جامـــــــــــعة كـــــــــربلاء

كلية الـــعلوم

قســم علوم الحياة

دراسة نسجية مرضية وكيموحيوية للدور الوقائي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المورينغا ضد الاجهاد التأكسدي المستحث ببنزوات الصوديوم في ذكور الأرانب البيض .

رسالة

مقدمة الى مجلس كلية العلوم – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

لقاء عبد الكريم قاسم الخالدي

بأشراف

أ.م.د جاسم حنون هاشم العوادي

كانون الأول 2022 م جمادي الأول 1444 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ (١١)

صدق الله العلي العظيم

سورة المجادلة آية ١١

إقرار المشرف

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

التوقيع:

الاسم: د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ: 22/ 12/ 2022

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات أعلاه ، أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. خالد علي حسين

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: 22/ 12/ 2022

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة ، نشهد بأننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة نسجية مرضية وكيموحيوية للدور الوقائي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات المورينغا ضد الاجهاد التأكسدي الممتحث ببنزوات الصوديوم في ذكور الأرانب البيض)** وقد ناقشنا الطالبة (لقاء عبد الكريم قاسم) في محتوياتها وفيما له علاقة بهذا التاريخ 2023/4/5 ونرى بأنها جديرة لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة وبتقدير (أمتياز).

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:

الاسم: د. حسين جاسم عبيد

المرتبة العلمية: استاذ

مكان العمل: كلية العلوم/جامعة بابل

التاريخ: 17/ 6/ 2023

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: : د. علاء حسين مهدي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء

التاريخ: 17/ 6/ 2023

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. خالد علي حسين

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

مكان العمل: كلية العلوم/جامعة كربلاء

التاريخ: 17/ 6/ 2023

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:

الاسم: د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

مكان العمل: كلية العلوم/جامعة كربلاء

التاريخ: 17/ 6/ 2023

مصادقة عميد كلية العلوم/جامعة كربلاء

التوقيع:

الاسم: د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ: 9/ 8/ 2023

الإهداء

إلى.. من دعَتْ لي بالتوفيق وغمرتني بحنانها

الى.. من اعتادت على ندائي بلؤلؤة منذُ نعومة اظافري

الى.. من لم تستطع رؤية هذا اليوم وتوفتها المنية في منتصف بحثي، وكلي إيمان بأن روحها الطاهرة معي وترافقني في رحلتي لأنجاز هذا البحث العلمي .. امي الغالية -رحمك الله-

إلى.. من ساندني طوال مراحل حياتي ، وغاص معي في أعماق المحيط الهائج للأمساك باللؤلؤ ثم سار بي إلى الشاطئ حيث الأمان والاطمئنان . الى.. رفيق دربي في هذا العمل، أبي الحبيب ، أهديه هذا الجهد وهو ثمرة تعبه التي زرعها في الحياة .

إلى.. شقيقاتي العزيزات واشقائي الثمينين على قلبي ، الذين ساندوني في مسيرتي

إلى.. رفاق الحياة الداعمين لي بتشجيعهم في أوقاتي العصيبة والمساندين لي في لحظات هزيمتي وتعبي .

الباحثة: لقاء عبد الكريم قاسم

الشكر والتقدير

من بعد شكر الله على كرمة معي وتوفيقي بإنجاز هذه الرسالة، اتقدم بجزيل الشكر والتقدير الى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لاتاحتهم الفرصة لي لاكمال دراستي وكما اتقدم بالشكر والتقدير الى الأستاذ المساعد الدكتور جاسم حنون هاشم العوادي المحترم على توجهي علمياً وعملياً طوال مدة البحث ، اشكر امي العزيزة على دعواتها لي بالتوفيق ، أشكر والدي الحبيب لوقوفه بجانبي حتى اصل لهذه المرحلة المتقدمة

كل الشكر لرئيس قسم علوم الحياة د. خالد علي اليساري المحترم لتوجيهي في التحليل الاحصائي ، اشكر د. ابتسام عباس ناصر المحترمة على ملاحظاتها القيمة والرائعة

لاستاذي واخي الذي يكبرني خبرة استاذ (مصطفى حمود) المحترم لتوجيهاته لي ووقوفه بجانبي ومراقبة تقدمي بالبحث وكذلك

للدكتورة لمياء صالح مهدي لمساعدتها لي بقلب رحب في الاستخلاص ، لاساتيذ قسم الكيمياء استاذ هيثم فاضل وجلال جميل وعلي رحيم لدعمهم وتوجيههم لي في الاستخلاص

لعميد كلية الطب البيطري د. وفاق البازي المحترمة و د. علي وصفي و د. مصطفى علي لمراقبة ومتابعة الحيوانات صحياً ولمساعدتي في التشريح

للدكتور مؤيد نعيم كريم لكرمة وسعة صدرة في مساعدتي خلال التشريح وللدكتور أحمد اليساري لمساعدته في مدة التجربة، ولعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة وقسم علوم الحياة لمساعدة لي في تصوير المقاطع النسجية

كل الشكر والتقدير لمن ساهم بإكمال هذا العمل .

الباحثة: لقاء عبد الكريم قاسم

الملخص Summary :

هدف هذه الدراسة هو تحديد التأثيرات النسجية المرضية لبنزوات الصوديوم على الكبد والكلى والتأثيرات الكيموحيوية على مستوى إنزيمات الكبد مثل Alkaline phosphatase (ALP) و (AST) Aspartate aminotransferase و (ALT) Alanine aminotransferase ، ومستوى مضادات الأكسدة الانزيمية مثل Superoxide dismutase (SOD) و Catalase (CAT) و (GST) Glutathione S-transferase ، والوقاية بواسطة مستخلص أوراق (المورينغا أوليفيرا) ضد الإجهاد التأكسدي بفعل بنزوات الصوديوم ، إذ أجريت هذه الدراسة في البيت الحيواني لكلية الطب البيطري وللمدة من 2021/11/15 لغاية 2022/1/2 ، فقد تم استخدام (30) من ذكور الأرانب البيضاء النيوزلندية ، إذ قُسمت عشوائياً إلى ست مجاميع كل منها ضمت خمسة أرانب ، وهي: مجموعة السيطرة السالبة C1 جرعت ماء مقطر ومجموعة السيطرة الموجبة C2 التي جرعت بمستخلص أوراق نبات المورينغا (200 ملغم/كلغم) من وزن الجسم ، ومجموعة T1 المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم) ، ومجموعة T2 المعاملة بالتركيز الواطئ بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم) ، ومجموعة T3 المعاملة بمستخلص المورينغا (200ملغم/كلغم) والتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم)، ومجموعة T4المعاملة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) والتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم) إذ تم تجريع المجاميع فموياً يومياً ولمدة (30) يوماً.

بعد انتهاء التجربة وزنت الأرانب ، ثم سُحبت عينات الدم بواسطة طعنة القلب لغرض إجراء التحاليل الكيموحيوية ، وشُرحت الأرانب وأُستئصل الكبد والكلى لغرض التشخيص المرضي النسيجي، فأظهرت التغيرات الوزنية لجسم الارانب عدم وجود فروق معنوية لاوزانها قبل وبعد التجريع وكذلك لم تسجل نتائجنا أي فروق معنوية لأوزان الاعضاء (الكبد والكلى اليمنى والكلى اليسرى) بين كل مجاميع الارانب .

وأما بالنسبة للتأثيرات الكيموحيوية، فقد أظهرت نتائج فعالية انزيمات الكبد (ALP, AST) عدم وجود فروق معنوية بين كل مجاميع الارانب ، وسجل انزيم ALT فروق معنوية ($P < 0.05$) بين المجاميع ولوحظ وجود انخفاض معنوي فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة و بالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار(4.085 ± 9.486).

ولوحظ انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة وبالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار (11.06 ±5.921).

وسجل انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الارانب التي جرعت بالتركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة وبالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار (10.94 ±8.498).

وسجلت النتائج وجود انخفاض معنوي في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ثم عوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة وبالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم) بمقدار(7.915 ±5.422).

وأشارت نتائج التحليل الإحصائي لفعالية مضادات الاكسدة الانزيمية (SOD وGST) إلى وجود فروق ذات دلالة إحصائية ($P<0.05$) في المجاميع المعالجة . سجلت نتائجنا انخفاضاً معنوياً في فعالية انزيم SOD لمجموعة الارانب المعاملة بمستخلص أوراق المورينغا (200ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيزالواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار (0.119 ± 0.447) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة .

