دقيقة بطول موجي 630 نانوميتر مقابل محلول الكفء .

الحسابات :

تم حساب مستوى الالبومين في مصل الدم بوحدة (g/ dl) كما في القانون الاتي :

$$\frac{\text{شدة امتصاصية محلول الاختبار}}{\text{شدة امتصاصية المحلول القياسي}} \times \text{تركيز المحلول القياسي}$$

10-6-3 تقدير تركيز اليوريا Urea في المصل

تم استخدام طريقة Patton & Crouh (1977) في قياس مستوى اليوريا في المصل

المبدا الأساس :

تم الاعتماد على التحلل المائي لليوريا في وجود انزيم اليوريز (Urease) وفق المعادلة الاتية :

$$Urea + H_2O \xrightarrow{\textbf{Urease}} 2NH_3 + CO_2$$

اذ يحدث تفاعل بين السيليكات (Salicylate) وايون الامونيوم مع الهايبوكلورايت (Hypochlorite) مما يؤدي الى تكوين معقد اخضر اللون من 2-2 ثنائي كاربوكسيل اندوفينول (2.2 dicarboxylindophenol) كما في الجدول التالي .

الكواشف	المواد	التركيز
Reagent (1) a	Urea	5000 µ/L
Reagent (1) b	Phosphate buffer Sodium salicylate Sodium nitroprusside EDTA	120 mmol/L , PH 7 63.4 mmol/L 500 mmol/L 1.5 mmol/L
Reagent (2)	Sodium Hypochlorite Sodium Hydroxide	18 mmol/L 750 mmol /L
CAL.	Standard	

طريقة العمل :

محلول العمل Working Reagent

حضر بمزج (R1a) مع (R1b) .

Reagent	Blank	Standard	Test
Standard		10 µ L	
Serum			10 µ L
Working reagent (1)	1 ml	1 ml	1 ml

مزجت الانابيب وحضنت في حمام مائي لمدة 3 دقائق وبدرجة حرارة 37 سيليزية . بعدها اضيف الكاشف 2

Reagent (2)	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml

ثم مزجت وحضنت الانابيب في حمام مائي لمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة 37 سيليزية بعدها قرات الامتصاصية بطول موجي 600 نانوميتر .

الحسابات :

$$\text{تركيز اليوريا (mg / dl)} = \frac{\text{امتصاصية النموذج}}{\text{امتصاصية القياسي}} \times \mathbf{n}$$

n = تركيز القياسي

11-6-3 تقدير تركيز حمض اليوريك Uric acid في المصل

تم استخدام طريقة القياس الانزيمية اللونية في تحديد مستوى حمض اليوريك في المصل

المبدأ principle :

يقوم انزيم اليوريكاز Uricase باكسدة حمض اليوريك Uric acid الى الانتوين allantoin وبيروكسيد الهيدروجين والذي بدوره يتفاعل بشكل إضافي مع مركب فينولي و 4 امينو انتيبيرين 4 amino antipyrine من خلال العمل التحفيزي للبيروكسيديز Peroxidase وذلك لتشكيل مركب صبغة كينونيمين Quinoneimine احمر اللون وكثافة اللون المتكون متناسبة طرديا مع كمية حمض اليوريك الموجودة في العينة .

$$\text{Uric acid} + H_2O \xrightarrow{\text{Uricase}} \text{Allantoin} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4\ \text{Aminoantipyrine} + \text{phenolic compound} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Red Quinoneimine dye} + H_2O$$

تحضير الكاشف Reagent Preparation

كاشف العمل Working Reagent :

تم صب محتويات انبوبة واحدة من L2 (الكاشف الانزيمي) في انبوبة اختبار واحدة من الكاشف المنظم L1 ويستقر كاشف العمل هذا عند تخزينه في درجة حرارة (8-2) مئوية وذلك لمدة (4) أسابيع على الأقل . كما يمكن ان تحضر كمية اكبر من كاشف العمل من خلال خلط جزء واحد من كاشف الانزيم مع 4 أجزاء من الكاشف المنظم او خلط 0.2 مل من الكاشف الانزيمي مع 0.8 مل من الكاشف المنظم بدلا من 1 مل من كاشف العمل مباشرة اثناء الفحص . بعدها يترك حمض اليوريك uric acid ليستقر في العينة لمدة 5-3 أيام عند حفظه في درجة حرارة 8-2 مئوية .

طريقة العمل procedure :

تم استخدام ثلاث انابيب اختبار جافة ونظيفة هي الكفئ (Blank) والمحلول القياسي (Standard) ومحلول الاختبار (Test)

المحاليل	Blank (ml)	Standard (ml)	Test (ml)
Working Reagent	1.0	1.0	1.0
Distilled Water	0.02	-	-
Uric acid standard (S)	-	0.02	-
Sample	-	-	0.02

تم خلطها جيدا وحضنت في درجة حرارة 37 مئوية وذلك لمدة (5) دقائق او في درجة حرارة الغرفة (25) مئوية لمدة (15) دقيقة . تم قراءة الامتصاصية للمحلول القياسي وعينة الاختبار وذلك على الطول الموجي 520 نانوميتر .

الحسابات :

حمض اليوريك في mg/dl = $8 \times \frac{Abs.T}{Abs.S}$

3-6-12 قياس عامل التنخر الورمي (tumor necrosis factor (TNF-α ، الانترلوكين 6 (interlukinn 6 (IL-6 و انزيم Cytochrome P450

تم قياسها باستخدام عدة التحاليل (Kits) الخاصة بكل منها بالاعتماد على الطريقة المناعية المعروفة (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA باستخدام جهاز ELISA Reader من نوع Axiom Minireader الألماني المنشأ وتم اجراء الخطوات لقياس تركيز كل منها اعتمادا على الخطوات المرفقة لكل طقم وكما يأتي :

3-6-12-1 قياس عامل التنخر الورمي TNF-α

طريقة العمل :

1-ربط المستضد Bind antigen

تم إضافة 50 مايكرولتر من Icubation Buffer الى حفر عينات بعدها تم إضافة 100 مليلتر من المعايير الى الحفر ثم تم الضغط على جانب اللوحة للمزج وتم تغطيتها بغطاء اللوحة وحضنت لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة ثم سحب المحلول جيدا وغسلت الحفر 4 مرات باستخدام wash buffer .

2- إضافة البيوتين المترافق Biotin Conjugate

اضيف 100 مايكروليتر TNF-α محلول البيوتين المترافق الى كل حفرة ثم تم تغطية اللوحة بغطاء خاص بها وحضنت لمدة ساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة وسحب المحلول جيدا و غسلت الحفر 4 مرات باستخدام Wash Buffer .

3- إضافة Streptavidin-HRP

اضيف 100 مايكروليتر من محلول Streptavidin-HRP في كل حفرة وغطيت اللوحة بالغطاء الخاص بها وحضنت لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم سحب المحلول جيدا وغسلت الحفر 4 مرات باستخدام wash buffer .

4- إضافة الكروموجين المستقر Stabilized Chromogen

تم إضافة 100 ميكرولتر من الكروموجين المستقر الى كل حفرة حتى بدأ محلول المادة الأساس Substrate بالتحول الى اللون الأزرق ثم تم التحضين لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة في الظلام .

5- إضافة محلول التوقف Stop Solution

تم إضافة 100 ميكروليتر من محلول التوقف لكل حفرة ثم تم الضغط على جانب اللوحة للمزج ، يتغير المحلول في الحفر من الأزرق الى الأصفر .

الحسابات :

تم قراءة اللوحة بعد ساعتين من إضافة محلول التوقف ، قرأت الامتصاصية عند 450 نانومتر

2-12-6-3 قياس الانترلوكين IL-6

طريقة العمل :

1- كاشف الاجسام المضادة Biotinylated وحضانة العينة

تم إضافة 50 مايكرولتر من كاشف الاجسام المضادة Biotinylated الى كل حفرة . بعدها تم إضافة 50 مايكرولتر من Standard و عينات الاختبار test sample ثم خلطت جيدا عن طريق النقر بلطف على اللوحة عدة مرات . ثم اضيف 50 ميكرولتر من المخفف القياسي Standard Diluent الى جميع الحفر التي لاتحتوي على معايير او عينات ثم غطيت اللوحة جيدا بغطاء اللوح اللاصق وتم التحضين في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين 25-20 مئوية . تم إزالة غطاء اللوح اللاصق بعناية وغسلت اللوحة ثلاث مرات باستخدام ال wash buffer .

2 – غسل الالواح Plate washing

تم الضغط برفق على جوانب اللوحة قبل الغسل واضيف محلول الغسل wash buffer للحفر ثم افرغت محتويات اللوحة وكرر الاجراء 2-3 مرة .

3 - تحضير محلول Streptavidin-HRP واحتضانه

تم إضافة 100 ميكرولتر من محلول Streptavidin-HRP المحضر الى كل حفرة ثم أغلقت اللوحة بغطاء لاصق جديد باحكام وتم التحضين في درجة حرارة الغرفة 25-20 مئوية لمدة 30 دقيقة . ثم تم التخلص من غطاء اللوحة اللاصقة بعناية وازيلت مكوناتها وغسلت ثلاث مرات .

4 – احتضان المادة الأساس وخطوة التوقف Substrate Incubation and Stop Step

تم سحب 100 ميكرولتر من المادة الأساس TMB في كل حفرة ثم ترك تفاعل اللون يتطور في الظلام وبدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة . ينتج عن تفاعل المادة الأساس لون ازرق يتحول الى اللون الأصفر عند إضافة محلول التوقف Stop Solution .

بعدها تم إضافة 100 ميكرولتر من محلول الإيقاف Stop Solution وذلك بعد مرور 30 دقيقة لغرض إيقاف التفاعل لكل حفرة .

5 – قياس الامتصاصية Absorbancr Measurement

تم قياس الامتصاصية من خلال قارئ لوحة ELISA مضبوط على 450 نانومتر

3-12-6-3 قياس انزيم Cytochrome P450

الكواشف المستخدمة :

1-الجسم المضاد للبيوتين Biotin- antibody

HRP- avidin – 2

wash buffer -3

4 – القياسي Standard

طريقة العمل :

1- اضيف 100 ميكرولتر من المعيار والعينة لكل حفرة وتم تغطيته بشريط لاصق وحضن لمدة ساعتين بدرجة حرارة 37 مئوية .

2- تم ازالة السائل من كل حفرة مع تجنب الغسل . ثم اضيف 100 مايكرولتر من الاجسام المضادة للبيوتين لكل حفرة وأغلقت بشريط لاصق جديد وحضنت لمدة ساعة واحدة في درجة حرارة 37 مئوية .

3- تركت الحفر بدرجة حرارة الغرفة وخلط برفق حتى اصبح المحلول متجانسا .

4- تم غسل الحفر جيدا باستخدام محلول الغسل wash buffer وكررت العملية مرتين حتى اصبح المجموع ثلاث غسلات .

5- تم تغطية الحفر بشريط لاصق وتم التحضين لمدة ساعة واحدة بدرجة 37 مئوية .

6- تم غسل الحفر خمس مرات كما في الخطوات السابقة ثم اضيف 90 مايكرولتر من المادة الأساس TMB لكل حفرة وحضن لمدة 30-15 دقيقة عند 37 مئوية مع الحماية من الضوء .

7- اضيف 50 مايكرولتر من محلول التوقف لكل حفرة مع الضغط برفق على اللوحة لضمان الخلط الشامل وتم قياس الامتصاصية عند الطول الموجي على 450 نانومتر

3-7 الكشف الجزيئي

3-7-1 فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)

Quantitative Reverse Transcription Real – Time PCR (qRT –PCR

1- أستخلاص الحامض النووي الـ RNA extraction RNA

تم استخلاص الحامض النووي الـ RNA من دم الارانب المستخدمة في الدراسة ولجميع المجاميع المعاملة ومجموعة السيطرة وذلك باستخدام عدة الاستخلاص GENEZOL ™ TriRNA Pure Kit (Taiwan,Geneaid)، وتم العمل بهذه العدة حسب تعليمات الشركة المجهزة كما في الخطوات التالية :

1- تم سحب 200ul من الدم ووضعت في أنابيب ابندروف بحجم 1.5ml

2- أضيف لكل انبوبة 700 µl من مادة Genezol ™ Reagent

3- رجت العينات بواسطة الرجاج لمدة ثواني

4- تركت العينات بعد مزجها لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة

5- نبذت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 14000-16000 دورة/ دقيقة لغرض فصل الراسب عن الرائق

6- تم أهمال الراسب ووضع الرائق في انابيب انبدروف واضيف اليها الايثانول Ethanol بتركيز 80%

7- نبذت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000-16000 دورة/دقيقة

8- نقل المزيج الى انبوبة أعمدة الربط الموضوعة في انبوبة الجمع

9- نبذت انبوبة أعمدة الربط في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000-16000 دورة/ دقيقة

10- اضيف 400 µl من محلول الغسل Pre-wash ووضعت الانانبيب في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000-16000 دورة/دقيقة

11- استبدلت انبوبة الجمع بانبوبة أخرى نظيفة ثم اضيف 600ul من محلول wash-buffer ونبذت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 14000-16000 دورة /دقيقة

12- اضيف 25-50 µl من RNAase Free-water الى الانابيب بعد استبدال أعمدة الربط بانبوبة ابندروف وتركت لمدة 3 ثواني للتاكد من امتصاص RNAase Free-water

13- نبذت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 14000-16000 دورة/دقيقة

14- حفظت الانابيب الحاوية على RNA في المجمدة بدرجة حرارة 20- م.