وقد سجلت النتائج عدم وجود فروق معنوية في فعالية مضاد الاكسدة CAT ، وسجلت النتائج أيضاً ارتفاعاً معنوياً في فعالية انزيم GST لمجموعة الأرانب المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار (0.1003±0.602) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة، ولوحظ أنخفاضاً معنوياً في فعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب المعاملة بالتركيز الوطيء من بنزوات الصوديوم (250ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار(0.097±0.187) بالمقارنة مع مجموعة الأرانب المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم ، وفي الأرانب المعاملة بمستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار (0. 084 ± 0.242) بالمقارنة مع مجموعة الأرانب المعاملة بالتركيز العالي،

وفي مجموعة الأرانب المعاملة بمستخلص أوراق المورينغا اوليفيرا (200ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيزالعالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار (0.169±0.185) بالمقارنة مع مجموعة الأرانب المعاملة بالتركيز العالي ، وفي مجموعة الأرانب المعاملة بمستخلص أوراق المورينغا اوليفيرا (200ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيزالواطىء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بمقدار (0.099±0.209) بالمقارنة مع مجموعة الأرانب المعاملة بالتركيز العالي .

وأظهرت تغيرات نسيجية للمجاميع المعاملة ببنزوات الصويوم (500 أو 250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) في أنسجة الكبد متمثلة بإحتقان دموي في الوريد المركزي ، وتدمير التركيب الشعاعي للخلايا الكبدية المرتبة حول الوريد المركزي وكثرة ارتشاح خلايا كوبفر ، ووجود عدد من الخلايا الميته ، وتنكس دهني متمثل بتراكم الدهون. في حين أظهرت أنسجة الكلى انكماش الكبيبة الكلوية، وزيادة فراغ بومان، وكثرة الخلايا الالتهابية، وتوسع في النبيبات البولية ، وتنخر في الخلايا المبطنه للنبيبات البولية فضلاً عن تراكم الدهون .

بينما أظهرت التغيرات النسيجية للمجاميع المعاملة بمستخلص أوراق المورينغا اوليفيرا (200ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم تراكيز من بنزوات الصوديوم (500 أو 250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) في أنسجة الكبد عن المظهر الطبيعي لنسيج الكبد ، وقلة ارتشاح خلايا كوبفر، ووجود عدد ضئيل من الخلايا الدهنية الزيتية microstatiosis ، وانتظام الخلايا الكبدية بشكل حبال حول الوريد المركزي لفصيص الكبد مع ظهور تحسن في نسيج الكبد، وربما يُعزى ذلك للتأثير الوقائي لمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا . بينما أظهرت أنسجة الكلى مظهراً طبيعياً نوعاً ما للكبيبات الكلوية، وتوسع بسيط في بعض النبيبات البولية مع ارتشاح بسيط لبعض الخلايا الالتهابية ، وتنخر في الخلايا المبطنه للنبيبات البولية، مع تحسن جزئي لنسيج الكلية وربما يعود السبب لأستعمال مستخلص أوراق المورينغا.

وأظهر لب الكلية النبيبات البولية طبيعية مع وجود قليل لبعض الخلايا الالتهابية بين النبيبات البولية فضلاً عن وجود Hyaline cast وارتشاح وتراكم المواد البروتينية في النبيبات البولية لبعض الأرانب ووجود عدد قليل من الخلايا الدهنية.

ويمكن أن نستنتج من خلال نتائج دراستنا إنّ مستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا أدى إلى تقليل الأثار السلبية لبنزوات الصوديوم على مستوى المعايير الكيموحيوية في الدم والبنية النسيجية المرضية للكبد والكلى للأرانب التي عوملت ببنزوات الصوديوم .

قائمة المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
1	**الفصل الاول (المقدمة)**	1
2	**الفصل الثاني (استعراض المراجع)**	5
1-2	المضافات الغذائية	5
2-2	المواد الحافظة	5
3-2	بنزوات الصوديوم	6
4-2	أيض البنزوات	8
5-2	ضرر بنزوات الصوديوم	10
1-5-2	تأثير بنزوات الصوديوم على الإجهاد التأكسدي والالتهاب	11
2-5-2	تأثير بنزوات الصوديوم على وظائف الكبد والكلى	13
3-5-2	تأثيربنزوات الصوديوم على الدم	15
6-2	بنزوات الصوديوم وفيتامين سي	15
7-2	حامض البنزويك وبنزوات الصوديوم كمؤكسدات	16
8-2	الإجهاد الكيميائي	17
9-2	الإجهاد التأكسدي	17
1- 9-2	بيروكسدة الدهون	19
10-2	مضادات الأكسدة	19
1-10-2	الكلوتاثيون	20
2-10-2	الكلوتاثيون – أس - ترانسفيرايز	21
11-2	وصف نبات المورينغا أوليفيرا	24
12-2	التصنيف	25
13-2	أهمية المورينغا	26

1-13-2	الأهمية الغذائية	26
2-13-2	الأستعمالات الطبية	27
14-2	المواد الفعالة في أوراق المورينغا	29
1-14-2	الستيرولات النباتية	29
2-14-2	الأحماض الدهنية	30
3-14-2	الفيتامينات	30
4-14-2	الفلافونويدات	31
3	**الفصل الثالث (المواد وطرائق العمل)**	32
1-3	المواد والأجهزة المستعملة	32
1-1-3	الادوات والمعدات	32
2- 1-3	المواد الكيميائية	33
2-3	طرائق العمل	34
1-2-3	حيوانات التجربة	34
2-2-3	مجاميع الحيوانات	35
3-2-3	وزن حيوانات التجربة	37
4-2-3	تحضير بنزوات الصوديوم	37
5-2-3	تحضير مستخلص أوراق نبات المورينغا	37
1-5-2-3	الأستخلاص الكحولي بمساعدة موجات فوق صوتية	37
2-5-2-3	الاستخلاص الكحولي بأستخدام جهاز السوكسليت	38
6-2-3	جمع عينات الدم	39
7-2-3	تشريح الحيوانات	40
8-2-3	تحضير المقاطع النسيجية	41

9-2-3	فحص وتصوير المقاطع النسجية	44
10-2-3	الفحوصات الكيموحيوية	44
1-10-2-3	معايرة مؤشرات السمية الكبدية	44
	1. تقدير فعالية الـ ALT	44
	2. تقدير فعالية الـ AST	45
	3.تقدير فعالية الـ ALP	47
2-10-2-3	تقدير نشاط إنزيمات الإجهاد التأكسدي	49
	1. تقديرفعالية انزيم سوبر أكسيد ديسموتاز(SOD)	49
	2. تقديرفعالية انزيم الكاتليز (CAT)	50
	3. تقديرفعالية الكلوتاثيون -S -ترانسفيراز (GST)	51
11-2-3	التحليل الإحصائي	51
4	**الفصل الرابع (النتائج والمناقشة)**	52
1-4	التغيرات الوزنية	52
1-1-4	التغير في وزن الجسم	52
2-1-4	التغير في وزن الأعضاء (الاكباد والكلى)	53
2-4	المعايير الكيموحيوية	55
1-2-4	انزيمات الكبد	55
2-2-4	مضادات الأكسدة الانزيمية	60
3-4	التغيرات النسجية المرضية	68
1-3-4	التغيرات في نسيج الكبد	68
2-3-4	التغيرات في نسيج الكلى	79

	الاستنتاجات	91
	التوصيات	92
	المصادر والمراجع	93

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
(1-2)	يوضح تفاعلات الاقتران لحامض البنزويك	9
(2-2)	مسار تفاعل بنزوات الصوديوم مع حمض الأسكوربيك	16
(3-2)	نظرة عامة على التحول الحيوي الأنزيمي	24
(4-2)	شجرة وأوراق وبذور نبات المورينغا أولفيرا	26
(1-3)	مجموعة من الأرانب المعده للتجربة في البيت الحيواني	34
(2-3)	تصميم التجربة	36
(3-3)	ترشيح مستخلص اوراق المورينغا	38
(4-3)	جهاز السكسوليت	39
(5-3)	جمع عينات الدم بواسطة طعنة القلب	40
(6-3)	تشريح ارنب واستئصال كل من الكبد والكلى	40
(7-3)	مخطط يوضح خطوات التقطيع النسيجي للأعضاء	43
(1-4)	وزن الجسم الكلي قبل وبعد التجريع لمجاميع الارانب المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M)	52
(2-4)	أوزان الاعضاء (الاكباد والكلى اليمنى واليسرى) لمجاميع الارانب المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M)	54

(3-4)	معدل فعالية انزيم AST و ALT وALP في مصل الأرانب للمجاميع المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M)	57
(4-4)	معدل فعالية SOD وGST في الدم لمجاميع الأرانب المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M)	62
(5-4)	معدل فعالية CAT في الدم لمجاميع الأرانب المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB)و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M)	62
(6-4)	مقطع مستعرض في كبد أرانب مجموعة السيطرة السالبة .	70
(7-4)	مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم)	70
(8-4)	مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500ملغم/كلغم/وزن الجسم)	71
(9-4)	مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم)	71
(10-4)	مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم)	72
(11-4)	مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم)	72
(12-4)	مقطع مستعرض في كلى أرانب مجموعة السيطرة السالبة	81
(13-4)	مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بالمورينغا (200 ملغم/كلغم)	81
(14-4)	مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم)	82
(15-4)	مقطع مستعرض في لب كلية أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم)	83

(16-4)	مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم)	83
(17-4)	مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم)	84

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
(1-2)	الصفات الكيميائية والفيزيائية لبنزوات الصوديوم	7
(1-3)	الادوات والمعدات والشركات المصنعة لها	32
(2-3)	المواد الكيميائية و المحاليل والشركات المصنعة لها	33
(1-4)	تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على أوزان الأرانب (كغم) قبل وبعد التجريع	52
(2-4)	تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على أوزان اعضاء الأرانب (الكبد والكليةاليمنى واليسرى) (غم)	53
(3-4)	تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على لفعالية انزيمات الكبد .	56
(4-4)	تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على فعالية مضادات الأكسدة الإنزيمية .	61

قائمة الاختصارات

الاختصار	المعنى
ADI	Acceptable Daily Intake
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
CAM	Cell adhesion molecules
CAT	Catalase
COX2	Cyclooxygenase2
EFSA	European Food Safety Authority
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ETS	Electron transport system
FDA	Food and Drug Administration
Gly	Glycine
GPX	Glutathione peroxidase
GRD	Glutathione reductase
GSH	Reduced glutathione
GSSG	Glutathione disulfide
GST	Glutathione S-transferase
IL	Interleukin
JECFA	Joint Expert Committe on Food Additives

LPO	Lipid peroxidation
M	Moringa
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
MDA	Malondialdehyde
MHC	Major histocompatibility complex
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PI3K	Phosphoinoside 3-kinase
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SB	Sodium Benzoate
SOD	Superoxide dismutase
TGF-β1	Transforming growth factor -β1
TNF	Tumor necrosis factor
Trx	Thioredoxin
WHO	World Health Organization

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

1- المقدمة Introduction :

إنَ الاستعمال الزائد للمضافات الغذائية في مختلف المنتجات مثل الأسماك والألبان والاجبان ومنتجات اللحوم المحفوظة والعصائر والمثلجات و الحلويات والمربى وغيرها يؤدي إلى ازدياد الاختلاف من ناحية مخاطرها وتأثيراتها، إذ إنَ مركز مكافحة الأمراض في الولايات المتحدة قام بتسجيل 67 مليون حالة من الأمراض المنتقلة بالأغذية والتي أدتَ لحدوث 5000 حالة وفاة خلال عام واحد فقط . ومن هنا قامت هيأة الغذاء والدواء الأمريكية Food and Drug Administration (FDA) بوضع شروط صارمة للموافقة على المضافات الغذائية والمكونات المصنعة (Mister and Hatrcock، 2012).

وبسبب التقدم الصناعي في السنوات الأخيرة ، وازدياد عدد المستهلكين الذين أبدو اهتمامهم بسمات الطعام مثل الإحساس والصحة ، وقبل كل شيء السلامة (Cegiełka, 2020)، أصبحت بنزوات الصوديوم أول مادة حافظة للأغذية الاصطناعية مسموح بها في تحضير الطعام بالولايات المتحدة في عام 1908 ولا تزال موجودة في العديد من الأطعمة (Lennerz *et al*., 2015).

نتيجة للتخوف من الآثارالضارة للمواد الكيميائية المضافة إلى الغذاء ، ومن أجل تحسين مذاقه ومظهره أو إطالة مدة صلاحيته ، واختيار الأقل معالجة أصبحت المنتجات التي لا تحتوي على مواد مضافة ، بما في ذلك المواد الحافظة الأكثر شعبية ،ولهذا يعد بنزوات الصوديوم Sodium Benzoate (SB) وهو ملح حامض البنزويك ويمتاز بإنه قابل للذوبان في الماء ، لا طعم له ، وعديم الرائحة ، بسبب امتلاكه خصائص مضاده للفطريات ومضادة للبكتيريا ، فقد تميز بوصفه مادةً حافظةً تضاف إلى الطعام بجرعات محددة بدقة، وهو يمنع نمو البكتيريا والخميرة والعفن (Davidson *et al*.,2021).

تستعمل بنزوات الصوديوم في المشروبات الغازية ، والعصائر ، والسمن المملح ، والزيتون ، والصلصات ، والمذاقات ، والهلام ، والمربى ، والمعلبات ، وحشوات الفطائر والمعجنات ، وتتبيلة السلطة قليلة الدسم ، وسلطات الفاكهة ، والسلطات المحضرة ، وفي تخزين الخضار(Kregiel, 2015).

تمت الموافقة على المادة الحافظة الغذائية (بنزوات الصوديوم) من قِبل إدارة الغذاء والدواء (FDA). والحد الجائز من استهلاكه هو(5 ملغم/كغم) من وزن الجسم وفقًا لإدارة الغذاء والدواء الأمريكية (CFR, 2021).

يوجد بنزوات الصوديوم في القرفة في شكلة الطبيعي ، فضلاً عن وجوده في الفطر والتوت البري والقرنفل. لذلك يتم تصنيف بنزوات الصوديوم كمركب بملف تعريف أمان واسع،وقد تمت الموافقة عليه أيضًا للاستعمال العلاجي في شكل عقارين: Ammonul / Ucephan و Buphenyl حسب ماذكر في (Buphenyl, 2022 ; Ammonul, 2022).

وافقت لجنة الأغذية المشتركة بين منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية للمواد المضافة Joint Expert Committee on food Additives (JECFA) على جرعة مناسبة من (5 ملغم/كلغم) من بنزوات الصوديوم يوميًا (Yadav *et al*. 2016). في حين سمحت إدارة الغذاء والدواء بـ(300 ملغم/كلغم/وزن الجسم) من بنزوات الصوديوم على الرغم من جرعة المدخول اليومية صغيرة من بنزوات الصوديوم ، قد يكون تناوله المستمر على المدى الطويل ضاراً للمستخدمين. إذ ثبت أن بنزوات الصوديوم مطفرة للغاية عندما عولجت خلايا الدم البشرية بجرعات متراوحه بين (6.25 - 100 ملغم/مل) من بنزوات الصوديوم (Zengin *et al*., 2011).

وتمثل أمراض الكلى أخطر الأمراض المزمنة والأكثر انتشاراً في مختلف انحاء العالم (Bijlani ،2004) إذ يساهم تطور هذه الأمراض إلى فقدان الكلية قدرتها على أداء وظيفتها الحيوية (National Kidney Foundation , 2002)، وتعد السمية الكلوية الناتجة عن المواد الحافظة الكيميائية (بنزوات الصوديوم) سبباً رئيساً في الإصابة الحادة للكلية والتي قد تكون ناتجة عن تغير في الدورة الدموية داخل الكبيبة و الالتهاب و اعتلال الأوعية الدقيقة و تسمم الخلايا الأنبوبية (Shahmohammadi *et al*., 2016 ; Mohammed, 2018).

وتعد المواد الفعالة الموجودة في النباتات الطبية غير سامة وإن كانت سامة فسميتها منخفضة عند مقارنتها مع الأدوية، والمواد الفعالة تمثل المواد الكيميائية الناتجة من عمليات أيض النباتات وتساهم في علاج العديد من الأمراض ولهذا ازداد استعمال النباتات في صناعة الأدوية في جميع أنحاء العالم. (Padmavathy and Devarajan, 2017)

تساهم النباتات الطبية في الوقاية من أمراض الكلية (Azab *et al*., 2019) فهي تساهم بشكل كبير في الوقاية ،وذلك لاحتوائها على مضادات الأكسدة (Parthasarathy *et al*, 2008) . إذ تحتوي المورينغا مضادات اكسدة من نوع مضادات الأكسدة اللانزيمية مثل الفلافونيدات والفينولات والستيرولات النباتية

والتربينويدات والبوليفينولات والجلوكوزينات التي تدخل في خفض سكر وكوليسترول الدم والوقاية من الأمراض القلبية وتصلبات الشرايين وارتفاع ضغط الدم (Martins *et al*., 2016; Lin *et al*., 2018;)

يستعمل الجسم للوقاية من الاجهاد التأكسدي مجموعة من مضادات الأكسدة الأنزيمية (SOD) Superoxide dismutase، Catalase (CAT)، Glutathione peroxidase (Gpx) ومضادات الاكسدة اللانزيمية مثل الفيتامينات ، الفينولات والفلافونيدات التي توجد بكثرة في النباتات (Gabriele *et al*.,2017) .