2- طريقة تصنيع cDNA

تم استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي cDNA المكمل للـ DNA من عينات الحمض النووي الـ RNA المستخلص لاستخدامه في تضخيم مورث التعبير الجيني *CD44* بفحص الـ RT – PCR باستخدام عدة AccuPower® RocketScript™ RT Master Mix, RNase H Minus المجهزة من لدن شركة Bioneer الكورية ، وتم اجراء هذه العملية حسب طريقة العمل المجهزة من قبل الشركة المصنعة في الجدول التالي :

RT Master Mix	Volume
Total RNA 100 ng\µL	18 µL
Oligo primer Primer 10 pmol	2µL

1- اضيفت 18 µl من RNA المستخلص الى انابيب ابندروف كت RocketScript™ RT Master Mix, RNase H Minus Eppendorf (bioneer) الحاوية على انزيم الاستنساخ العكسي Reverse
. transcription

2- تم اضافة 2µL من Oligo primer

3- وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج Vortex
centrifuge (Eixspin) بسرعة 3000 rpm في الدقيقة الواحدة لمدة 3 دقائق .

3- نقلت الانابيب الى جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR(Biobasic / Canda) ،وتم تطبيق الظروف الحرارية لعملية تصنيع الـ cDNA حسب طريقة عمل العدة ، ونقلت بعد ذلك العينات للحفظ بدرجة -20 مْ لحين استخدامها في فحص RT.

تم تحويل RNA الىCDNA كما مبين في الجدول التالي

الخطوة step	Temperature الحرارة	الوقتTime
cDNA synthesis (RT step)	42 c°	1 hour
Annealing	37 c°	5min
Heat inactivation	95 c°	5 min
Incubate	4c°	

3- اختيار البوادئ Primers

تم اختيار البوادئ Primers كما في الجدول التالي لغرض الكشف الجزيئي في جين *CD44*، وجهزت هذه البادئات من لدن شركة Bioneer الكورية .

Reference	Product size (bp)	Sequence of primers	Name of gene
Gehlot *et al.*,2016	157	rward 5′– CCACGTGGAGAAAAATGGTCF′–3 Reverse 5′–CACGTGCCCTTCTATGAACC′–3′	*CD44* gene

4- تخفيف البوادئ

تم الحصول على البوادئ جميعها من شركة Bioneer company/Korea كمسحوق Lyophilized product بتراكيز مختلفة ،حضر محلول الخزن ومحلول العمل بحسب تعليمات

شركة Bioneer حضر محلول الخزن بإضافة الماء المزال الايون للحصول على التركيز النهائي للعالق 100Picomols اما محلول العمل فقط حضر بواسطة سحب 10 ul من محلول الخزن µl /10 Picomols وتخفيفه µl 90 من الماء المزال الايون للحصول على التركيز النهائي لمحلول العمل والذي µl /100 Picomols وحفظ البوادئ بدرجة حرارة 20- مئوية

5- فحص Quantitative Real – Time PCR (qRT –PCR)

تم اجراء فحص الـ qRT - PCR لعينات الـ cDNA لمجاميع التجربة المعاملة ومجموعة السيطرة وذلك باستخدام عدة Accupower 2x Green Star qPCR Kit المجهزة من لدن شركة بايونير الكورية ،لأجراء هذا الفحص والحاوي على صبغة السايبر الخضراء التي تتفاعل مع جين *CD44* المتضخم في جهاز الـ Real - Time PCR ، حيث تم تحضير مزيج تفاعل qRT - PCR لجين *CD44* كما موضح في الجدول التالي :

qPCR master mix	volume
cDNA tamplet	5µl
*CD44*gene Forward primer (pmol10)	1µL
*CD44*gene Reverse primer (pmol10)	1µL
DEPC water	13 µL

أُضيفت المكونات التي ذكرت في الجداول اعلاه إلى انابيب qRT –PCR الخاصة ، ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج Vortex centrifuge (Eixspin) بسرعة rpm3000 في الدقيقة الواحدة لمدة ثلاث دقائق ، وبعدها نقلت الصفيحة إلى جهاز Miniopticon Real – Time PCR, BioRad USA) وتم تطبيق الظروف الحرارية condition qPCR Thermo Cycler لجين الدراسة (*CD44*)حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول التالي :

cycle	Time	Temperature	qRT – PCR step
1	5 min	95 c°	Initial Denaturation
40	20 sec	95 c°	Denaturation
	20 sec	55 c°	Annealing\Extension Detection scan
1	1 sec	55– 94 c°	Melating
	1min	25 c°	Hold

8-3 التحضيرات النسيجية Histological preprations

حفظت العينات (الكبد ، الكلية و الطحال) في البداية بعد استئصالها من الحيوان في محلول الفورمالين بتركيز 10 % ثم استخرجت من المحلول بعد 48 ساعة وتم غسلها عدة مرات بالكحول الاثيلي بتركيز 70 % ثم بعد ذلك أجريت عليها سلسلة من العمليات اعتمادا على ماذكر في طريقة (Presnell & Schreibman , 1997) .

1-8-3 الانكاز والترويق Dehydration and Clearing

سحب الماء من النسيج من خلال تمرير النماذج في سلسلة تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (70 % ، 80 % ، 90 % ، 95 % ، 100 %) وذلك لمدة ساعتين في كل تركيز ثم بعد ذلك روقت النماذج بوضعها لمدة 5 دقائق في الزايلين .

2-8-3 التشريب infiltration

بعد نهاية عملية الترويق تم نقل النماذج الى قناني حاوية على خليط من شمع البرافين paraffin wax بدرجة انصهار (57-60) م المنصهر والمرشح والزايلين بنسبة 1:1 وذلك لمدة نصف ساعة داخل الفرن الكهربائي ذو درجة حرارة 60° م وذلك لاجل إبقاء الشمع منصهرا ولضمان حدوث عملية التشريب الكامل للنماذج بالشمع وتم نقلها الى قناني أخرى تحتوي على شمع البرافين أيضا داخل الفرن لمدة ساعة واحدة بعدها تم النقل مرة أخرى الى قناني أخرى حاوية على شمع البرافين وذلك لمدة ساعة واحدة أيضا .

3-8-3 الطمر Embedding

عملت قوالب من الشمع حاوية على نماذج العينات وذلك من خلال صب الشمع في قوالب بلاستيكية خاصة تم طمر النماذج فيها وتركت في درجة حرارة المختبر لتتصلب ثم تم فصلها عن القالب وحفظت بعد ذلك حتى وقت تقطيعها .

4-8-3 التقطيع Sectioning

استخدم جهاز المشراح اليدوي Rotary Microtome لغرض تقطيع النماذج وذلك بسمك تراوح بين 5 مايكروميتر ، تم حمل اشرطة المقاطع على شرائح زجاجية Slides نظيفة وممسوحة باح ماير بعد ان تم وضعها في حمام مائي بدرجة حرارة 45-50 مئوية وذلك لمدة دقيقة – دقيقتين لضمان فرش المقاطع وبعدها تركت على صفيحة ساخنة Hot Plate وذلك لغرض تجفيفها بدرجة حرارة 37° م .

5-8-3 التصبيغ والتحميل Staining and Mounting

تم تصبيغ جميع المقاطع النسيجية بصبغة هيماتوكسيلين – ايوسين حيث وضعت الشرائح في الزايلين لمدة 5 دقائق لغرض التخلص من الشمع ثم تم تمريرها في سلسلة تنازلية من الكحول الاثيلي (100 % ، 100 % ، 90 % ، 80 %، 70 % ، 50 %) وذلك لمدة دقيقتين في كل تركيز وبعدها تم تصبيغها بصبغة الهيماتوكسيلين لمدة اربع دقائق و باستخدام الماء الجاري غسلت لمدة دقيقتين ثم تم تغطيسها بالكحول الحامضي لمرتين او ثلاث مرات للتخلص من الصبغة الزائدة ووضعت بصبغة الايوسين لمدة سبع دقائق وبعدها تم نقلها الى سلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي

(50 % ، 70 % ، 80 % ، 90 % ، 95 % ، 100 % ، 100 %) وذلك لمدة دقيقتين لكل تركيز منها باستثناء التركيز الأخير تم وضعها فيه لمدة 5 دقائق قبل ترويقها بالزايلين وذلك على مرحلتين كل مرحلة لمدة 10 دقائق ثم طبقت عليها عملية التحميل باستخدام بلسم كندا Canada Balsam وذلك لتثبيت غطاء الشريحة ثم وضعت على صفيحة ساخنة لغرض تجفيفها لمدة 8 ساعات حتى تصبح جاهزة للفحص المجهري .

6-8-3 التصوير المجهري Microphotography

تم تصوير المقاطع النسيجية باستخدام كاميرا رقمية Digital Camera نوع PMPHD 60f عالية الدقة .

9-3 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

حللت جميع النتائج للمعايير الفسلجية من خلال الاستعانة بالبرنامج الجاهز Spss وقورنت النتائج باستخدام قيمة اقل فرق معنوي Least Significant difference (LSD) على مستوى احتمالية 0.01 حيث قدر معامل الارتباط البسيط بين بعض المعايير الكيموحيوية والجرع التصاعدية لمستخلص نبات الاندروجرافس وإيجاد معادلة الخط المستقيم للمعايير الكيموحيوية على هذه الجرع التصاعدية وذلك بيان تاثير الجرعة المؤثرة ED_{50} على هذه المعايير ، معادلة الخط المستقيم هي :

$$Y= a+ bx$$

Y = المتغير التابع (المعايير الكيموحيوية)

a = نقطة تقاطع خط الانحدار مع المحور الصادي

b = معامل انحدار المتغير التابع على المتغير المستقل

x = قيمة المتغير المستقل (جرعة المستخلص المائي للاندروجرافس)

تم استخدام تحليل التباين Anova table وفق التصميم العشوائي الكامل Complet randomized design (CRD) لتحليل بيانات التجربة الثانية و استخدم أيضا اختبار اقل فرق معنوي Least Significant difference (L.S.D) لاظهار معنوية النتائج . (Spss , 1999) .

الاستنتاجات

استنتج من الدراسة الحالية:

1- بعد تحضير المستخلص المائي لنبات الاندروجرافس وجد ان الجرعة المؤثرة للمستخلص بلغت 100 ملغم / كغم في ذكور الارانب.

2- ان التجريع الفموي ب 1 ملغم / كغم من البوتيل هيدروكسي تولوين ادت الى :

a- حدوث خلل في وظائف الكبد من خلال الارتفاع المعنوي في معدل تركيز AST وALP و ALT و T-BILو TC و LDL و انخفاض معنوي في معدل تركيز HDL وعدم وجود فروق معنوية في معدل تركيز TAG و VLDL .

b- حدوث خلل في وظائف الكلى من خلال الارتفاع المعنوي Urea و Uric acid و انخفاض معنوي في معدل تركيز Albumin .

c- ارتفاع معنوي في تركيز IL-6 و TNF-α و انخفاض معنوي في معدل تركيز Cytochrome P450 .

d- حدوث الاجهاد التاكسدي وزيادة مستوى الجذور الحرة نتيجة للارتفاع المعنوي في معدل تركيز MDA وانخفاض معنوي في معدل تركيز GSH وSOD .

3- ان المعاملة ب ED_{50} للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس ادى الى حدوث ارتفاع معنوي في تركيز Albumin و HDL و GSH وانخفاض معنوي في تركيز TAG و LDL و VLDL و MDA و T-BIL و Urea وعدم وجود فرق معنوي في معدل تركيز AST وALP وALT و TC و Uric acid و SOD و TNF-α و IL-6 و Cytochrome P450 .

4- وجود ارتفاع في تعبير جين $CD44$ عند المقارنه مع مجموعة السيطرة ومجموعة المستخلص والمجموعة الوقائية ، في حين لم يظهر اي تأثير في تعبير هذا الجين عند مقارنة مجموعة السيطرة مع BHT والمستخلص وكذلك بين مجموعة المستخلص مع مجموعة السيطرة

5- ان المعاملة بالجرعة المؤثرة للمستخلص المائي لنبات الاندروجرافس قلل و بشكل كبير من التلف الحاصل في نسيج الكبد ، الكلى و الطحال و ساهم بشكل فعال في اعادة المعايير الكيموحيوية الى معدلاتها الطبيعية .

التوصيات

1- تقليل استخدام الاغذية التي تحتوي على المواد الحافظة والمضافات الغذائية.
2- التوصية باستخدام نبات الاندروجرافس كمادة وقائية للتقليل من احتمالية الاصابة بامراض الكبد ، الكلى والبنكرياس .
3- اجراء دراسة عن بيان الدور الوقائي لنبات الاندروجرافس على اعضاء اخرى في الجسم .
4- اجراء دراسة نسجية ووظيفية على تأثير BHT في الجهاز العصبي في الحيوانات المختبرية .
5- اجراء دراسة نسيجية باستخدام المجهر الاعتيادي والالكتروني لبيان تأثير BHT في الجهاز الوعائي القلبي في الحيوانات المختبرية .
6- اجراء دراسات فسيولوجية ونسجية لبيان تأثير انواع اخرى من المضافات الغذائية على العديد من اعضاء الجسم .
7- دراسة جينات أخرى مثل جين $BCL2$ و $P53$ باستخدام تقنيات جزيئية أخرى للكشف عن الطفرات ومدى تغير التعبير الجيني نتيجة التعرض للملوثات لبيئية او المواد المضافة للأغذية .
8- دراسة الدور العلاجي للمستخلص المائي والكحولي لنبات الاندروجرافس على الاعتلالات الكبدية والكلوية والعصبية .

المصـــــادر

Reference

Abdallah, A. A., Nasr El-Deen, N. A., Neamat-Allah, A. N., El-Aziz, A., & Heba, I. (2020). Evaluation of the hematoprotective and hepato-renal protective effects of Thymus vulgaris aqueous extract on thermally oxidized oil-induced hematotoxicity and hepato-renal toxicity. Comparative Clinical Pathology, 29(2), 451-461.

Abo-EL-Sooud, K., Hashem, M. M., Abd ElHakim, Y. M., Kamel, G. M., & Gab-Allaha, A. Q. (2018). Effect of butylated hydroxyl toluene on the immune response of Rift Valley fever vaccine in a murine model. International Immunopharmacology, 62, 165-169.

Abou-Hadeed, A. H., Mohamed, A. T., Hegab, D. Y., & Ghoneim, M. H. (2021). Ethoxyquin and Butylated Hydroxy Toluene Distrub the Hematological Parameters and Induce Structural and Functional Alterations in Liver of Rats. Archives of Razi Institute, 76(6), 1765-1776.