تمتاز المورينغا لوصفها شجرة ذات استعمالات عديدة إذ تستعمل في المجالات الغذائية والعلاجية والصناعية وهي ذات أهمية اقتصادية كبيرة لكون أوراقها تعتبر مادة غذائية لاحتوائها على نسب عالية من البروتينات والأحماض الأمينية والكاربوهيدرات والمعادن مثل المغنسيوم والكالسيوم والبوتاسيوم والزنك والحديد والفسفور، وبذلك يمكن أن تستعمل للوقاية من أمراض التغذية مثل سوء التغذية بشكل خاص للأمهات الحوامل والمرضعات والرضع (Nalamwar *et al*., 2017).

2. هدف الدراسة Aim of Study:

تهدف هذه الدراسة الحالية الى معرفة تأثير بنزوات الصوديوم التي تستعمل على نطاق واسع كمادة حافظه للعديد من المواد الغذائية التي نتناولها يومياً ، ودور مستخلص أوراق نبات المورينغا اوليفيرا في علاج الآثار التي قد تسببها بنزوات الصوديوم ويمكن تحقيق هدف الدراسة من خلال ما يأتي:

1. دراسة التغيرات الوزنية لجسم الأرانب وأعضائها (الكبد والكلية اليمنى اليسرى) .

2. دراسة التغيرات الكيموحيوية والتي تشمل:

أ . انزيمات الكبد مثل Alkaline phosphatase (ALP) و Aspartate aminotransferase (AST) و Alanine aminotransferase (ALT) .

ب. مضادات الأكسدة الإنزيمية مثل Superoxide dismutase (SOD) و Catalase (CAT) و Glutathione S-transferase (GST) .

3. دراسة التغيرات النسجية لكل من الكبد والكلية .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

2- إستعراض المراجع Literatures Review

(2-1) المضافات الغذائية Food Additives :

تم تعريف المضافات الغذائية على أنها أي مادة عديمة القيمة الغذائية والتي يتم إضافتها للأغذية لغرض حفظها من التلف وتحسين صفاتها الفيزيائية كالطعم والرائحة واللون والقوام وتسهيل طهي وإعداد الأغذية وجذب اكثر عدد من المستهلكين، فالمضافات الغذائية عديدة وتتضمن مواد تمنع التلف والفساد الحيوي والكيميائي للأغذية تسمى المواد الحافظة Preservatives ، ومنها مواد تعطي لون للغذاء ، أو تحسن تركيب ومظهر الغذاء تسمى الملونات Colors ، أو يتم إضافتها لغرض إضفاء نكهة معينة للغذاء وتسمى المنكهات Flavors . وقد جرى خلال عام 2010 اتفاق بين هيأة سلامة الأغذية الأوربية European Food Safety Authority (EFSA)ومنظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO)لأجل انشاء برنامج لتقييم المضافات الغذائية وإضافة أرقام خاصة تُسبق بحرف E وهو يمثل كلمة Europe ، وبينت الحد المسموح به لاستهلاك هذه المضافات خلال اليوم الواحد (Pundir and Rawal,2013 ;Carocho *et al*., 2014).

لقد تحولت المضافات الغذائية إلى مادة لا غنى عنها للغاية لفعاليتها في الهندسة الغذائية مع زيادة الطلب من السلع المكررة (Saad *et al*., 2005). ويتم اختيار المضافات الغذائية بشكل أساس لغرض الحفظ والتلوين، إذ إنَ معظم المضافات الغذائية (المواد الحافظة والصبغات الملونه) تُظهر Genotoxicityالسمية الجينية (Khan *et al*., 2020).

(2-2) المواد الحافظة Preservatives :

المواد الغذائية هي مواد عضوية ذات اصل حيواني ونباتي وتحتوي على الكاربوهيدرات والبروتين والدهون ومعادن ومواد عضويه اخرى وتخضع هذه الأغذية للتلف بسبب تاثير العوامل الجرثومية ، والكيميائية والفيزيائية وبالتالي فإنَ القيمة الغذائية والملمس واللون عرضة للتلف وإذ إنَ الهدف من استعمال المواد الحافظة هو زياده مدة صلاحيتها مع الاحتفاظ بالقيم الغذائية الاصلية(Amit *et al*., 2017) .

المواد الحافظة هي مواد قادرة على منع أو تأخير التغيرات في الغذاء بسبب الانزيمات المفرزة بواسطة الأحياء المجهرية أو بسبب العوامل الفيزيائية ، فالمواد الحافظة مثل السكر والملح تكون فعَالة لحفظ الطعام لمدة طويلة (Linke *et al* ., 2017) ، ومن المواد الحافظة هي النتريت ، وثاني اوكسيد الكبريت ،

وبنزوات الصوديوم ، ونترات الصوديوم والبوتاسيوم ، وحامض البروبيونيك ، وحامض السوربيك . (Lennerz *et al* ., 2015)

(3-2) بنزوات الصوديوم Sodium benzoate :

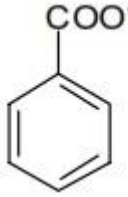
بنزوات الصوديوم Sodium benzoate (SB) هي من المواد الحافظة والتي تُمثل املاح الصوديوم لحامض البنزويك ، وهو واسع الاستعمال كمادة حافظه للاغذية ، وكمادة مضادة للبكتريا للمحافظة على العديد من المنتجات الغذائية مثل العصائر ، والصوصج ، والسلطات، وكذلك لحفظ مواد التجميل والشامبو وغيرها (Noorafshan *et al*., 2014) .

فحامض البنزويك يمنع أو يثبط نمو الاحياء المجهرية في الغذاء ، أي إنَ حامض البنزويك أو احد املاحه تعرف كمواد حافظة وتعمل من خلال تثبيط دورة حمض الستريك للاحياء المجهرية (Rabiu *et al* .,2021).

ويرمز لبنزوات الصوديوم ب (E211) وهي مادة مضافة للغذاء معروفة بأسم بنزوات الصودا ، مع الصيغة الكيميائية C7H5O2Na والوزن الجزيئي 144.11 غرام/مول ، وهو مركب عديم الرائحة وقابل للذوبان في الايثانول والماء كما مبين في الجدول (2-1) الذي يوضح الصفات الكيميائية والفيزيائية لبنزوات الصوديوم.

تستعمل بنزوات الصوديوم على نطاق واسع نظراً لقدرتها على قتل غالبية الفطريات والبكتيريا والخمائر بشكل فعال ، ويتم إضافة المواد الحافظة لمنع التعديلات الميكروبيولوجية أو الأنزيمية في الأطعمة ، وتأخير فقدان العناصر الغذائية وزيادة العمر الافتراضي للطعام .(Lennerz *et al*., 2015).

إن استعمال بنزوات الصوديوم في المنتجات الغذائية والصيدلانية معروفة على نطاق واسع بأنها آمنة وفقًا لإدارة الغذاء والدواء (Nair, 2001) ، ولكن قد تم الاشارة الى الآثار السلبية التي قد تنشأ على المدى الطويل أو القصير(Fujitani, 1993) .

اسم المركب	بنزوات الصوديوم
الأسماء الأخرى	ملح الصوديوم لحامض البنزويك Benzoic acid sodium Salt
الصيغة الكيميائية Chemical formula	C7H5O2Na
التركيب الكيميائي Chemical structure	
المظهر	حبيبات بيضاء صلبة
الوزن الجزيئي	144.11
درجة الأنجماد	- 330.6 C
درجة الغليان	330 C
الذوبان في الماء	550-630 g/L
الذوبانية	يذوب في الايثانول ، الميثانول و الاثيلين كلايكول
رمز المادة كمضاف غذائي لدى الاتحاد الأوربي	E211

الجدول (2- 1): الصفات الكيميائية والفيزيائية لبنزوات الصوديوم (Davidson *et al.*,2005)

وفي عام 1997 تم تسجيل الإنتاج العالمي من بنزوات الصوديوم حوالي 55000 - 60000 طن. نظراً لانخفاض سميته يستعمل بنزوات الصوديوم في مجموعة متنوعة من المنتجات التي نستعملها بشكل يومي مثل المشروبات والعصائر والصلصات والزيوت والكاتشب ومعاجين الأسنان وغسول الفم ومستحضرات التجميل والمنتجات الصيدلانية (Williams and Lock 2005) .

بحسب ماجاء في دراسة Zhang و Ma عام (2013) فإنَ (0.05 غرام/ 100 مل) تمثل الحد الاقصى من بنزوات الصوديوم كمادة حافظة . بينما جرعة من 8 – 10 غرام فيمكنها ان تسبب الغثيان والقيء ، أما الجرعات الصغيرة فتكون ذات تاثير معدوم أو قليل (Nair ., 2001).

بنزوات الصوديوم هي مادة كيميائية غير سامة ويتم استرجاعها من الخلايا ، بشكل أساس عن طريق اقتران الجلايسين وحمض الجلوكورونيك(Bridges *et al.*, 1970) ، ويتم امتصاص بنزوات الصوديوم

بسرعة في حيوانات المختبر أو البشر من الجهاز الهضمي بعد الامتصاص الفموي أو الجلدي ، ويتم تقويضه في الأنسجة الكبدية من خلال الاقتران مع الجلايسين من الأحماض الأمينية ، وينتهي بإنتاج حمض الهيبوريك (Feillet and Leonard 1998) .

إنَ عدم التوازن بين الإجهاد التأكسدي ومضادات الأكسدة، يؤدي الى تلف شديد في الأنسجة والذي يؤدي في النهاية إلى زيادة من تركيز بعض الإنزيمات البيوكيميائية الرئيسة والسيتوكينات الالتهابية (Arranz *et al*. 2004).

على وفق ماأثبت Dong وجماعته (1998) بأن السيتوكينات هي بروتينات سكرية تنظيمية ذات جزيئات منخفضة الوزن مضادة لبعض المواد الكيميائية السامة ، إذ يتم إطلاق السيتوكينات المؤيدة للالتهابات مثل الإنترفيرون جاما (IFN- γ) ، إنترلوكين -1 بيتا (IL-1β) ، عامل نخر الورم ألفا (TNF- α) وإنترلوكين 6 (IL-6).

وتنظم هذه البروتينات الالتهابية كلاً من البروتينات غير النوعية واستجابات مناعية محددة(Paunel-Gorgulu *et al*. 2012). حسب دراسة Ma وجماعتهِ (2014) بأنه يعزز الإجهاد التأكسدي وينشط التعبير عن العديد من البروتينات الالتهابية مثل IL-1β و IL-6 وTNF- α و COX-2 .

وبحسب دراسة Raposa وجماعتهِ (2016) فإنّ أنواعاً كثيرة من المضافات الغذائية مثل بنزوات الصوديوم ، وكارمويسين ، وسوربات البوتاسيوم وتارترازين سوف تؤدي الى زيادة التعبير عن منظم الالتهاب NF-jB .

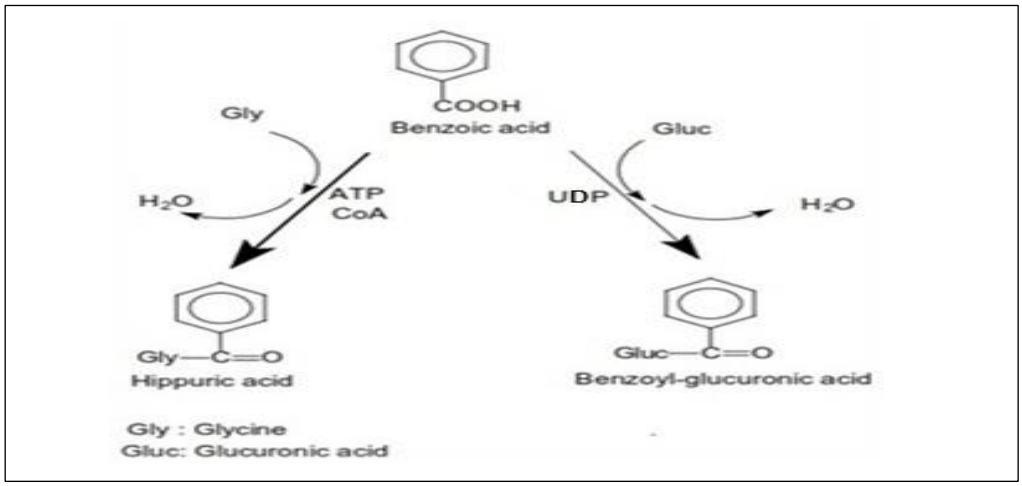
لقد أُجريت دراسات على تاثير المواد الحافظة على الكبد والكلى في الحيوانات لاهمية وخطورة الاستعمال الكثير للمواد الحافظة ، ومن بين تلك الدراسات الدراسة التي اجريت بواسطة Khodaei وجماعته (2019) ، إذ بينت الدراسة أن بنزوات الصوديوم تُسبب تلف الكلى أكثر من تلف الكبد ، ولكن عندما تستهلك المواد الحافظة لمدة طويلة من العمر ، قد تكون سبباً في تلف الكبد ايضاً.

(4-2) :أيض البنزوات Benzoate Metabolism

يحدث امتصاص كامل وسريع لحامض البنزويك وبنزوات الصوديوم في القناة المعدية المعوية بعد التناول فموياً في الإنسان و الحيوانات مثل الكلاب و الجرذان (Elsa and Miljøstyrelsen,2000) ، خلال 1-2 ساعة في الإنسان تصل الى أعلى تركيز لها في البلازما (Kubota and Ishizaki,1999) ،

وتتغير البنزوات الناتجة من بنزوات الصوديوم من الشكل الأيوني إلى جزيئة حامض البنزويك غير المتفككه نتيجـة الاوضـاع الحامضـية للمعـدة ، وبالتـالي تصـبح سـريعة الامتصـاص ويمكـن تقـدير الأيـض وتـأثيرات بنزوات الصوديوم وحامض البنزويك معا (Elsa and Miljøstyrelsen,2000).

وبحسب الشكل(2-1) يتم التخلص من كل من حامض البنزويك وبنزوات الصوديوم من الجسم بشكل رئيسـي بواسـطة الأقتـران مـع الحـامض الامينـي الكلايسـين فـي الكبـد والكلـى لينـتج حـامض الهيبوريـك Hippuric acid ، ويدعى أيضاً Benzoyl glycine والذي يتم طرحه بواسطة البول ، فضلاً عن امكانية اِقتران حامض البنزويك وبنزوات الصوديوم مع حامض الكلوكورونيك Glucuronic acid ليكون مركب يدعى Benzoyl- glucuronic acid والذي أيضاً يُطرح مع البول ايضاً(Piper, 1999;Carins,2012).



شكل (2-1) يوضح تفاعلات الاقتران لحامض البنزويك (Carins,2012)

في حيوانات التجارب والإنسان تقترن جزيئة حامض البنزويك مع الكلايسين ، أو حامض الكلوكورونيك في الكبد. في حين في الكلاب فتمثل الكلية هي موقع الاقتران الرئيسي ، بينما كلا العضوين يشتركان في الفعالية نفسها في الهامستر. وفي آكلات اللحوم فيحدث إنتاج لحامض الهيبوريك بكفاءة أكثر في الكلى مقارنة بالكبد (Hutt and Caldwell,1990).

ومن خلال عملية اقتران حامض البنزويك التي تحدث في حشوة المايتوكوندريا يتم استعمال حامض البنزويك كمادة أساس مع وجود مواد مساعدة هي الكلايسين، CoA و ATP ، وفضلاً عن اثنين من الأنزيمات هي Acyl-CoA synthetase وGlycine N- acyl transferase التي تملك فعاليـة عاليـة في الكبد والكلى، وإنَ الحجم الكبير للكبد يجعله الموقع الرئيسي لأقتران الكلايسين، وتتضمن عملية الاقتران

مرحلتين : الأولى هي تنشيط حامض البنزويك لينتج Benzoyl - CoA أما المرحلة الثانية فتشمل نقله إلى الحامض الأميني الكلايسين (Tremblay and Qureshi,1993; Sardesai,2011).

$$\text{Benzoic acid} + \text{ATP} + \text{CoA} \longrightarrow \text{benzoyl-CoA} + \text{AMP} + \text{PP} \quad (1)$$

$$\text{Benzoyl-CoA} + \text{glycine} \longrightarrow \text{benzoylglycine} + \text{CoA} \quad (2)$$

ويتم تحديد مدى التحمل لحامض البنزويك و بنزوات الصوديوم على وفق عوامل عديدة تشمل كمية هذه المواد ، معدل سرعة لتفاعلات الاقتران وعملية الطرح وكمية تركيز الكلايسين المتوفرة، وذلك لأن الكلايسين يعد المسؤول عن انتاج حامض الهيبوريك ، وبالتالي يحدث إنخفاض في كمية الكلايسين في الجسم، لهذا يؤثر تناول حامض البنزويك أو بنزوات الصوديوم في أي وظيفة جسمية أو أيضية يشارك فيها الكلايسين مؤدياً على سبيل المثال إلى الاختزال في مستويات حامض اليوريك (Kubota and Ishizaki,1991; JECFA,1996) والكلوتامين (Struzynska and Sulkowski,2004) .