Adeoye, B. O., Oyagbemi, A. A., Asenuga, E. R., Omobowale, T. O., & Adedapo, A. A. (2019). The ethanol leaf extract of Andrographis paniculata blunts acute renal failure in cisplatin-induced injury in rats through inhibition of Kim-1 and upregulation of Nrf2 pathway. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology, 30(2), 205-217.

Adeoye, O., Olawumi, J., Opeyemi, A., & Christiania, O. (2018). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. JBRA assisted reproduction, 22(1), 61.

Afshari-Kaveh, M., Abbasalipourkabir, R., Nourian, A., & Ziamajidi, N. (2021). The protective effects of vitamins A and E on titanium dioxide nanoparticles (nTiO2)-induced oxidative stress in the spleen tissues of male Wistar rats. Biological Trace Element Research, 199(10), 3677-3687.

Aggarwal, N., Singh, A., Agarwal, A., Dwarakanathan, V., Verma, A. K., Amarchand, R., ... & Makharia, G. K. (2020). Prevalence of elevated alanine aminotransferase levels in adult participants from a

community-based study from northern part of India. Indian Journal of Gastroenterology, 39(6), 608-613.

Akbar, S. (2011). Andrographis paniculata: a review of pharmacological activities and clinical effects. Alternative Medicine Review, 16(1), 66-77.

Akbari, M., & Hassan-Zadeh, V. (2018). IL-6 signalling pathways and the development of type 2 diabetes. Inflammopharmacology, 26(3), 685-698.

Akilandeswari, G., Anand, A. V., Sampathkumar, P., Moorthi, P. V., & Preethi, B. (2019). A Prospective Review on Phyto-Pharmacological Aspects of Andrographis paniculata. Systematic Reviews in Pharmacy, 10(1), 15-19.

Akinmoladun, A. C., Olaniyan, O. O., Famusiwa, C. D., Josiah, S. S., & Olaleye, M. T. (2020). Ameliorative effect of quercetin, catechin, and taxifolin on rotenone-induced testicular and splenic weight gain and oxidative stress in rats. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 31(3).

Al Batran, R., Al-Bayaty, F., Al-Obaidi, M. M. J., Hussain, S. F., & Mulok, T. Z. (2014). Evaluation of the effect of andrographolide on atherosclerotic rabbits induced by Porphyromonas gingivalis. BioMed research international, 2014, 724718.

Alabdaly, Y. Z., Al-Hamdany, E. K., & Abed, E. R. (2021). Toxic effects of butylated hydroxytoluene in rats. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 35(1), 121-128.

Alayunt, Ö. N., Aksoy, L., Karafakioğlu, Y. S., & Sevimli, S. (2019). Assessment of anti-inflammatory and antioxidant properties of safranal on CCI 4-induced oxidative stress and inflammation in rats. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 91(2) : 1-11.

Albuquerque-Souza, E., & Sahingur, S. E. (2022). Periodontitis, chronic liver diseases, and the emerging oral gut liver axis. Periodontology 2000, 89(1), 125-141.

Alebic, I., & Richter, R. C. (2021). Evaluation of chewing gum and cereal products as a potential source of butylated hydroxytoluene (BHT) toxicity in Children. J Undergrad Chem Res, 20, 27-29.

Alelign, T., & Petros, B. (2018). Kidney stone disease: an update on current concepts. Advances in urology, 1(1): 1-12 .

Al-Harbi, H., Al-Hasawi, Z., Binnaser, Y., Al-Hasawi, R., Al-Solami, F., & Al-Ghamdi, A. (2020). Effect of Polyethylene and Butylated Hydroxytoluene on the histological structure and some enzymes of rat liver. Journal of Bioscience and Applied Research, 6(2), 68-82.

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

Altaş, S., Kızıl, G., Kızıl, M., Ketani, A., & Haris, P. I. (2011). Protective effect of Diyarbakır watermelon juice on carbon tetrachloride-induced toxicity in rats. Food and Chemical Toxicology, 49(9), 2433-2438.

Altuntaş G, Değer Y.(2017) .The effects of butylated hydroxyl toluene on the total antioxidant status/total oxidant stress and biochemical parameters in rats. World J Pharm Pharm Sci,6:199-210.

AL–Zamely, O. M. Y. (2001). Ischemic Heart Disease Via Oxidative Hypothesis . (Thesis), PH.D. ,Iraq ,University of AL-Mustansiriya.

Aminah, N. S., Tun, K. N. W., Kristanti, A. N., Aung, H. T., Takaya, Y., & Choudhary, M. I. (2021). Chemical constituents and their biological activities from Taunggyi (Shan state) medicinal plants. Heliyon, 7(2):1-14 .

Andriani, A., Novriany, V., Suseno, G., Effiana, E., & Fitrianingrum, I. (2018). Hepatoprotective effect of methanol extract of sambiloto leaves (Andrographis paniculata) against malondialdehyde levels in liver tissues of paracetamol-induced Wistar rat. Nusantara Bioscience, 10(2), 87-90.

Aprilia, V., Bhima, S. K. L., & Ismail, A. (2018). Pengaruh Pemberian Butylated Hydroxytoluene (2, 6-Di-Tert-Butyl-4-Methylphenol) Per Oral Dosis Bertingkat Terhadap Gambaran Histopatologis Ginjal. Diponegoro Medical Journal , 7(2), 1154-1165.

Ashour, M. L., Youssef, F. S., Gad, H. A., & Wink, M. (2017). Inhibition of cytochrome P450 (CYP3A4) activity by extracts from 57 plants used in traditional chinese medicine (TCM). Pharmacognosy magazine, 13(50), 300.

Azevedo, R., Gaiteiro, C., Peixoto, A., Relvas-Santos, M., Lima, L., Santos, L. L., & Ferreira, J. A. (2018). CD44 glycoprotein in cancer: a molecular conundrum hampering clinical applications. Clinical proteomics, 15(1), 1-5.

Babu, N. A., Masthan, K. M. K., Krupaa, R. J., & Hariharan, R. (2020). Alkaline phosphatase and its clinical importance-A review. European Journal of Molecular & Clinical Medicine, 7(5), 1409-1413.

Bardi, D. A., Halabi, M. F., Hassandarvish, P., Rouhollahi, E., Paydar, M., Moghadamtousi, S. Z., & Abdulla, M. A. (2014). Andrographis paniculata leaf extract prevents thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. PloS one, 9(10): 1-13.

Bekkelund, S. I. (2021). Serum alanine aminotransferase activity and risk factors for cardiovascular disease in a Caucasian population: the Tromsø study. BMC Cardiovascular Disorders, 21(1), 1-7.

Ben Amara, I., Ben Saad, H., Cherif, B., Ktari, N., Kharrat, N., Smichi, N., Boudawara, T., Ben Salah, R., and Miled, N.(2020). Evaluation of Biological Properties, Health Benefits and Protective Effects of Kefir against Cytotoxicity and Genotoxicity Induced by Butylated Hydroxytoluene (BHT) In Vivo. Res Rev Biosci,15(1):149.

Benny, N. R., Sonia, N. S., & Sreekala, G. S. (2021). Hepatoprotective Medicinal Plants Traditional Knowledge to Scientific Evidences: A Review. J. Pharmacogn. Phytochem, 10, 285-288.

Bergmeyer, H. U., & Bernt, E. (1974). Colorimetric assay of Reitman and Frankel. In Methods of enzymatic analysis (pp. 735-739). Academic press.

Bhattacharjee, Kanta & S., Sen & BK, Dey & DK, Deka & S, Bora. (2020). Anthelmintic activity of extracts of Azadirachta indica and

Andrographis paniculata and their pharmacological analysis. International Journal of Chemical Studies. 8. 1160-1163.

Bimpizas-Pinis, M., Santagata, R., Kaiser, S., Liu, Y., & Lyu, Y. (2022). Additives in the food supply chain: Environmental assessment and circular economy implications. Environmental and Sustainability Indicators, 14: 1-13 .

Bisht, R. (2018). Antioxidants: a brief review. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 8(6), 373-376.

Bolton, J. L., & Thompson, J. A. (1991). Oxidation of butylated hydroxytoluene to toxic metabolites. Factors influencing hydroxylation and quinone methide formation by hepatic and pulmonary microsomes. Drug metabolism and disposition, 19(2), 467-472.

Boshy, M., Abdelhamidb, F., Richab, E., Ashshia, A., Gaitha, M., & Qustya, N. (2017). Attenuation of CCl4 induced oxidative stress, immunosuppressive, hepatorenal damage by fucoidan in rats. J Clin Toxicol, 7(348), 2161-2495.

Bradham, C. A., Plümpe, J., Manns, M. P., Brenner, D. A., & Trautwein, C. (1998). I. TNF-induced liver injury. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 275(3), G387-G392.

Braidy, N., Zarka, M., Jugder, B. E., Welch, J., Jayasena, T., Chan, D. K., & Bridge, W. (2019). The precursor to glutathione (GSH), γ-Glutamylcysteine (GGC), can ameliorate oxidative damage and neuroinflammation induced by Aβ40 oligomers in human astrocytes. Frontiers in aging neuroscience, 11: 177.

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

Burtis C.A., Ashwood E.R., ed. (1994). Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1466-8.

Byeon, S. E., Yi, Y. S., Oh, J., Yoo, B. C., Hong, S., & Cho, J. Y. (2012). The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. Mediators of inflammation, 1:1-19.

Cai, R., Hao, Y., Liu, Y. Y., Huang, L., Yao, Y., & Zhou, M. S. (2020). Tumor necrosis factor alpha deficiency improves endothelial function and cardiovascular injury in deoxycorticosterone acetate/salt-hypertensive mice. BioMed Research International, 1:1-10 .

Casamonti, M., Risaliti, L., Vanti, G., Piazzini, V., Bergonzi, M. C., & Bilia, A. R. (2019). Andrographolide loaded in micro-and nano-formulations: Improved bioavailability, target-tissue distribution, and efficacy of the "king of bitters". Engineering, 5(1), 69-75.

Cenariu, D., Fischer-Fodor, E., Țigu, A. B., Bunea, A., Virág, P., Perde-Schrepler, M., ... & Maniu, A. (2021). Zeaxanthin-rich extract from superfood lycium barbarum selectively modulates the cellular adhesion and mapk signaling in melanoma versus normal skin cells in vitro. Molecules, 26(2), 333.

Cermak, R. (2008). Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 4(1), 17-35.

Chamanza, R., Naylor, S. W., Carreira, V., Amuzie, C., Ma, J. Y., Bradley, A. E., ... & Louden, C. (2019). Normal anatomy, histology, and spontaneous pathology of the kidney, and selected renal biomarker reference ranges in the cynomolgus monkey. Toxicologic pathology, 47(5), 612-633.

Chan, Y. T., Cheung, F., Zhang, C., Fu, B., Tan, H. Y., Norimoto, H., ... & Feng, Y. (2020). Ancient Chinese medicine herbal formula Huanglian Jiedu Decoction as a neoadjuvant treatment of chemotherapy by improving diarrhea and tumor response. Frontiers in Pharmacology, 11, 252.

Chandrakar, V., Dubey, A. and Keshavkant, S., (2016). Modulation of antioxidant enzymes by salicylic acid in arsenic exposed Glycine max L. Journal of soil science and plant nutrition, 16(3), :662-676.

Chandran, H., Anandhan, D. K., Gunasekaran, P., Babu, V., Natesan, V., Thilagar, G., & Arumugam, R. (2021). Pharmacological Effect of Andrographis paniculata in Ammonium Acetate Induced

Hyperammonemia: A Dose-dependent Study. Toxicology International, 28(1), 91-101.

Chao, W. W., & Lin, B. F. (2012). Hepatoprotective diterpenoids isolated from Andrographis paniculata.Chinese Medicine, 2012, 3, 136-143.

Chauhan, E. S., Sharma, K., & Bist, R. (2019). Andrographis paniculata: A review of its phytochemistry and pharmacological activities. Research Journal of Pharmacy and Technology, 12(2), 891-900.

Cheepsattayakorn,A., Cheepsattayakorn ,R., Kidhirunkul ,C.(2021). Andrographis paniculata, A Promising Medicinal Plant Fighting Against SARS-CoV-2 . MAR Pulmonology 2.6 . 1:1-6.

Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. Journal of hematology & oncology, 11(1), 1-23.

Chen, H. W., Huang, C. S., Li, C. C., Lin, A. H., Huang, Y. J., Wang, T. S., & Lii, C. K. (2014). Bioavailability of andrographolide and protection against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. Toxicology and applied pharmacology, 280(1), 1-9.

Chen, L., Fu, C., Zhang, Q., He, C., Zhang, F., & Wei, Q. (2020). The role of CD44 in pathological angiogenesis. The FASEB Journal, 34(10), 13125-13139.

Cheung, M. K., Yue, G. G. L., Gomes, A. J., Wong, E. C. W., Lee, J. K. M., Kwok, F. H. F., ... & Lau, C. B. S. (2022). Network pharmacology reveals potential functional components and underlying molecular mechanisms of Andrographis paniculata in esophageal cancer treatment. Phytotherapy Research, 36(4), 1748-1760.

Chiang, Y. F., Chen, H. Y., Ali, M., Shieh, T. M., Huang, Y. J., Wang, K. L., & Hsia, S. M. (2021). The role of cell proliferation and extracellular matrix accumulation induced by food additive butylated hydroxytoluene in uterine leiomyoma. Nutrients, 13(9), 3074.

Cho, J. Y., Jeong, J. Y., & Sohn, W. (2020). Risk of metabolic syndrome in participants within the normal range of alanine aminotransferase: A population-based nationwide study. PloS one, 15(4), 1-13.

Choi B, Kang KS, Kwak MK. (2014).Effect of redox modulating Nrf2 activators on chronic kidney disease. Molecules, 19: 12727-59.

Cicero, A. F., Fogacci, F., Cincione, R. I., Tocci, G., & Borghi, C. (2021). Clinical effects of xanthine oxidase inhibitors in hyperuricemic patients. Medical Principles and Practice, 30(2), 122-130.