وقد أشارت دراسة Thabrew وجماعته (1980) إلى إنَ الحقن اليومي للجرذان ببنزوات الصوديوم (4.2 ملي مول/ كلغم) ومع عدم إعطاؤها غذاء حاوي على الحامض الاميني الكلايسين ساهم بإنخفاض عملية إنتاج حامض الهيبوريك، وفي الأرانب المعاملة ببنزوات الصوديوم بتركيز 1700 ملغم مع إعطاؤها الكلايسين كان هناك ارتفاع ملحوظ في بناء وطرح حامض الهيبوريك. وعلى خلاف ذلك فإن زيادة جرعة حامض البنزويك في الخراف بالرغم من إعطاؤها الكلايسين أدىَ إلى إنخفاض في تفاعل الاقتران (Gregus *et al*.,1998).

(5-2) : ضرر بنزوات الصوديوم The Harmfulness of Sodium Benzoate

يُعتقد أنه يمكن تحويل البنزوات عن طريق نزع الكربوكسيل إلى بنزين سام ، ولاسيما مع فيتامين C ، ثم يصبح مركباً عالٍ باحداث السمية والطفرات والتشوهات الخُلقية (Piper and Piper, 2017).

و ثبتت دراسة Zengin وجماعته (2011) بإن بنزوات الصوديوم يزيد من تلف الحامض النووي في الخلايا اللمفاوية البشرية lymphocytes في المختبر، ولم يؤثر المركب على معدل التضاعف rate of replication ، ولكنه قلل من معدل الانقسام mitotic rate .

كما تم إظهار التأثيرات المطفرة والسمية الجينية Genotoxicity في حالة الدراسة على الخلايا الليمفاوية البشرية، وتسبب هذا المركب في تكوين النواة الدقيقة وكسر الكروموسوم، فضلاً عن ذلك ، تم

أظهار أن بنزوات الصوديوم تولد الإجهاد التأكسدي ولها تأثير سلبي على جهاز المناعة والكبد والكلى والخصوبة (Pongsavee, 2015).

تعد بنزوات الصوديوم غير ضارة فقط عندما تستهلك بكميات صغيرة حيث يمكنها أن تُسبب ردود فعل تحسسية أو تساهم في تفاقم أعراض مرض الربو عن الأسبرين (مع فرط الحساسية للأسبرين وغيره من أدوية مضادات الالتهاب غير الستيرويدية) (Settipane, 1983 ; Balatsinou *et al*., 2004).

(1-5-2) : تأثير بنزوات الصوديوم على الإجهاد التأكسدي والالتهاب The Effect of Sodium Benzoate on the Oxidative Stress and Inflammation

يلعب الإجهاد التأكسدي ، وكذلك العملية الالتهابية ، دوراً مهماً في الآليات المرضية للعديد من الأمراض، ويرتبط الإجهاد التأكسدي بإختلال التوازن بين إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية reactive oxygen species (ROS) وكمية مضادات الأكسدة أو الكاسحات الجذرية (Chatterjee, 2016) .

ويؤدي فائض الجذور الحرة للأوكسجين إلى تنشيط الجينات المسببة للالتهابات ، والتي تؤدي بدورها إلى تحفيز البروتينات وجزيئات التصاق الخلايا cell adhesion molecules (CAM) وبروتين الجذب الكيميائي أحادي الخلية monocyte chemoattractant protein (MCP-1) وعامل نخر الورم tumor necrosis (TNF-α) والإنترلوكين 1- (IL) وتحويل عامل النمو (TGF-β). قد يؤثر ROS أيضًا على tyrosine kinases التي تشمل Src، Ras، phosphoinoside 3-kinase (PI3K) ، مستقبل عامل نمو البشرة (EGFR) ، كيناز البروتين المنشط بالميتوجين mitogen-activated protein kinase (MAPK) عن طريق تحفيز العمليات الالتهابية وآليات الشيخوخة ومن ناحية أخرى، تؤدي العملية الالتهابية المستمرة إلى زيادة الإجهاد التأكسدي (Khansari *et al*., 2009).

وبناءً على نظرية الجذور الحرة للشيخوخة free radical theory of aging ، فإن تراكم الضرر التأكسدي يؤدي إلى فقدان وظائف الخلية ، وهذا بدوره يؤدي إلى موت الخلايا (Pole *et al*., 2016).

لهذا فقد اِقترح أن الإجهاد التأكسدي والعمليات الالتهابية المتعلقه به ترتبط بالأمراض المرتبطة بالعمر، مثلما لوحظ ارتفاع مستويات الإجهاد التأكسدي والعمليات الالتهابية ، من بين أمور أخرى ، في الأمراض التنكسية العصبية ، والسرطان ، وأمراض القنوات الصفراوية والكلى ، والسكري ، وأمراض القلب والأوعية الدموية (Liguori *et al*., 2018).

ولوحظ في دراسة Yetuk وجماعته (2014) تأثير بنزوات الصوديوم (6.25 ، 12.5 ، 25 ، 50 ، 100 ميكروغرام/مل) على زيادة الإجهاد التأكسدي في كريات الدم الحمراء في المختبر بعد معاملة الكريات مع البنزوات ، لوحظ زيادة بيروكسيد الدهون ، وكذلك انخفاض مستويات الإنزيمات المضادة للأكسدة ، مثل (SOD) ، (CAT) و(GST) . وفي دراسة أخرى لوحظ تأثير بنزوات الصوديوم على تحفيز الموت المبرمج apoptosis للخلايا (El-Shennawy *et al*., 2020).

فضلاً عن ذلك ، فإن تثبيط إنزيمات مضادات الأكسدة ، وإنخفاض مستويات الكلوتاثيون (GSH) ، لوحظ في زيادة مستويات أوكسيد النيتريك (NO) ، والالتهاب (زيادة في IL-6 و TNF α)، وتم أيضًا فحص تأثير بنزوات الصوديوم على الإجهاد التأكسدي على ذكور الجرذان بجرعات مختلفة ولفترات زمنية مختلفة (Sabour and Ibrahim, 2019) .

ولوحظ تأثير بنزوات الصوديوم على انخفاض مستويات GSH و malondialdehyde (MDA)، وأثرت أيضًا على مستويات الصوديوم والبوتاسيوم (ارتفاعها)، وارتبط تأثير البنزوات على الإجهاد التأكسدي بزيادة الضرر التأكسدي (Olofinnade *et al*., 2021) .

وبحسب دراسة Khan وجماعته (2020) بعد إعطاء بنزوات الصوديوم للجرذان لمدة 30 يومًا بجرعات مختلفة (70 ، 200 ، 400 ، 700 ملغم/كغم من وزن الجسم لوحظ انخفاض مستويات (SOD) ، و(CAT) ، و(GST). وفي دراسة Yadav وفريقه عام 2016 ، تم اثبات ان جرعة 70 ملغم/كغم آمنة ومع ذلك عند الجرعات العالية يقلل المركب من نشاط إنزيمات مضادات الأكسدة، كما تم دراسة تأثير البنزوات على تفاعل الخلايا اللمفاوية B و T.

وقد قللت جرعة من بنزوات الصوديوم (1000 ملغم/مل) من النشاط الوظيفي لكلا الفئتين من الخلايا الليمفاوية، فضلاًعن ذلك، فقد أثرت بنزوات الصوديوم على دورة الخلية عن طريق إيقاف الخلايا في المرحلة G1، كما أنه ثبط تكاثر الخلايا اللمفاوية التائية T lymphocyte ضد مستضدات معقد التوافق النسيجي MHC antigens وأثرت على مستويات السايتوكين اذ كان هناك انخفاض في تعبير CD8 للخلايا اللمفاوية T و CD19 للخلايا الليمفاوية B وفي التعبير عن علامات التنشيط مثل CD95 (كلا فئتي الخلايا الليمفاوية) و CD28 (الخلايا الليمفاوية T) و CD40 (الخلايا الليمفاوية B). وقد أظهرت دراسة أن إعطاء بنزوات الصوديوم (200 و 400 و 700 ملغم/كغم من وزن الجسم) للجرذان لمدة 30 يوماً زاد من مستوى

السيتوكينات المسببة للالتهابات (TNF-α و IFN-γ و IL-1β و IL-6) ونقص وزن جسم الحيوانات (Khan *et al*., 2020) .

(2-5-2) : تأثير بنزوات الصوديوم على وظائف الكبد والكلى Effect of sodium benzoate on liver and kidney functions

أثرت بنزوات الصوديوم في الحيوانات على الدهون والكبد ومعايير الكلى حيث لوحظت تغيرات نسيجية مرضية وتعتمد المعلمات الكيموحيوية على التغييرات في الجرعة لتسبب تلف الكبد (150-700 مليغرام/كيلوغرام من وزن الجسم) (Khodaei *et al*., 2019; Khan *et al*.,2020) .