Coco, D., & Leanza, S. (2019). Indications for surgery in non-traumatic spleen disease. Open access Macedonian journal of medical sciences, 7(17), 2958.

Coco-Bassey, S. B., Asemota, E. A., Okoroiwu, H. U., Etura, J. E., Efiong, E. E., Inyang, I. J., & Uko, E. K. (2019). Glutathione, glutathione peroxidase and some hematological parameters of HIV-seropositive subjects attending clinic in University of Calabar teaching hospital, Calabar, Nigeria. BMC Infectious Diseases, 19(1), 1-10.

Colell, A., García-Ruiz, C., Miranda, M., Ardite, E., Marí, M., Morales, A., ... & Fernández-Checa, J. C. (1998). Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. Gastroenterology, 115(6), 1541-1551.

Conning, D. M., & Phillips, J. C. (1986). Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 24(10-11), 1145–1148.

Dai, Y., Chen, S. R., Chai, L., Zhao, J., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Overview of pharmacological activities of Andrographis paniculata and its major compound andrographolide. Critical reviews in food science and nutrition, 59(1), 17-29.

Daniel, J. W., & Gage, J. C. (1965). The absorption and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) in the rat. Food and Cosmetics Toxicology, 3, 405-415.

Darbar S, Bose A, Bhaumik UK, Bikash Roy B, Chatterjee N and Pal TP. (2009). Antioxidant and hepatoprotective effect of andrographis paniculata leaf extract of diclofenac induced hepatotoxicity in rats. Pharmacologyonline, 2: 95-108

Delanghe, T., Huyghe, J., Lee, S., Priem, D., Van Coillie, S., Gilbert, B., & Bertrand, M. J. (2021). Antioxidant and food additive BHA prevents TNF cytotoxicity by acting as a direct RIPK1 inhibitor. Cell death & disease, 12(7), 1-13.

Denhardt, D. T., Giachelli, C. M., & Rittling, S. R. (2001). Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. Annual review of pharmacology and toxicology, 41, 723.

Derks, H. J. G. M., Groen, C., Olling, M., & Zeilmaker, M. J. (2021). Extrapolation of toxicity data in risk assessment. In Food Safety and Toxicity (pp. 241-254). CRC Press.

Dey, A., & Neogi, S. (2019). Oxygen scavengers for food packaging applications: A review. Trends in Food Science & Technology, 90, 26-34.

Dey, D., Chaskar, S., Bhatt, N., & Chitre, D. (2020). Hepatoprotective activity of BV-7310, a proprietary herbal formulation of Phyllanthus niruri, Tephrosia purpurea, boerhavia diffusa, and andrographis paniculata, in alcohol-induced HepG2 cells and alcohol plus a haloalkane, CCl4, induced liver damage in rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020. 1-9.

Ding, L., Li, J., Song, B., Xiao, X., Huang, W., Zhang, B., Tang, X., Qi, M., Yang, Q., Yang, Q., Yang, L., & Wang, Z. (2014). Andrographolide prevents high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice by suppressing the sterol regulatory element-binding protein pathway. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 351(2), 474–483.

Ding, W.X., Yin, X.M., (2004). Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha- induced apoptosis in liver injury. J. Cell Mol. Med. 8, 445–454.

Divisha, R., Ranganathan, V., Vijayakaran, K., Elamaran ,A., Senthil Kumar ,P.(2018). Quantifying phytophenols in Andrographis paniculata and Withania somnifera leaf extracts. The Journal of Phytopharmacology, 7(6): 477-479.

Dong, Y., Liu, Y., Kou, X., Jing, Y., Sun, K., Sheng, D., ... & Wei, L. (2016). The protective or damaging effect of tumor necrosis factor-α in acute liver injury is concentration-dependent. Cell & bioscience, 6(1), 1-10.

Dorschner, R. A., Lee, J., Cohen, O., Costantini, T., Baird, A., & Eliceiri, B. P. (2020). ECRG4 regulates neutrophil recruitment and CD44 expression during the inflammatory response to injury. Science advances, 6(11), 105-118.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews, 82(1), 47-95.

Dzudzilo, M., Kleina, R., Čēma, I., Dabuzinskiene, A., & Svirskis, Š. (2021). Expression and Localisation of CD44 Antigen as a Prognostic Factor of Oral Leukoplakia. In Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, 75(2), 68-74.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annual review of biochemistry, 68(1), 383-424.

EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2012). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. EFSA Journal, 10(3), 2588.

Egan, C. E., Daugherity, E. K., Rogers, A. B., Abi Abdallah, D. S., Denkers, E. Y., & Maurer, K. J. (2013). CCR2 and CD44 promote inflammatory cell recruitment during fatty liver formation in a lithogenic diet fed mouse model. PLoS One, 8(6): 1-17 .

El Rabey, H. A., Rezk, S. M., Sakran, M. I., Mohammed, G. M., Bahattab, O., Balgoon, M. J., ... & Bakry, N. (2021). Green coffee methanolic extract and silymarin protect against CCl4-induced hepatotoxicity in albino male rats. BMC complementary medicine and therapies, 21(1), 1-11.

Elfaki, I., Mir, R., Almutairi, F. M., & Duhier, F. (2018). Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis.

Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP, 19(8), 2057–2070.

EL-Hassanin, M.F.A. (2021). The antioxidant effect of Jumbolan ethanolic extract seeds against carbon tetra chloride induced kidney toxicity in experimental rats. Home Econ. J , 37.1: 103-122.

Engan, H., Patrician, A., Lodin-Sundström, A., Johansson, H., Melin, M., & Schagatay, E. (2020). Spleen contraction and Hb elevation after dietary nitrate intake. Journal of Applied Physiology, 129(6), 1324-1329.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Protides of the Biological Fluids, 553–556.

Erratico, C. A., Szeitz, A., & Bandiera, S. M. (2012). Oxidative metabolism of BDE-99 by human liver microsomes: predominant role of CYP2B6. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 129(2), 280–292.

Essien, N. E., Nyah, N. U., Bobson, P. M., & Tom, E. J. (2021). evaluation of the effect of administration of ethanol extract of Andrographis paniculata leave and Zingiber officinale rhizoids on serum lipid profile in normal wistar rats.World Journal of Pharmaceutical Research,10(7),155-166.

Esteves, F., Rueff, J., & Kranendonk, M. (2021). The central role of cytochrome P450 in xenobiotic metabolism—A brief review on a fascinating enzyme family. Journal of xenobiotics, 11(3), 94-114.

Faine, L. A., Rodrigues, H. G., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Diniz, Y. S., Fernandes, A. A. H., & Novelli, E. L. B. (2006). Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. Experimental and Toxicologic Pathology, 57(3), 221-226.

Fan, X., Zhu, M., Qiu, F., Li, W., Wang, M., Guo, Y., ... & Du, B. (2020). Curcumin may be a potential adjuvant treatment drug for colon cancer by targeting CD44. International Immunopharmacology, 88, 106991.

Fang, M., Yao, M., Yang, J., Zheng, W. J., Wang, L., & Yao, D. F. (2020). Abnormal CD44 activation of hepatocytes with nonalcoholic fatty accumulation in rat hepatocarcinogenesis. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 12(1), 66.

Farag, R. S., Mahmoud, E. A., Basuny, A. M., & Ali, R. F. (2006). Influence of crude olive leaf juice on rat liver and kidney functions. International journal of food science & technology, 41(7), 790-798.

Farhan, M. N., Al-Fartusie, F. S., Hamed, S. L., & Al-Fartusie, F. S. (2020). Evaluation of lipid profile and liver function in acute pancreatitis patients: a case control study. Annals of Tropical Medicine and Public Health, 23, 231-826.

Fassati, P. and Principe ,L. (1982). Measurement of Triglyceride. Clin. Chem. , 28:2077.

Felter, S. P., Zhang, X., & Thompson, C. (2021). Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply?. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 121: 1-8.

Feng, L., Ning, J., Tian, X., Wang, C., Yu, Z., Huo, X., & Ma, X. (2021). Fluorescent probes for the detection and imaging of Cytochrome P450. Coordination Chemistry Reviews, 437, 213740.

Firdous, J., Latif, N. A., Mona, R., Mansor, R., & Muhamad, N. (2020). Andrographis paniculata and its endophytes: a review on their pharmacological activities. Res J Pharm Technol, 13(4), 2029-2032.

Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., & Saso, L. (2011). Antioxidant therapy: current status and future prospects. Current medicinal chemistry, 18(25), 3871-3888.

Friedewald, W. T. ; Levy, R. I. and Fredrickson, D. S. (1972). Clin . Chem. , 18:199.

Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: antioxidant properties dedicated to nanotechnologies. Antioxidants, 7(5), 62.

Gehlot, P., Shukla, V., Gupta, S., & Makidon, P. E. (2016). Detection of ALDH1 activity in rabbit hepatic VX2 tumors and isolation of ALDH1 positive cancer stem cells. Journal of translational medicine, 14(1), 1-9.

Ghosh, C., Singh, V., Grandy, J., & Pawliszyn, J. (2020). Development and validation of a headspace needle-trap method for rapid quantitative estimation of butylated hydroxytoluene from cosmetics by hand-portable GC-MS. RSC Advances, 10(11), 6671-6677.

Goutzourelas, N., Orfanou, M., Charizanis, I., Leon, G., Spandidos, D. A., & Kouretas, D. (2018). GSH levels affect weight loss in individuals with metabolic syndrome and obesity following dietary therapy. Experimental and Therapeutic Medicine, 16(2), 635-642.

Gracia-Sancho, J., Marrone, G., & Fernández-Iglesias, A. (2019). Hepatic microcirculation and mechanisms of portal hypertension. Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 16(4), 221-234.

Gupta, S., Mishra, K. P., & Ganju, L. (2017). Broad-spectrum antiviral properties of andrographolide. Archives of virology, 162(3), 611-623.

Hahn, K., Kanbay, M., Lanaspa, M. A., Johnson, R. J., & Ejaz, A. A. (2017). Serum uric acid and acute kidney injury: a mini review. Journal of advanced research, 8(5), 529-536.

Hallbach,J.;Hoffman,G.E.,and Guder,W.G.(1991) .Over estimation of albumin heparinized plasma.Clin.Chem.22(5):616-622.

Ham, J., Lim, W., Whang, K. Y., & Song, G. (2020). Butylated hydroxytoluene induces dysregulation of calcium homeostasis and endoplasmic reticulum stress resulting in mouse Leydig cell death. Environmental Pollution, 256, 113421.

Hao, M., & Liu, R. (2019). Molecular mechanism of CAT and SOD activity change under MPA-CdTe quantum dots induced oxidative stress in the mouse primary hepatocytes. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 220, 117104.

Hartwig, A., Arand, M., & MAK Commission. (2020). Butylated hydroxytoluene (BHT)–Determination of 3, 5 di-tert-butyl-4-

hydroxybenzoic acid (BHT acid) in urine by LC-MS/MS. Biomonitoring Method–Translation of the German version from 2020. The MAK Collection for Occupational Health and Safety, 5(1) :1-22.

Hasan, K. M. M., Tamanna, N., & Haque, M. A. (2018). Biochemical and histopathological profiling of Wistar rat treated with Brassica napus as a supplementary feed. Food science and human wellness, 7(1), 77-82.

Hegab, D., Mohammed, A., Metwally, M., Ghoneim, M., & Abou-Hadeed, A. (2021). Ethoxyquin and Butylated Hydroxyl Toluene Induced Hepatotoxic Effect Via Apoptosis, Oxidative Stress in Rats: Tissue Injury-Related CYP1A1 Gene Expression. Zagazig Veterinary Journal, 49(4), 456-470.

Hermida, M. D. E. R., De Melo, C. V. B., Lima, I. D. S., Oliveira, G. G. D. S., & Dos-Santos, W. L. (2018). Histological disorganization of spleen compartments and severe visceral leishmaniasis. Frontiers in cellular and infection microbiology, 8, 394.

Hernandez, M. E., Martinez-Mota, L., Salinas, C., Marquez-Velasco, R., Hernandez-Chan, N. G., Morales-Montor, J., ... & Pavón, L. (2013). Chronic stress induces structural alterations in splenic lymphoid tissue that are associated with changes in corticosterone levels in Wistar-Kyoto rats. BioMed research international, 1:1-7 .

Hernandezi , M; Lopez, R; Abanas, R.M.;V and Arias, A.(1994) .Antimicrobial activity of visnea mocanera leaf extracts .j. Ethno pharma cology ,41 ;115-119.

Hidayat, R., & Wulandari, P. (2021). Effects of Andrographis paniculata (Burm. F.) Extract on Diabetic Nephropathy in Rats. Reports of Biochemistry & Molecular Biology, 10(3), 445.

Higgins, C. L., Filip, S. V., Afsar, A., & Hayes, W. (2019). Evaluation of thermal and oxidative stability of three generations of phenolic based novel dendritic fuel and lubricant additives. Reactive and Functional Polymers, 142, 119-127.

Hirose, M., Shibata, M., Hagiwara, A., Imaida, K., & Ito, N. (1981). Chronic toxicity of butylated hydroxytoluene in Wistar rats. Food and Cosmetics Toxicology, 19, 147-151.

Hollingsworth, J. W., Li, Z., Brass, D. M., Garantziotis, S., Timberlake, S. H., Kim, A., ... & Schwartz, D. A. (2007). CD44 regulates macrophage recruitment to the lung in lipopolysaccharide-induced airway disease. American journal of respiratory cell and molecular biology, 37(2), 248-253.

Hon, W. M., Lee, K. H., & Khoo, H. E. (2002). Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby?. Annals of the New York Academy of sciences, 962(1), 275-295.

Hossain, M. D., Urbi, Z., Sule, A., & Rahman, K. M. (2014). Andrographis paniculata (Burm. f.) Wall. ex Nees: a review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. The Scientific World Journal, 1:1-29 .

Hossain, S., Urbi, Z., Karuniawati, H., Mohiuddin, R. B., Moh Qrimida, A., Allzrag, A. M. M., ... & Capasso, R. (2021). Andrographis paniculata (burm. F.) wall. Ex nees: an updated review of phytochemistry, antimicrobial pharmacology, and clinical safety and efficacy. Life, 11(4), 348.

Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-κB activation. Cell, 81(4), 495-504.

Huang, R., Zhang, X., Gracia Sancho, J., & Xie, W. F. (2022). Liver regeneration: cellular origin and molecular mechanisms. Liver Int, 00 : 1- 10 .

Husoy, T., Andreassen, M., Lillegaard, I. T. L., Mathisen, G. H., Rohloff, J., Starrfelt, J., ... & Bruzell, E. M. (2019). Risk assessment of butylated hydroxytoluene (BHT). Norwegian Scientific Committee for Food and Environment., 1: 1-128.

Ibrahim, H. (2020). Morphological variations and measurements of the caudate lobe of the human liver: a cadaveric study. The Medical Journal of Cairo University, 88(March), 155-160.

Irawan, C., Sukiman, M., Putri, I. D., Utami, A., Zalni, M. I. K., & Putri, R. K. (2022). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Andrographis paniculata Nees Leaves, Phytochemical Screening, Total Phenolic Content and Anti-Gout Potential Activity. Pharmacognosy Journal, 14(2): 432-438.

Jaiyesimi, K. F., Agunbiade, O. S., Ajiboye, B. O., & Afolabi, O. B. (2020). Polyphenolic-rich extracts of Andrographis paniculata mitigate hyperglycemia via attenuating β-cell dysfunction, pro-inflammatory cytokines and oxidative stress in alloxan-induced diabetic Wistar albino rat. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, 19(2), 1543-1556.

Jakubczyk, M., & Michalkiewicz, S. (2018). Electrochemical behavior of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in acetic acid solutions and their voltammetric determination in pharmaceutical preparations. Int. J. Electrochem. Sci, 13, 4251-4266.

Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., ... & Yang, S. H. (2021). The role of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in autoimmune disease and current TNF-α inhibitors in therapeutics. International journal of molecular sciences, 22(5), 2719.

Jiang, P., Xia, L., Jin, Z., Ali, S., Wang, M., Li, X., ... & Zhao, Z. (2020). New function of the CD44 gene: Lipid metabolism regulation in bovine mammary epithelial cells. Journal of dairy science, 103(7), 6661-6671.

Jiayong, Z., Shengchen, W., Xiaofang, H., Gang, S., & Shiwen, X. (2020). The antagonistic effect of selenium on lead-induced necroptosis via MAPK/NF-κB pathway and HSPs activation in the chicken spleen. Ecotoxicology and Environmental Safety, 204, 111049.

Jong, F. H. H., Gunawan, A., Santoso, M. W. A., Anjani, S., Tirthaningsih, N. W., & Basori, A. (2018). Effects of Sambiloto Ethanol Extract on Fatty Liver, SGOT/SGPT Levels and Lipid Profile of Wistar Strain White Rat (Rattus norvegicus) Exposed to High-Fat Diet. Folia Medica Indonesiana, 54(2), 89-95.

Kagan, V. E., Serbinova, E. A., & Packer, L. (1990). Generation and recycling of radicals from phenolic antioxidants. Archives of biochemistry and biophysics, 280(1), 33-39.

Kamal Eldin, A., Frank, J., Razdan, A., Tengblad, S., Basu, S., & Vessby, B. (2000). Effects of dietary phenolic compounds on tocopherol, cholesterol, and fatty acids in rats. Lipids, 35(4), 427-435.

Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., & Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. Journal of experimental medicine, 217(5):1-10.

Ketterman, A. J., Wongtrakul, J., & Saisawang, C. (2020). Phytochemical andrographolide modulates NF-κB and JNK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, a cell model for Parkinson's disease. Heliyon, 6(6): 1-6.

Kim, H. J., Chun, Y. J., Park, J. D., Kim, S. I., Roh, J. K., & Jeong, T. C. (1997). Protection of rat liver microsomes against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation by red ginseng saponin through cytochrome P450 inhibition. Planta medica, 63(05), 415-418.

Kim, M. S., Lee, K. H., Lee, W. M., Jun, J. H., & Kim, D. H. (2011). CD44 disruption attenuates murine hepatic ischemia/reperfusion injury. Journal of Korean Medical Science, 26(7), 919-926.

Kong, L., Zhu, L., Yi, X., Huang, Y., Zhao, H., Chen, Y., ... & Yi, J. (2021). Betulinic acid alleviates spleen oxidative damage induced by acute intraperitoneal exposure to T-2 toxin by activating Nrf2 and inhibiting MAPK signaling pathways. Antioxidants, 10(2), 158.

Kramer, H. (2019). Diet and chronic kidney disease. Advances in Nutrition, 10(Supplement_4), S367-S379.

Kruidering, M., & Evan, G. I. (2000). Caspase-8 in apoptosis: the beginning of “the end”?. Iubmb life, 50(2), 85-90.

Kuchana, M., Bethapudi, D. R., Ediga, R. K., & Sisapuram, Y. (2019). Synthesis, in-vitro antioxidant activity and in-silico prediction of drug-likeness properties of a novel compound: 4-(3, 5-Di-tert-butyl-

4-hydroxybenzylidene)-3-methylisoxazol-5 (4H)-one. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 9(9), 105-110.

Laaroussi, H., Bakour, M., Ousaaid, D., Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., El Ghouizi, A., ... & Lyoussi, B. (2021). Protective effect of honey and propolis against gentamicin-induced oxidative stress and hepatorenal damages. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1(1): 1-19.

Lake, B. B., Chen, S., Hoshi, M., Plongthongkum, N., Salamon, D., Knoten, A., ... & Jain, S. (2019). A single-nucleus RNA-sequencing pipeline to decipher the molecular anatomy and pathophysiology of human kidneys. Nature communications, 10(1), 1-15.

Lanigan, R. S., & Yamarik, T. A. (2002). Final report on the safety assessment of BHT(1). International journal of toxicology, 21 Suppl 2, 19–94.

Lei, Y., Jiang, T., He, L., Liu, Y., Sun, Z., Deng, W., ... & Zhang, Z. (2022). Ellagic acid attenuates beryllium sulphate-induced oxidative stress and histopathological alterations of spleen in rats. Pharmaceutical Biology, 60(1), 1047-1054.

Leist, M., Gantner, F., Künstle, G., & Wendel, A. (1998). Cytokine-mediated hepatic apoptosis. Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 133, 109-155.

Li, L., Yue, G. G. L., Lee, J. K. M., Wong, E. C. W., Fung, K. P., Yu, J., ... & Chiu, P. W. Y. (2018 b). Gene expression profiling reveals the plausible mechanisms underlying the antitumor and antimetastasis effects of Andrographis paniculata in esophageal cancer. Phytotherapy Research, 32(7), 1388-1396.

Li, M., Yang, X., Guan, C., Wen, T., Duan, Y., Zhang, W., ... & Liu, S. (2018 a). Andrographolide sulfonate reduces mortality in Enterovirus 71 infected mice by modulating immunity. International immunopharmacology, 55, 142-150.

Lim, A. M. T., Oyong, G. G., Tan, M. C. S., Shen, C. C., Ragasa, C. Y., & Cabrera, E. C. (2021). Quorum quenching activity of Andrographis paniculata (Burm f.) Nees andrographolide compounds on metallo-

β-lactamase-producing clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa PA22 and PA247 and their effect on lasR gene expression. Heliyon, 7(5), 207-220.

Lin, H. M., Yen, F. L., Ng, L. T., & Lin, C. C. (2007). Protective effects of Ligustrum lucidum fruit extract on acute butylated hydroxytoluene-induced oxidative stress in rats. Journal of Ethnopharmacology, 111(1), 129-136.

Liu, C., Sun, Y., Yang, L., Chen, Y., Ji, R., Wang, H., ... & Wang, J. (2022). The Hypolipidemic and Antioxidant Activity of Wheat Germ and Wheat Germ Protein in High-Fat Diet-Induced Rats. Molecules, 27(7), 2260.

Liu, R., & Mabury, S. A. (2020). Synthetic phenolic antioxidants: A review of environmental occurrence, fate, human exposure, and toxicity. Environmental science & technology, 54(19), 11706-11719.

Liu, X., Shah, A., Gangwani, M. R., Silverstein, P. S., Fu, M., & Kumar, A. (2014). HIV-1 Nef induces CCL5 production in astrocytes through p38-MAPK and PI3K/Akt pathway and utilizes NF-kB, CEBP and AP-1 transcription factors. Scientific reports, 4(1), 1-10.

Liu, Y., Wang, Q., Ma, X., Chen, Y., Sun, L., Duan, Y., & Han, J. (2016). Activation of LXR inhibits the Development of Pulmonary Carcinomas Induced by 3-Methylcholanthrene and Butylated Hydroxytoluene. The FASEB Journal, 30, 1099-2.

Lorente, S., Hautefeuille, M., & Sanchez-Cedillo, A. (2020). The liver, a functionalized vascular structure. Scientific Reports, 10(1), 1-10.

Lynch, T., & Price, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. American family physician, 76(3), 391–396.

Machalz, D., Pach, S., Bermudez, M., Bureik, M., & Wolber, G. (2021). Structural insights into understudied human cytochrome P450 enzymes. Drug Discovery Today, 26(10), 2456-2464.

Mahadevan, V. (2019). Anatomy of the pancreas and spleen. Surgery (Oxford), 37(6), 297-301.

Mahalakshmi, K., & Veerakumari, L.(2020). Toxicological Screening Of Andrographis paniculata Leaf Extract (APLE) On Single And Repeated Dose Toxicity Study. The International journal of analytical and experimental modal analysis, 7(1) : 1-11.

Mahardika, G. G., Dewi, N. W. S., & Aman, I. G. M. (2020). Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (Andrographis Paniculata) Menurunkan Hai (Histology Activity Indeks)-Knodell Score Pada Hepar Mencit (Mus Musculus) Jantan Yang Diinduksi CCL4. E-Jurnal Medika Udayana, 9(5), 75-80.

Mandal, D. D., Mandal, T., & Hazra, M. (2020). Strategic approach in hepatic delivery of andrographolide: Key challenges and new insights. Journal of Herbal Medicine, 24, 100411.

Manikandan, P., & Nagini, S. (2018). Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. Current drug targets, 19(1), 38–54.

Manna, P., Ghosh, J., Das, J., & Sil, P. C. (2010). Streptozotocin induced activation of oxidative stress responsive splenic cell signaling pathways: protective role of arjunolic acid. Toxicology and applied pharmacology, 244(2), 114-129.

Mbagwu, I. S., Ugwu, O. C., Orji, U. H., Offiah, R. O., & Ajaghaku, D. L. (2021). Low-Dose 17β-Estradiol Supplemented with Andrographis Paniculata Improved Glucose and Lipid Homeostasis in a Type-2 Diabesity Mice Model. J Develop Drugs, 10, 204.

Mean, S., Değer, Y., & Yildirim, S. (2018). Effects of butylated hydroxytoluene on blood liver enzymes and liver glutathione and glutathione-dependent enzymes in rats. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 21(4): 461-469.

Medrano-González, P. A., Rivera-Ramírez, O., Montaño, L. F., & Rendón-Huerta, E. P. (2021). Proteolytic processing of CD44 and its implications in cancer. Stem Cells International, 1 :1-12.

Mehmood, A., Ishaq, M., Zhao, L., Safdar, B., Rehman, A. U., Munir, M., ... & Wang, C. (2019). Natural compounds with xanthine oxidase

inhibitory activity: A review. Chemical biology & drug design, 93(4), 387-418.

Mendie , E. L. , Effiom , E. O. , & Uchechukwu , M. E. (2015) . In vivo effect of Citrullus Lanatus seeds extract on liver function on acute butylated hydroxytoluene induced oxidative stri in Albino rats . World Journal of Pharmaceutical Sciences , 133-139 .

Mercogliano, M. F., Bruni, S., Mauro, F., Elizalde, P. V., & Schillaci, R. (2021). Harnessing tumor necrosis factor alpha to achieve effective cancer immunotherapy. Cancers, 13(3), 564.

Mesrati, M.H., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., & Syahir, A. (2021). CD44: A multifunctional mediator of cancer progression. Biomolecules, 11(12), 1850.

Meyer, O. A., Kristiansen, E., & Würtzen, G. (1989). Effects of dietary protein and butylated hydroxytoluene on the kidneys of rats. Laboratory animals, 23(2), 175-179.

Middleton, Jr., MD, E. (1996). Biological properties of plant flavonoids: an overview. International journal of pharmacognosy, 34(5), 344-348.

Min, Y. N., Z. Y. Niu, T. T. Sun, Z. P. Wang, P. X. Jiao, B. B. Zi, P. P. Chen, D. L. Tian, and F. Z. Liu. (2018). Vitamin E and vita- min C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene. Poult. Sci. 97:1238–1244.

Mishra, K., Dash, A. P., & Dey, N. (2011). Andrographolide: a novel antimalarial diterpene lactone compound from Andrographis paniculata and its interaction with curcumin and artesunate. Journal of Tropical Medicine, 1 :1-7.

Mishra, K., Ojha, H., Kallepalli, S., Alok, A., & Chaudhury, N. K. (2014). Protective effect of ferulic acid on ionizing radiation induced damage in bovine serum albumin. International Journal of Radiation Research, 12(2), 113.

Mishra, S., Ghosh, D., Dutta, M., Chattopadhyay, A., & Bandyopadhyay, D. (2013). Melatonin protects against lead-induced oxidative stress in

stomach, duodenum and spleen of male Wistar rats. JPR: BioMedRx: An International Journal, 1(11), 997-1004.

Molaei, E., Molaei, A., Abedi, F., Hayes, A. W., & Karimi, G. (2021). Nephroprotective activity of natural products against chemical toxicants: The role of Nrf2/ARE signaling pathway. Food Science & Nutrition, 9(6), 3362-3384.