وقد تم الإثبات أن بنزوات الصوديوم ترفع مستوى الكلوكوز، والأنسولين ، و AST ، و ALT،و ALP ، والبيليروبين الكلي ، والكرياتينين ، واليوريا ، والألبومين ، والكوليسترول الكلي ، والدهون الكلية ، وبيروكسيداز الدهون ، والكلوتاثيون بيروكسيديز ، والشوارد (الصوديوم والبوتاسيوم و كلوريد) وخفض مستوى البروتين الكلي. من ثَمَ لها تأثير على وظائف الكبد ووظائف الكلى والدهون وعلامات الإجهاد التأكسدي (Tawfek *et al*., 2015; Helal *et al*., 2019) . وقد أثرت بنزوات الصوديوم على الأنسجة في الكلى والكبد وقد وجد أن بنزوات الصوديوم قد تؤثر على الكلى أكثر من الكبد (Zeghib *et al*., 2021).

وفي دراسة تمت إضافة بنزوات الصوديوم (100 ملغرام/ كيلوغرام من وزن الجسم) إلى مياه الشرب للفئران لمدة 15 أسبوعًا ، وأظهرت التجربة تغيرات نسيجية تمثلت بوجود تنخر necrosis وضمور الكبيبات atrophy of glomerul والأنابيب tubules ، وكذلك زيادة اليوريا والكرياتينين وانخفاض دفاع مضادات الأكسدة (Walczak-Nowicka and Herbet, 2022) .

أكدت دراسة أخرى آثار بنزوات الصوديوم السلبية على الكبد ، مثلما يتضح من زيادة إنزيمات الكبد في الدم alkaline phosphatase (ALP) , aspartate aminotransferase (AST) (كانت جرعات بنزوات الصوديوم 30 ، 60 ، 120 مليغرام/ كيلوغرام من وزن الجسم يومياً (Ibekwe *et al*., 2007) .

أشارت دراسة عن النماذج الحيوانية إلى أن إعطاء بنزوات الصوديوم على المدى القصير تسبب في ارتفاع ملحوظ في انزيمات الكبد مثل (ALT, AST, ALP) (Hennigan *et al*., 2012).

ان الإجهاد التأكسدي هو مصطلح في علم الأحياء ، يشير إلى أن عدم التوازن في نظام البيروكسيد/مضادات الأكسدة يؤدي إلى تلف الخلايا (Kelly, 2003). في الأوضاع الطبيعية ، وينتج التمثيل الغذائي البيروكسيد كأنواع الأوكسجين التفاعلية reactive oxygen species (ROS) ، الذي يتم إزالته بمضادات الأكسدة (Zhang and Tsao, 2016 ; Heidari *et al*., 2016 ; Mittler, 2017).

وتؤدي التأثيرات السامة لـ ROS إلى أكسدة الدهون lipid peroxidation (LPO) وإنتاج 4-hydroxynonenal و malondialdehyde (MDA). نتيجة LPO يتم تحفز الضرر التأكسدي في الأنسجة (Wells *et al*., 2016 ; Jamshidzadeh *et al*., 2017). نظام دفاع مضادات الأكسدة للخلايا الذي سيحمي من الإجهاد التأكسدي ، بما في ذلك سوبراوكسيد ديسميوتيز (SOD) ، الكاتلاز (CAT) ، والكلوتاثيون (GSH) ، يقضي على ROS المفرطة (Atli and Grosell, 2016).

وفي حيوانات الاختبار حدثت تغيرات في معايير الكبد مثل الألبومين ، والبروتين الكلي ، γ-glutamyltranspeptidase ، والنسبة المرتفعة للدهون الفوسفاتية phospholipids والكوليسترول cholesterol في الدم كانت ملحوظة ، كما تسبب بنزوات الصوديوم في زيادة الوزن المطلق للكبد والكلى في كل من الأرانب والفئران ، وفضلا عن الدراسات السابقة حيث لوحظت تغيرات نسيجية على الكبد والكلى . (Oyewole *et al*.,2012; Agarwal *et al*.,2016; Radwan *et al*.,2020)

يعد بنزوات الصوديوم آمنًا لصحة الإنسان إذا تم استهلاكه بكميات أقل من 5 ملغرام/كيلوغرام من وزن الجسم يوميًا. وعلى هذا المستوى ، تم إنشاء المدخول اليومي المقبول Acceptable Daily Intake (ADI). والتي يعني بها تحديد الجرعة المعطاة من المادة التي يمكن أن يستهلكها الشخص يومياً طوال حياته بدون المعاناة من أي ضرر صحي. لا يتراكم بنزوات الصوديوم في الجسم، لأنَ البنزوات يقترن مع الكلايسين لتكوين الهيبورات hippurate في الكبد والكلى في تفاعل يحدث في حشوة الميتوكوندريا (Lennerz *et al*., 2015)

وعند دخول حشوة المايتوكوندريا ، ويتم تحويل بنزوات الصوديوم إلى benzoyl-coenzyme A (CoA) (ligase) ثم إلى hippurate (glycine N-acyltransferase) الذي يغادر المايتوكوندريا ليتم إخراجه بشكل أساس من خلال الجهاز البولي، وإنَ تناول بنزوات الصوديوم يسبب زيادة قوية ولكن عابرة في حمض الأنثرانيليك anthranilic acid (المشارك في أيض التربتوفان tryptophan) والأسيتيل

جليسين acetylglycine . يُعد البنزوات واحداً من نواتج أيض القرفة (Chen et al., 2009 ; Zhao et al., 2019).

وإذ تحتوي القرفة على سينامالديهيد cinnamaldehyde الذي يتحول إلى حمض سيناميك cinnamic acid في الكبد ويتأكسد إلى بنزوات (ملح الصوديوم أو benzoyl-CoA)، ليتم امتصاص البنزوات بسهولة من الجهاز الهضمي، ويتم استقلابها في الكبد إلى حمض الهيبورونيك hypuronic acid ، وبهذا الشكل سوف تُطرح من الجسم مع البول عادة خلال 6 ساعات من الابتلاع (Shahmohammadi *et al*., 2016).

(3-5-2): تاثير بنزوات الصوديوم على الدم Effect of sodium benzoate on blood

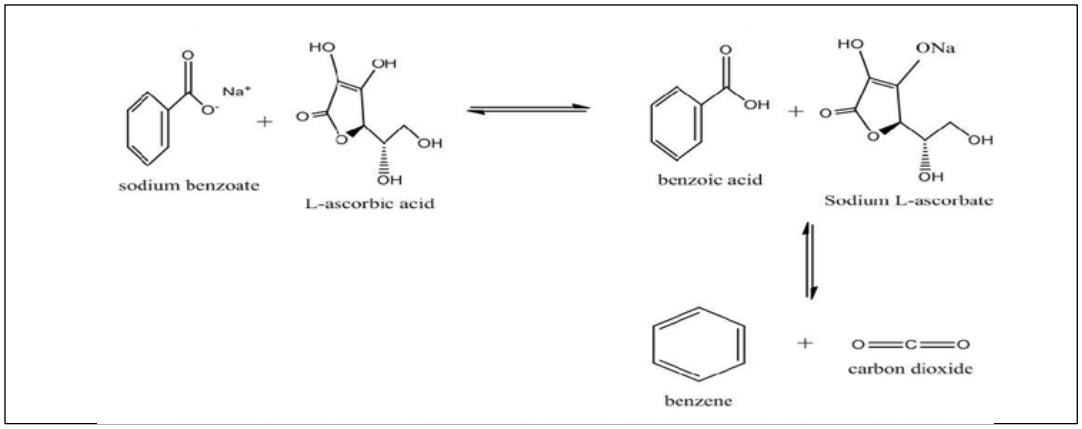
اشارت دراسة Dewangan (2009) الى أن بنزوات الصوديوم يملك تأثيراً على المراكز المكونة للدم ويؤدي الى نقصان أو زيادة فعاليتها بالتالي يسبب خلل في معايير الدم من خلال تاثيره على عملية تكوين خلايا الدم ، وقد تم معاملة الجرذان ببنزوات الصوديوم بتراكيز (400,100,25 ملغم / كغم /وزن الجسم) ل 28 يوماً ، وقد سجلت انخفاض معنوي في عدد وحجم كريات الدم الحمر و تركيز الهيموغلوبين و العدد الكلي لكريات الدم البيض. بينما اشار Abdel Aziz and Zabut في عام (2012) في دراسة تضمنت معاملة فموية لجرذان ببنـزوات الصوديوم بتركيز(500ملغم /كغم / وزن الجسم) لمدة 26 يوماً الى حصول زيادة ملحوظة في عدد الخلايا اللمفاوية وعدد كريات الدم البيض فضلاً عن حدوث انخفاض في حجم الخلايا المرصوص وتركيز الهيموغلوبين وعدد الصفائح الدموية وكريات الدم الحمراء.