Mondal, M., Sarkar, C., Saha, S., Hossain, M. N., Norouzi, R., Mubarak, M. S., ... & Coutinho, H. D. M. (2022). Hepatoprotective activity of andrographolide possibly through antioxidative defense mechanism in Sprague-Dawley rats. Toxicology Reports, 9, 1013-1022.

Mortaz, E., Tabarsi, P., Jamaati, H., Dalil Roofchayee, N., Dezfuli, N. K., Hashemian, S. M., ... & Adcock, I. M. (2021). Increased serum levels of soluble TNF-α receptor is associated with ICU mortality in COVID-19 patients. Frontiers in Immunology, 12:1-8 .

Mourtzikou, A., Alepaki, M., Stamouli, M., Pouliakis, A., Skliris, A., & Karakitsos, P. (2014). Evaluation of serum levels of IL-6, TNF-α, IL-10, IL-2 and IL-4 in patients with chronic hepatitis. Inmunología, 33(2), 41-50.

Müller, S., Sindikubwabo, F., Cañeque, T., Lafon, A., Versini, A., Lombard, B., ... & Rodriguez, R. (2020). CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. Nature chemistry, 12(10), 929-938.

Murugan, N. A., Pandian, C. J., & Jeyakanthan, J. (2021). Computational investigation on Andrographis paniculata phytochemicals to evaluate their potency against SARS-CoV-2 in comparison to known antiviral compounds in drug trials. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 39(12), 4415-4426.

Muslih, B. ; Mizil, Y. O. & Al-Nimer, M. S. (2001). Detection The level of peroxynitrite, and related with antioxidant status in the serum of patients with acute myocardial infraction. Nat. J. Chem. , (4):625-637.

Mussard, E., Cesaro, A., Lespessailles, E., Legrain, B., Berteina-Raboin, S., & Toumi, H. (2019). Andrographolide, a natural antioxidant: an update. Antioxidants, 8(12), 571.

Mussard, E., Jousselin, S., Cesaro, A., Legrain, B., Lespessailles, E., Esteve, E., & Toumi, H. (2020a). Andrographis paniculata and its bioactive diterpenoids against inflammation and oxidative stress in keratinocytes. Antioxidants, 9(6), 530.

Mussard, E., Jousselin, S., Cesaro, A., Legrain, B., Lespessailles, E., Esteve, E., ... & Toumi, H. (2020b). Andrographis paniculata and its bioactive diterpenoids protect dermal fibroblasts against inflammation and oxidative stress. Antioxidants, 9(5), 432.

Nagajothi, S., Mekala, P., Raja, A., & Senthilkumar, A. (2018). Andrographis paniculata: qualitative and quantitative phytochemical analysis. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7(4), 1251-1253.

Naim, M. R., Sulastri, S., & Hadi, S. (2019). Gambaran hasil pemeriksaan kadar kolesterol pada penderita hipertensi di rsud syekh yusuf kabupaten gowa. Jurnal Media Laboran, 9(2), 33-38.

Nakagawa, Y., & Tayama, K. (1988). Nephrotoxicity of butylated hydroxytoluene in phenobarbital-pretreated male rats. Archives of toxicology, 61(5), 359-365.

Nakajima, K., Yuno, M., Tanaka, K., & Nakamura, T. (2022). High Aspartate Aminotransferase/Alanine Aminotransferase Ratio May Be Associated with All-Cause Mortality in the Elderly: A Retrospective Cohort Study Using Artificial Intelligence and Conventional Analysis. In Healthcare, 10(4) :. 674.

Nankaya, J., Gichuki, N., Lukhoba, C., & Balslev, H. (2020). Medicinal plants of the Maasai of Kenya: a review. Plants, 9(1): 44

Nasir, A., Abubakar, M. G., Shehu, R. A., Aliyu, U., & Toge, B. K. (2013). Hepatoprotective effect of the aqueous leaf extract of Andrographis paniculata Nees against carbon tetrachloride–induced hepatotoxicity in rats. Nigerian Journal of Basic and applied sciences, 21(1), 45-54.

Nayek, S., Lund, A. K., & Verbeck, G. F. (2022). Inhalation exposure to silver nanoparticles induces hepatic inflammation and oxidative

stress, associated with altered renin angiotensin system signaling, in Wistar rats. Environmental Toxicology, 37(3), 457-467.

Ndrepepa, G. (2021). Aspartate aminotransferase and cardiovascular disease—a narrative review. J. Lab. Precis. Med, 6(6).

Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. European journal of medicinal chemistry, 178, 687-704.

Neogy, S., Das, S., Mahapatra, S. K., Mandal, N., & Roy, S. (2008). Amelioratory effect of Andrographis paniculata Nees on liver, kidney, heart, lung and spleen during nicotine induced oxidative stress. Environmental Toxicology and Pharmacology, 25(3), 321-328.

Neuschwander-Tetri, B. A. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. Hepatology, 52(2), 774-788.

Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Cell Death & Differentiation, 6(11), 1028-1042.

Niranjan, A., Tewari, S. K., & Lehri, A. (2010). Biological activities of kalmegh (Andrographis paniculata Nees).Indian Journal of Natural Products and Resources, 1(2), 125-135.

Nuriansyah, M.; Mahyarudin and Andriani. (2019) Uji Efek Hepatoprotektor Andrographolide terhadap Kadar Glutation Jaringan Hepar Tikus Rattus Norvegicus Galur Wistar yang Diinduksi Karbon Tetraklorida (CCl4). Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura, 5(2):1-8.

Nyeem, M. A. B., Mannan, M. A., Nuruzzaman, M., Kamrujjaman, K. M., & Das, S. K. (2017). Indigenous king of bitter (Andrographis paniculata): A review. Journal of Medicinal Plants Studies, 5(2), 318-324.

Obiwulu, E. (2019). Protective function of butylated hydroxytoluene in lead-induced oxidative alterations in tissues of Wistar rats. Journal of

Applied Sciences and Environmental Management, 23(11), 2051-2057.

Ogunlana, O. O., Ogunlana, O. E., Popoola, J. O., Adetuyi, B. O., Adeyemi, A. O., Adekunbi, T. S., ... & Keleko, A. A.(2021) .TWIGS OF Andrographis paniculata (Burn. F) Nees Attenuates Carbon Tetrachloride (CCl4-) Induced Liver Damage In Wistar Albino Rats. Rasayan J. Chem., 14(4), 2598-2603.

Olayeriju, O. S., Elekofehinti, O. O., Olaleye, M. T., & Akindahunsi, A. A. (2021). Activation of NRF2/HO-1 Pathway by aqueous methanolic leaf extract of Triclisia gilletii and selected identified compounds in Triclisia gilletii, modulates crystal binding genes (CD44/OPN) in Ethane-1, 2-diol-induced nephrolithic rats. Phytomedicine Plus, 1(4) : 1-9.

Osawa, Y., Kawai, H., Tsunoda, T., Komatsu, H., Okawara, M., Tsutsui, Y., ... & Kanto, T. (2021). Cluster of differentiation 44 promotes liver fibrosis and serves as a biomarker in congestive hepatopathy. Hepatology communications, 5(8), 1437-1447.

Ouhtit, A., Rizeq, B., Abou Saleh, H., Rahman, M. M., & Zayed, H. (2018). Novel CD44-downstream signaling pathways mediating breast tumor invasion. International Journal of Biological Sciences, 14(13), 1782.

Owoade, A. O., Alausa, A. O., Adetutu, A., & Owoade, A. W. (2022). Protective effects of methanolic extract of Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees leaves against arsenic-induced damage in rats. Bulletin of the National Research Centre, 46(1), 1-11.

Ozbek, E. (2012). Induction of oxidative stress in kidney. International journal of nephrology, 1:1-10 .

Özgür, Y., Akın, S., Yılmaz, N. G., Gücün, M., & Keskin, Ö. (2021). Uric acid albumin ratio as a predictive marker of short-term mortality in patients with acute kidney injury. Clinical and Experimental Emergency Medicine, 8(2), 82.

Padmalochana, K., & Dhanarajan, M. S.(2017). Nephroprotective Potential Compounds from Leaves Extracts of Andrographis Paniculata. Texila International Journal of Basic Medical Science, 2(2):1-7.

Palanikani, R., Chanthini, K. M. P., Soranam, R., Thanigaivel, A., Karthi, S., Senthil-Nathan, S., & Murugesan, A. G. (2020). Efficacy of Andrographis paniculata supplements induce a non-specific immune system against the pathogenicity of Aeromonas hydrophila infection in Indian major carp (Labeo rohita). Environmental Science and Pollution Research, 27(19), 23420-23436.

Pan, Y., Long, X., Yi, R., & Zhao, X. (2018). Polyphenols in Liubao tea can prevent CCl4-induced hepatic damage in mice through its antioxidant capacities. Nutrients, 10(9), 1280.

Pandey, H., & Kumar, S. (2021). Butylated hydroxytoluene and Butylated hydroxyanisole induced cyto-genotoxicity in root cells of Allium cepa L. Heliyon, 7(5):1-7.

Panicker V, George S, Krishna D.(2014). Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats. Int J Pharm Sci,3:758-63.

Park, C. M., Cha, Y. S., Youn, H. J., Cho, C. W., & Song, Y. S. (2010). Amelioration of oxidative stress by dandelion extract through CYP2E1 suppression against acute liver injury induced by carbon tetrachloride in sprague-dawley rats. Phytotherapy Research, 24(9), 1347-1353.

Park, H. M., Lee, J. H., & Lee, Y. J. (2020). Positive association of serum alkaline phosphatase level with severe knee osteoarthritis: A nationwide population-based study. Diagnostics, 10(12), 1016.

Park, J., Shrestha, R., Qiu, C., Kondo, A., Huang, S., Werth, M., ... & Suszták, K. (2018). Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. Science, 360(6390), 758-763.

Parodi, A., Miao, J., Soond, S. M., Rudzińska, M., & Zamyatnin Jr, A. A. (2019). Albumin nanovectors in cancer therapy and imaging. Biomolecules, 9(6), 218.

Patsalos, O., Dalton, B., Leppanen, J., Ibrahim, M. A., & Himmerich, H. (2020). Impact of TNF-α inhibitors on body weight and bmi: A systematic review and meta-analysis. Frontiers in pharmacology, 11, 481.

Patton, C. J., & Crouh, S. R. (1977). Urea colorimetric endpoint determination urease-Berthelot reaction. Annal. Chem, 49, 464–469.

Pebriani, R., Jafar, N., Hidayanti, H., & Salamah, U. (2021). The Effect of Extract of Canarian Nuts on Reduction of Total Cholesterol Levels of Hyperglicemic Rat. Journal of Scientific Research in Medical and Biological Sciences, 2(1), 19-29.

Permata, F. S., Roosdiana, A., & Anggraini, V. O. (2020). The effect of fermented Glycine max (L.) Merr. to rats induced CCl4 toward hepatic IL-6 expression and ALT-AST level. In Journal of Physics: Conference Series IOP Publishing.,1430(1): 1012-1019.

Phunikhom, K., Khampitak, K., Aromdee, C., Arkaravichien, T., & Sattayasai, J. (2015). Effect of Andrographis paniculata extract on triglyceride levels of the patients with hypertriglyceridemia: a randomized controlled trial. J Med Assoc Thai, 98(6) : 41-47.

Poosa, M., & Vanapatla, S. R. (2020). Protective effect of Antigonon leptopus (Hook et. Arn) in cadmium induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. Clinical Phytoscience, 6(1) : 1-8.

Pop, A., Drugan, T., Gutleb, A. C., Lupu, D., Cherfan, J., Loghin, F., & Kiss, B. (2018). Estrogenic and anti-estrogenic activity of butylparaben, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propyl gallate and their binary mixtures on two estrogen responsive cell lines (T47D-Kbluc, MCF-7). Journal of Applied Toxicology, 38(7): 944-957.

Potere, N., Batticciotto, A., Vecchié, A., Porreca, E., Cappelli, A., Abbate, A., ... & Bonaventura, A. (2021). The role of IL-6 and IL-6 blockade in COVID-19. Expert review of clinical immunology, 17(6): 601-618.

Powell, C. J., & Connolly, A. K. (1991). The site specificity and sensitivity of the rat liver to butylated hydroxytoluene-induced damage. Toxicology and applied pharmacology, 108(1), 67-77.

Powell, C. J., Connelly, J. C., Jones, S. M., Grasso, P., & Bridges, J. W. (1986). Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity. Food and Chemical Toxicology, 24(10-11), 1131-1143.

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

Radi, Z. A. (2019). Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. International journal of toxicology, 38(3), 215-227.

Rafi, M., Devi, A. F., Syafitri, U. D., Heryanto, R., Suparto, I. H., Amran, M. B., ... & Lim, L. W. (2020). Classification of Andrographis paniculata extracts by solvent extraction using HPLC fingerprint and chemometric analysis. BMC Research Notes, 13(1), 1-6.

Rahmi EP, Kumolosasi E, Jalil J, Buang F and Jamal JA .(2022). Extracts of Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees Leaves Exert Anti-Gout Effects by Lowering Uric Acid Levels and Reducing Monosodium Urate Crystal- Induced Inflammation. Front. Pharmacol. 12: 1-12.

Rajanna, M., Bharathi, B., Shivakumar, B. R., Deepak, M., Prabakaran, D., Vijayabhaskar, T., & Arun, B. (2021). Immunomodulatory effects of Andrographis paniculata extract in healthy adults–An open-label study. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 12(3), 529-534.

Rajaratinam, H., & Nafi, S. N. M. (2019). Andrographolide is an alternative treatment to overcome resistance in er-positive breast cancer via cholesterol biosynthesis pathway. The Malaysian journal of medical sciences: MJMS, 26(5), 6.

Rajasekaran, M. (2019). Nephroprotective effect of Costus pictus extract against doxorubicin-induced toxicity on Wistar rat. Bangladesh Journal of Pharmacology , 14(2), 93-100.

Rajendrakumar, T., Rao, S., Satyanarayana, M. L., Narayanaswamy, H. D., Byregowda, S. M., & Purushotham, K. M. (2020 b). Cisplatin induced histopathological changes in the liver and its amelioration by Andrographis paniculata. The Pharma Innovation Journal, 9(5): 46-56.

Rajendrakumar, T., Rao, S., Satyanarayana, M. L., Narayanaswamy, H. D., & Byregowda, S. M. (2020 c). Effect of Andrographis paniculata on cisplatin induced renal histopathology in Wistar albino rats. Journal of Entomology and Zoology Studies, 8(3): 589-596.

Rajendrakumar, T., Suguna, R., Satyanarayana, M. L., Narayanaswam, H. D., Byregowda, S. M., & Purushotham, K. M. (2020 a). Ameliorative effect of Andrographis paniculata against oxidative damage caused by cisplatin in rat kidney. Pharma Innov, 9(3), 356-359.

Ramalingam, S., Karupannan, S., Padmanaban, P., Vijayan, S., Sheriff, K., Palani, G., & Krishnasamy, K. K. (2018). Anti-dengue activity of Andrographis paniculata extracts and quantification of dengue viral inhibition by SYBR green reverse transcription polymerase chain reaction. Ayu, 39(2), 87.

Rasool, U., Parveen, A., & Sah, S. K. (2018). Efficacy of Andrographis paniculata against extended spectrum β-lactamase (ESBL) producing E. coli. BMC complementary and alternative medicine, 18(1), 1-9.

Rastogi SS , Singh M , Kumar M , Mishra A , Shrestha U.(2014). Hepatoprotective Action of Andrographis paniculata Against Cisplatin Induced Toxicity in Mice : A Histological Study . Research Journal of pharmaceutical , Biological and chemical Sciences ; 5 (4) : 1242-1250

Reeta, J., Deepa, S., & Johri, P. K. (2010). Study of hypolipidemic activity of selected medicinal plant extracts in normal and induced hyperlipidemic rats. Biochemical and Cellular Archives, 10(2), 215-224.

Ribeiro, J. S., Santos, M. J. M. C., Silva, L. K. R., Pereira, L. C. L., Santos, I. A., da Silva Lannes, S. C., & da Silva, M. V. (2019). Natural

antioxidants used in meat products: A brief review. Meat science, 148, 181-188.

Rolski, F., & Błyszczuk, P. (2020). Complexity of TNF-α signaling in heart disease. Journal of clinical medicine, 9(10), 3267.

Rosa, A. C., Bruni, N., Meineri, G., Corsi, D., Cavi, N., Gastaldi, D., & Dosio, F. (2021). Strategies to expand the therapeutic potential of superoxide dismutase by exploiting delivery approaches. International Journal of Biological Macromolecules, 168, 846-865.

Safer, A. M., & Al-Nughamish, A. J. (1999). Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: an electron microscopical study. Histology and histopathology, 14(2), 391-406.

Salunkhe, A. J., & Patil, R. N. (2018). Hepatoprotective effect of ethanolic extract of Andrographis paniculata against thioacetamide induced toxicity in the liver of albino rats. Research. Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences, 4(6), 549-559.

Sa-Ngiamsuntorn, K., Suksatu, A., Pewkliang, Y., Thongsri, P., Kanjanasirirat, P., Manopwisedjaroen, S., & Hongeng, S. (2021). Anti-SARS-CoV-2 activity of Andrographis paniculata extract and its major component Andrographolide in human lung epithelial cells and cytotoxicity evaluation in major organ cell representatives. Journal of natural products, 84(4), 1261-1270.

Sani, D., Khatab, N. I., Kirby, B. P., Yong, A., Hasan, S., Basri, H., & Stanslas, J. (2019). A standardised Andrographis paniculata Burm. Nees aqueous extract prevents Lipopolysaccharide-induced cognitive deficits through suppression of inflammatory cytokines and oxidative stress mediators. Journal of Advanced Research, 16, 87-97.

Sannasimuthu, A., Kumaresan, V., Pasupuleti, M., Paray, B. A., Al-Sadoon, M. K., & Arockiaraj, J. (2018). Radical scavenging property of a novel peptide derived from C-terminal SOD domain of superoxide dismutase enzyme in Arthrospira platensis. Algal research, 35, 519-529.

Satoh, T., Ichida, T., Matsuda, Y., Sugiyama, M., Yonekura, K., Ishikawa, T., & Asakura, H. (2000). Interaction between hyaluronan and CD44 in the development of dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. Journal of gastroenterology and hepatology, 15(4), 402-411.

Schwabe, R. F., & Brenner, D. A. (2006). Mechanisms of liver injury. I. TNF-α-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 290(4), 583-589.

Şenol, A., Alayunt, N. Ö., & Solmaz, Ö. A. (2021). Role of tumor necrosis factor-α, interleukin-1β, interleukin-6 in liver inflammation in chronic hepatitis B and chronic hepatitis C. Gülhane Medical Journal, 63(3), 200-205.

Sharma, A., Sharma, R., Kumar, D., & Padwad, Y. (2020). Berberis lycium Royle fruit extract mitigates oxi-inflammatory stress by suppressing NF-κB/MAPK signalling cascade in activated macrophages and Treg proliferation in splenic lymphocytes. Inflammopharmacology, 28(4), 1053-1072.

Sharma, M., & Singh, A. (2019). Changes in Ultrastructure of Crossbred Bovine Spermatozoa in Butylated Hydroxytoluene Supplemented Semen. Int J Livest Res, 9, 64-69.

Sharma, S., & Sharma, Y. P. (2018). Comparison of different extraction methods and HPLC method development for the quantification of andrographolide from Andrographis paniculata (Burm. f.) Wall. ex Nees. Annals of Phytomedicine, 7(1), 119-130.

Sharma, V., Sharma, R., & Sharma, V. L. (2022). Andrographis paniculata mitigates first-line anti-tubercular drugs-induced nephrotoxicity in Wistar rats. Biomarkers, 1-13.

Sheeja, K., & Kuttan, G. (2010). Andrographis paniculata downregulates proinflammatory cytokine production and augments cell mediated immune response in metastatic tumor-bearing mice. Asian Pac J Cancer Prev, 11(3), 723-729.

Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., & Ponta, H. (1994). Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. Current opinion in cell biology, 6(5), 726-733.

Shi, S., Ji, X. Y., Shi, J. J., Shi, S. Q., Jia, Q. L., Yuan, G. Z., ... & Hu, Y. H. (2020). Gut Microbiota Mediates the Protective Effects of Andrographolide Inhibits Inflammation and Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in High-Fat Diet Induced apoE (-/-) Mice. BioRxiv. ,1 :1-23 .

Silvagno, F., Vernone, A., & Pescarmona, G. P. (2020). The role of glutathione in protecting against the severe inflammatory response triggered by COVID-19. Antioxidants, 9(7), 624.

Simán, C. M., & Eriksson, U. J. (1996). Effect of butylated hydroxytoluene on α-tocopherol content in liver and adipose tissue of rats. Toxicology letters, 87(2-3), 103-108.

Singh, P., Srivastava, M. M., & Khemani, L. D. (2009). Renoprotective effects of Andrographis paniculata (Burm. f.) Nees in rats. Upsala Journal of Medical Sciences, 114(3), 136-139.

Singh, R. K., Kumar, S., Prasad, D. N., & Bhardwaj, T. R. (2018). Therapeutic journery of nitrogen mustard as alkylating anticancer agents: Historic to future perspectives. European journal of medicinal chemistry, 151, 401-433.

Sirikarin, T., Palo, T., Chotewuttakorn, S., Chandranipapongse, W., Limsuvan, S., & Akarasereenont, P. (2018). The effects of Andrographis paniculata on platelet activity in healthy Thai volunteers. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1:1-10.

Sivaraj, A., Vinothkumar, P., Sathiyaraj, K., Sundaresan, S., Devi, K., & Senthilkumar, B. (2011). Hepatoprotective potential of Andrographis paniculata aqueous leaf extract on ethanol induced liver toxicity in albino rats. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(6), 24.

Soares, V., de Avelar, I. S., Venâncio, P. E. M., Pires-Oliveira, D. A., de Almeida Silva, P. H., Borges, A. R., ... & Noll, M. (2020). Acute

changes in interleukin-6 level during four days of long-distance walking. Journal of Inflammation Research, 13, 871.

Soep, S. (2021). Latihan Fisik Penderita Dm Terhadap Penurunan Konsentrasi Glukosa Darah, Ldl Dan Peningkatan Hdl. Jurnal Ilmiah Pannmed (Pharmacist, Analyst, Nurse, Nutrition, Midwivery, Environment, Dentist), 16(1), 51-57.

Spada, A., Emami, J., Tuszynski, J. A., & Lavasanifar, A. (2021). The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery. Molecular Pharmaceutics, 18(5), 1862-1894.

Spss .(1999). Statistical packages social sciences , Verion 10 .USA

Steeland, S., Libert, C., & Vandenbroucke, R. E. (2018). A new venue of TNF targeting. International journal of molecular sciences, 19(5), 1442.

Stipp, M. C., & Acco, A. (2021). Involvement of cytochrome P450 enzymes in inflammation and cancer: a review. Cancer chemotherapy and pharmacology, 87(3), 295–309.

Stoia, M., & Oancea, S. (2022). Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends. Antioxidants, 11(4), 638.

Subramaniam, S., Hedayathullah Khan, H. B., Elumalai, N., & Sudha Lakshmi, S. Y. (2015). Hepatoprotective effect of ethanolic extract of whole plant of Andrographis paniculata against CCl4-induced hepatotoxicity in rats. Comparative Clinical Pathology, 24(5), 1245-1251.

Sun, L., Zhang, Y., Wen, S., Li, Q., Chen, R., Lai, X., ... & Sun, S. (2022). Extract of Jasminum grandiflorum L. alleviates CCl4-induced liver injury by decreasing inflammation, oxidative stress and hepatic CYP2E1 expression in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy, 152 : 1-13.

Sun, W., Leng, L., Yin, Q., Xu, M., Huang, M., Xu, Z., ... & Chen, S. (2019). The genome of the medicinal plant Andrographis paniculata provides insight into the biosynthesis of the bioactive diterpenoid neoandrographolide. The Plant Journal, 97(5), 841-857.

Sun, Z., Gao, R., Chen, X., Liu, X., Ding, Y., Geng, Y., ... & He, J. (2021). Exposure to butylated hydroxytoluene compromises endometrial decidualization during early pregnancy. Environmental Science and Pollution Research, 28(31), 42024-42036.

Sundhani, E., Lukitaningsih, E., Nurrochmad, A., & Nugroho, A. E. (2022). Potential pharmacokinetic and pharmacodynamic herb-drug interactions of Andrographis paniculata (Burm. f.) and andrographolide: A systematic review. Journal of Herbmed Pharmacology, 11(2), 154-165.

Takemoto , Y. , & Naganuma , T. (2012) . Kidney function tests . Japanese Journal of Clinical Urology , 66 (4) , 274-278

Tamizhselvi, R., Samikkannu, T., and Niranjali, S. (1995) Pulmonary Phospholipid Changes Induced by Butylated HydroxyToluene, an Antioxidant, in Rats, Ind. J. Exper. Biol. 33, 796–797.

Tammi, R. H., Kultti, A., Kosma, V. M., Pirinen, R., Auvinen, P., & Tammi, M. I. (2008). Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. In Seminars in cancer biology , 18(4),288-295.

Tan, W., Luo, X., Li, W., Zhong, J., Cao, J., Zhu, S., ... & Chen, Y. (2019). TNF-α is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. EBio Medicine, 40, 446-456.

Therasa, S. , Sobiya, G. , Parimala, S.. (2020). Leaves Of Andrographis Paniculata Is An Antioxidant And Anticancer Agent. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 213-217.

Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M., & Legrand, A. (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 3(5), 373-384.

Tietz, N. W. (2006).Clinical Guide to Laboratory Test.4th ed.,Saunders. pp.86-71.

Torres Rojas, A. M., Lorente, S., Hautefeuille, M., & Sanchez-Cedillo, A. (2021). Hierarchical Modeling of the Liver Vascular System. Frontiers in physiology, 1:1-12.

Tortosa, V., Pietropaolo, V., Brandi, V., Macari, G., Pasquadibisceglie, A., & Polticelli, F. (2020). Computational methods for the identification of molecular targets of toxic food additives. Butylated hydroxytoluene as a case study. Molecules, 25(9), 2229.

Tufarelli, V., Baghban-Kanani, P., Azimi-Youvalari, S., Hosseintabar-Ghasemabad, B., Slozhenkina, M., Gorlov, I., ... & Laudadio, V. (2021). Effects of horsetail (Equisetum arvense) and spirulina (Spirulina platensis) dietary supplementation on laying hens productivity and oxidative status. Animals, 11(2), 335.

Turano, M., Cammarota, F., Duraturo, F., Izzo, P., & De Rosa, M. (2021). A potential role of IL-6/IL-6R in the development and management of colon cancer. Membranes, 11(5), 312.

Uciechowski, P., & Dempke, W. C. (2020). Interleukin-6: a masterplayer in the cytokine network. Oncology, 98(3), 131-137.

Uno, K., Miyajima, K., Toma, M., Suzuki-Kemuriyama, N., & Nakae, D. (2022). CD44 expression in the bile duct epithelium is related to hepatic fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis rats induced by a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid diet. Journal of Toxicologic Pathology. 35: 149–157.

Vairetti, M., Di Pasqua, L. G., Cagna, M., Richelmi, P., Ferrigno, A., & Berardo, C. (2021). Changes in glutathione content in liver diseases: An update. Antioxidants, 10(3), 364.

Velazquez-Salinas, L., Verdugo-Rodriguez, A., Rodriguez, L. L., & Borca, M. V. (2019). The role of interleukin 6 during viral infections. Frontiers in microbiology, 10, 1057.

Venkatanarayana, G., Sudhakara, G., Sivajyothi, P., & Indira, P. (2012). Protective effects of curcumin and vitamin E on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. EXCLI journal, 11, 641.

Venmathi Maran, B. A., Iqbal, M., Gangadaran, P., Ahn, B. C., Rao, P. V., & Shah, M. D. (2022). Hepatoprotective Potential of Malaysian Medicinal Plants: A Review on Phytochemicals, Oxidative Stress, and Antioxidant Mechanisms. Molecules, 27(5), 1533.

Verma, H., Negi, M. S., Mahapatra, B. S., Shukla, A., & Paul, J. (2019). Evaluation of an emerging medicinal crop Kalmegh [Andrographis paniculata (Burm. F.) Wall. Ex. Nees] for commercial cultivation and pharmaceutical & industrial uses: A review. J. Pharmacogn. Phytochem, 8(4), 835-848.

Vida, C., M Gonzalez, E., & De la Fuente, M. (2014). Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. Current Pharmaceutical Design, 20(29), 4656-4678.

Vikis, H. G., Gelman, A. E., Franklin, A., Stein, L., Rymaszewski, A., Zhu, J., ... & You, M. (2012). Neutrophils are required for 3-methylcholanthrene initiated, butylated hydroxytoluene promoted lung carcinogenesis. Molecular carcinogenesis, 51(12), 993-1002.

Visaria, A., Pai, S., Fayngersh, A., & Kothari, N. (2020). Association between alanine aminotransferase within the normal range and all-cause and cause-specific mortality: A nationwide cohort study. PloS one, 15(11), 1-13.

Wang, D., Guo, H., Chang, J., Wang, D., Liu, B., Gao, P., & Wei, W. (2018). Andrographolide prevents EV-D68 replication by inhibiting the acidification of virus-containing endocytic vesicles. Frontiers in Microbiology, 9, 1-10.

Wang, H., Han, Q., Chen, Y., Hu, G., & Xing, H. (2021 c). Novel insights into cytochrome P450 enzyme and solute carrier families in cadmium-induced liver injury of pigs. Ecotoxicology and Environmental Safety, 211, 111910.

Wang, R., Tang, R., Li, B., Ma, X., Schnabl, B., & Tilg, H. (2021 a). Gut microbiome, liver immunology, and liver diseases. Cellular & molecular immunology, 18(1), 4-17.

Wang, X., Yan, X., Yang, Y., Yang, W., Zhang, Y., Wang, J., & Yan, B. (2020). Dibutyl phthalate-mediated oxidative stress induces splenic

injury in mice and the attenuating effects of vitamin E and curcumin. Food and Chemical Toxicology, 136, 110955.

Wang, Y., Wang, S., Wang, R., Li, S., & Yuan, Y. (2021 b). Neferine Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects on Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis by Inhibiting the MAPK and NF-κB/IκBα Pathways. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2021, 4136019.

Weber, G. F., Ashkar, S., Glimcher, M. J., & Cantor, H. (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). Science, 271(5248), 509-512.

Weng, X., Maxwell-Warburton, S., Hasib, A., Ma, L., & Kang, L. (2022). The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. Trends in Endocrinology & Metabolism,33(5),318-332.

Weng, Z., Chi, Y., Xie, J., Liu, X., Hu, J., Yang, F., & Li, L. (2018). Anti-inflammatory activity of dehydroandrographolide by TLR4/NF-κB signaling pathway inhibition in bile duct-ligated mice. Cellular Physiology and Biochemistry, 49(3), 1124-1137.

Wintachai, P., Kaur, P., Lee, R. C. H., Ramphan, S., Kuadkitkan, A., Wikan, N., ... & Smith, D. R. (2015). Activity of andrographolide against chikungunya virus infection. Scientific reports, 5(1), 1-14.

Witschi, H., Malkinson, A. M., & Thompson, J. A. (1989). Metabolism and pulmonary toxicity of butylated hydroxytoluene (BHT). Pharmacology & therapeutics, 42(1), 89–113.

Wree, A., McGeough, M. D., Inzaugarat, M. E., Eguchi, A., Schuster, S., Johnson, C. D., ... & Feldstein, A. E. (2018). NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: roles of IL-17 and TNF in mice. Hepatology, 67(2), 736-749.

Wu, J., Guan, X., Dai, Z., He, R., Ding, X., Yang, L., & Ge, G. (2021). Molecular probes for human cytochrome P450 enzymes: Recent progress and future perspectives. Coordination Chemistry Reviews, 427, 213600.

Xiao, Z., Wan, J., Nur, A. A., Dou, P., Mankin, H., Liu, T., & Ouyang, Z. (2018). Targeting CD44 by CRISPR-Cas9 in multi-drug resistant

osteosarcoma cells. Cellular physiology and biochemistry, 51(4), 1879-1893.

Xu, H., Niu, M., Yuan, X., Wu, K., & Liu, A. (2020). CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target. Experimental Hematology & Oncology, 9(1), 1-14.

Xu, X., Liu, A., Hu, S., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Wang, X., & Martínez, M. A. (2021). Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. Food Chemistry, 353, 129488.

Yadav, S., Sharma, S., Ahmad, F., & Rathaur, S. (2020). Antifilarial efficacy of green silver nanoparticles synthesized using Andrographis paniculata. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 56: 1-11.

Yang, X., Sun, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shi, G., Wei, F., & Jiang, G. (2018). Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. Science of the Total Environment, 643, 559-568.

Yi, H. W., Lu, X. M., Fang, F., Wang, J., & Xu, Q. (2008). Astilbin inhibits the adhesion of T lymphocytes via decreasing TNF-α and its associated MMP-9 activity and CD44 expression. International immunopharmacology, 8(10), 1467-1474.

Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. International journal of health sciences, 12(3), 88.

Yousef, M. I., Omar, S. A., El-Guendi, M. I., & Abdelmegid, L. A. (2010). Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. Food and Chemical Toxicology, 48(11), 3246-3261.

Zamzam, N. S., Abdel Rahman, M. H., & Abdel Ghani, M. F. (2019). Environmentally evaluated new HPLC/UV method for the simultaneous determination of acesulfame-k, butylated hydroxytoluene, and aspartame and its degradant in chewing gum. Journal of AOAC International, 102(6), 1892-1900.

Zarei, A., Noroozi, S., & Khadem, E. (2019). A Review on the Structure and Function of Liver from Avicenna Point of View and Its Comparison with Conventional Medicine. Traditional and Integrative Medicine, 28-36.

Zeghib, K., & Boutlelis, D. A. (2021). Food Additive (Sodium benzoate)-induced Damage on Renal Function and Glomerular Cells in Rats; Modulating Effect of Aqueous Extract of Atriplex halimus L. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR, 20(1), 296.

Zhang, C., Bruins, M.E., Yang, Z.Q., Liu, S.T. and Rao, P.F., (2016). A new formula to calculate activity of superoxide dismutase in indirect assays. Analytical biochemistry, 503, :65-67.

Zhang, R., Li, J., & Cui, X. (2020). Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2, 6-di-tert-butyl-hydroxytoluene in mice. Science of the Total Environment, 739, 139862.

Zhao, S., Jiang, J., Jing, Y., Liu, W., Yang, X., Hou, X., & Wei, L. (2020). The concentration of tumor necrosis factor-α determines its protective or damaging effect on liver injury by regulating Yap activity. Cell death & disease, 11(1), 1-13.

Zhong, T., Feng, M., Su, M., Wang, D., Li, Q., Jia, S., & Fan, Y. (2021). Qihuzha granule attenuated LPS-induced acute spleen injury in mice via Src/MAPK/Stat3 signal pathway. Journal of Ethnopharmacology, 281, 114458.

Zhou, X., Zhao, L., Luo, J., Tang, H., Xu, M., Wang, Y., & Jing, B. (2019). The toxic effects and mechanisms of Nano-Cu on the spleen of rats. International journal of molecular sciences, 20(6), 1469.

Zhu, Q., Zheng, P., Chen, X., Zhou, F., He, Q., & Yang, Y. (2018). Andrographolide presents therapeutic effect on ulcerative colitis through the inhibition of IL-23/IL-17 axis. American journal of translational research, 10(2), 465.

Zhu, S., Wei, X., Yang, X., Huang, Z., Chang, Z., Xie, F., ... & Wang, Q. (2019). Plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 and superoxide dismutase are independent predicators of cognitive

impairment in cerebral small vessel disease patients: diagnosis and assessment. Aging and disease, 10(4), 834.

Zuo, H. L., Huang, H. Y., Lin, Y. C. D., Cai, X. X., Kong, X. J., Luo, D. L., ... & Huang, H. D. (2022). Enzyme Activity of Natural Products on Cytochrome P450. Molecules, 27(2), 515.

Summary

This study aims to know the protective role of the aqueous extract of *Andrographis paniculata* on some physiological and histological parameters in White male rabbits treated with butylated hydroxyltoluene (BHT).

The study was conducted in the College of Education for Pure Sciences / University of Karbala and the animal house of the College of Veterinary Medicine / University of Karbala for the period from the beginning of November 2021 until February 2022. This study included use of 100 male rabbits *Oryctatagus cuniculus* whose ages ranged between 8- 9 months with an average weight of 1500-2000 g. The aqueous extract of *Andrographis paniculata* was prepared, then the first experiment was conducted, which aimed to determine the half effective dose determining the half-effective dose (ED_{50}) of the aqueous extract of *Andrographis paniculata* through study the curve of Effective dose, 60 adult male rabbits were used, which were randomly divided into six equal groups (10 animals/group) and they were administered orally and daily five increasing doses of *Andrographis paniculata* extract (0,50, 100, 150, 200 and 250 mg/day/ kg) for four weeks . Fasting blood samples were collected after the end of experiment to study the concentration of the following parameters: Malonaldehyde (MDA), Reduced Glutathione (GSH), Total Cholesterol (TC) and High-density Lipoprotein (HDL). The half-effect dose of was (100 mg/kg/B.W) .

The second experiment aimed to study the protective role of *Andrographis paniculata* extract on the toxic effects induced by BHT. 40 adult male rabbits were used, which were randomly divided into four equal groups (10 animals / group), the first group(G1) was administrated with 1 ml / kg of corn oil and considered as a control group, the second group (G2) administrated 1 mg / kg of BHT, the third group (G3) administrated 100 mg / kg of Andrographis , while the animals of the fourth group (G4) administrated 1 mg / kg of BHT and

100 mg / kg of *Andrographis paniculata* extract orally for a month daily.

Fasting Blood samples were collected after the end of the experiment to study the concentration of the following parameters: aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), superoxide dismutase (SOD), Malondialdehyde (MDA), Reduced Glutathion (GSH), High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL), Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Triacylglycerol (TAG), Total Bilirubin (T-BIL), Albumin, Urea, Uric acid, Tumor necrosis factor alpha (TNF-α), Interleukin 6 (IL- 6) and Cytochrome P450, in addition to measurement the gene expression of *CD44* gene by using Real –Time PCR technology .

The results of this experiment showed that oral administration of BHT caused significant increase ($P<0.01$) in the concentrations of AST, ALP, ALT, MDA, TC, LDL, T-BIL, Urea, Uric acid, TNF-α, and IL-6, while there was significant decrease ($P<0.01$) in the concentration of Albumin, SOD, GSH, HDL and Cytochrome P450 , with no significant differences ($P>0.01$) in the concentration of TAG and VLDL compared with the control group.

The group that was treated with ED_{50} of *Andrographis paniculata* aqueous extract showed a significant increase ($P<0.01$) in the concentration of HDL, Albumin, GSH and Cytochrome P450 , while there was a significant decrease ($P<0.01$) in the concentration of TAG, LDL, VLDL, MDA, T-BIL and Urea. With no significant difference ($P<0.01$) in the concentrations of AST, ALP, ALT, TC, Uric acid, SOD, TNF-α and IL-6.

The group treated with ED_{50} of *Andrographis paniculata* aqueous extract showed a significant increase ($P<0.01$) in the concentration of HDL, Albumin and GSH , while there was a significant decrease ($P<0.01$) in the concentration of TAG, LDL, VLDL, MDA, T-BIL and Urea, With no significant difference ($P>0.01$) in the concentrations of AST, ALP, ALT,

TC, Uric acid, SOD, TNF-α, IL-6 and Cytochrome P450 compared with the control group.

The experiment also showed that oral administration of BHT with oral administration of ED_{50} of andrographis aqueous extract, caused significant increase in GSH and no significant differences ($P>0.01$) in the concentration of ALP, AST, ALT, TC, TAG, HDL, LDL, VLDL, MDA, SOD, T-BIL, Albumin, Urea, Uric acid, TNF-α, IL-6 and Cytochrome P450 compared with the control group.

The results of the Molecular gene expression of *CD44* gene showed significant increase in gene expression in the group treated with BHT when compared to the control group, while there was no significant increase in gene expression in the group treated with andrographis and BHT compared to the control group.

Histological examination showed that oral administration of BHT for months caused clear degenerative changes in the liver tissue with congestion in the central vein and infiltration of inflammatory cells around it, thickening, degeneration, rupture as well as hydrolysis of hepatocytes compared with the control group . In kidney tissue There was congestion and atrophy of the urinary glomerulus, in addition to increase in Bowman's capsule space and destruction of the urinary tubules with the shedding of the inner lining of the urinary tubules. In the spleen there was degenerative changes , congestion and increase in the red pulp compared with control group.

It is concluded from this study that BHT causes clear pathological effects on the liver, kidneys and spleen, and confirms that treatment with the half effective dose of aqueous extract of andrographis (100 mg/kg) has a protective role against damage caused by BHT in white male rabbits.

Republic of Iraq /Ministry of Higher Education and scientific Research

University of Kerbala- Collage of Education for pure sciences/ Department of Biology

Evaluation the Protective Efficiency of Aqueous Extract of *Andrographis paniculata* Leaves in Some Physiological , Histological and Molecular Parameters in White Male Rabbits Treated with Butylated Hydroxytoluene (BHT)

A thesis submitted to the council college of Education for pure science - Kerbala University as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biology – Zoology

BY

Zahraa Abed Alhussein Rahi Al Ibrahimi

B. Sc. Biology / 2016

Supervised by:

Assist Pro. Dr. Heba A. Abd-Alsalam Alsalame

Second supervisor:

Assist Pro. Dr. Zainab Nizar Jawad

September /2022 A.D **Rabi` Al-Awal / 1444 A.H.**