إن معاملة الفئران ببنزوات الصوديوم (155ملغم/ كغم /وزن الجسم) للمدد 180,120,60,30 يوماً، قد ساهمت بحصول إنخفاض معنوي في عدد كريات الدم الحمراء الكلية وتركيز الهيموغلوبين، فضلاً عن تسجيل إرتفاع معنوي في مستويات البروتين الكلي و الكلوبيولين والألبومين وحصول زيادة في أوزان الكبد والكلى (Sinha and D ‘souza, 2006).

(6-2) : بنزوات الصوديوم وفيتامين Sodium benzoate and vitamin C C

على الرغم من عدم وجود دراسات تؤكد بوضوح ضرر هذه المواد المضافة ، لكن ثبت أنه عند استعماله كمادة حافظة ، يمكن أن يتفاعل بنزوات الصوديوم مع الفيتامين C ، وبالتالي تشكل مادة البنزين المسببة للسرطان (Piper and Piper, 2017). غالباً ما يستعمل مزيج من بنزوات الصوديوم مع الفيتامين C في

المشروبات الملونة والمحلاة، وقد تم الإبلاغ عن مستويات مرتفعة من البنزين في المشروبات الغازية وعصائر الفاكهة والمنتجات الأخرى التي يوجد فيها بنزوات تركيبة مع فيتامين C كما في الشكل (2-2) (Heshmati *et al*., 2018; Azuma *et al*., 2020) ، وتجدر الإشارة إلى أن الحرارة والضوء يمكن أن يزيدا من المعدل من تكوين البنزين (Nyman *et al*., 2010) .



الشكل (2-2) : مسار تفاعل بنزوات الصوديوم مع حمض الأسكوربيك (Femi, 2019) .

تظهر الأدلة أن بنزوات الصوديوم تتأيض إلى البنزين ، مما يؤدي إلى تدمير الحامض النووي DNA للمايتوكوندريا (Oyewole *et al*., 2012 ; Shahmohammadi *et al*., 2016).

وفي دراسة أجريت على الجسم الحي ، أدى حمض الأسكوروبيك إلى تفاقم الضرر لتأثير بنزوات الصوديوم على الخصوبة ، فقد تسبب في تلف بنية أنسجة الخصية وتدهور جودة السائل المنوي (Kehinde *et al*., 2018).

(7-2) : حامض البنزويك وبنزوات الصوديوم كمؤكسدات Benzoic acid and Sodium benzoate as Oxidants

إنَ المواد الكيميائية التي تنشط تكوين الإجهاد التأكسدي من خلال إنتاج المجاميع الفعالة أو بواسطة اكتساح الأنظمة المضادة للأكسدة تُعرف بالمؤكسدات الأولية Prooxidants بحسب ما أشار به كل من (Puglia and Powel,1984) ، ويمتلك هذه الفعالية كل من بنزوات الصوديوم (Yetuk *et al*.,2014) وحامض البنزويك (Piper,1999; Beloborodova *et al*.,2012) ،وفضلاً عن مشتقات أخرى لحامض البنزويك (Simiae,2007) ، وأشار Mochizuki وجماعته (2002) إلى تأثيرات المؤكسدات الأولية التي

تظهر بواسطة حدوث الأكسدة الذاتية Autoxidation حيث يتم تمثيل اول خطوة في هذه الأكسدة بأنتاج جذر الأوكسجين السالب وجذر Semiquinone .

وتعد هذه الجذور ذات فعالية عالية، إذ تُدمر الجزيئات الكبيرة الرئيسة مثل البروتينات والدهون والحامض النووي ، وبالتالي الأضرار بالخلايا والأنسجة (Lu *et al*., 2010; Craft *et al*., 2012) . فضلاً عن إنّ كلا الجذرين يساهمان في الإسراع بعملية الأكسدة الذاتية مما يؤدي إلـى إنتاج جذر بيروكسيد الهيدروجين H2O2 حسب دراسة (Sakihama *et al*.,2002).

(8-2) : الإجهاد الكيميائي Chemical stress

يتم تعريف الإجهاد الكيميائي على أنه الإجهاد الناتج من أي مادة كيميائية لها القدره على التتداخل مع العمليات الكيميائية في الجسم مثل المواد الحافظة الكيميائية والأدوية والمبيدات و التلوث البيئي إذ إنّ هذه المواد يمكن أن تساهم بحدوث الإجهـاد الكيميـائي لكونها تتداخل مع توازن الجسم الطبيعي (Kale ,2015).

وأن الإجهاد الكيميائي له قدرة على توليد الجذور الحرة التي تسبب تدمير الغشاء ، ويتغير تركيب ووظيفة المايتوكوندريا إستجابة للإجهاد الكيميائي (Kakkar *et al* .,2000) ، حيث تتولد الجذور الحرة بشكل رئيس في المايتوكوندريا بسبب توفر الطاقة لتحفيز تنشيط الأنزيمات داخل الخلية، تملك المايتوكوندريا دوراً مهماً للمحافظة على قدرة الخلية في النمو والحياة .

عندما يحدث للمايتوكوندريا تنشيط مفرط يزداد تكوين الجذور الحرة ويسبب جذر الأوكسجين السالب والعديد من الجذور الأخرى الكثير من التغيرات التركيبية في المايتوكوندريا مثل تغيرات في طيات الأعراف Cristae وتدمير الغشاءين الخارجي والداخلي وخسارة مادة الحشوة (Mehrotra *et al*.,1991). كما تتسبب الجذور الحرة في تثبيط الأنزيمات المهمة في المايتوكوندريا والتي لها دور مهم في المحافظة على التنظيم الوظيفي والتركيبي (Kakkar *et al*.,2000) .

(9-2) : الإجهاد ألتأكسدي Oxidative stress:

يعرَّف الإجهاد التأكسدي بأنه زيادة نسبية في أنواع الأكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (ROS) عند مقارنتها بمضادات الأكسدة (Sies , 2015)، وينتج الاجهاد التاكسدي عن اختلال التوازن بين التوليد المفرط للجذور الحرة وعدم كفاية دفاع مضادات للأكسدة (Ling and Kuo 2018; Daenen *et al*., 2019) ،ويؤكد هذه الارتباط على أنه يجب تحقيق توازن بين الوفرة النسبية لـ ROS ومضادات

الأكسدة. تمتلك الخلايا آليات كيميائية حيوية ووراثية معقدة للحفاظ على هذا التوازن ، ومن الواضح أن اضطرابها يمكن أن يكون له عواقب فسيولوجية مرضية عميقة، هذا وتعد مستويات ROS المرتفعة سامة للخلايا (Reczek *et al*., 2017).

وأنواع الأوكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (ROS) الناتجة عن الإجهاد التأكسدي oxidative stress (OS) هي أساسًا ناتج طبيعي للأيض الخلوي، إذ تعد الأنشطة الخلوية المتغيرة لنظام نقل الإلكترون electron transport system (ETS) ، وانزيمات الأكسدة الحلقية cyclooxygenase ، والأكسيدازات oxidases ، والبيروكسيدات peroxidases من العوامل الرئيسة لإنتاج كمية متزايدة من أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS بسبب زيادة الإجهاد التأكسدي (Ritesh *et al*. ,2015).

وتعد الجذور الحرة Free Radicals جزيئات فعالة جداً ناتجة عن الاجهاد التاكسدي وتقوم بأكسدة الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والأحماض النووية ، والجذور الحرة تمثل ذرة أو أيون أو جزيئة تحوي الألكترون أو أكثر في غلافها الخارجي ، إذ تملك قدرة على التفاعل مع أي جزيئة أخرى مؤدية الى تحطم الأنسجة الحاوية للجزيئة (Pham - Huy *et al*.,2008; Singh *et al*., 2010) .

تعد مجاميع الأوكسجين الفعالة (ROS) هي جزيئات أوكسجين حاوية على إلكترون مفرد في مدارها الخارجي نتيجة فقدانها إلكترون واحد من زوج من الأزواج الالكترونية خلال التفاعلات الكيميائية، ومكونةً ما يدعى بجذورالأوكسجين الحرة (Block *et al*., 2002)، ولهذا تكون الجذور الحرة غير مستقرة، وتملك طاقة عالية وتميل للتفاعل مع الجزيئات الحيوية في خلايا الجسم لتصبح اكثر استقراراً (Matkovics, 2003; Valko *et al*.,2004).

تصنف مجاميع الأوكسجين الفعالة إلى أصناف حاوية على جذور، أي تملك إلكترون واحد في غلافها الخارجي ، وتضم جذر الأوكسجين السالب الذي هو اكثر الجذور سمية و وجذر أوكسيد النتريك وجذر الهيدروكسيل وجذر الألوكسيل و جذر البيروكسيل (Al-Omar *et al*.,2004). أمّا أصناف مجاميع الأوكسجين الفعالة غير الحاوية على جذور فتشكل جزيئة كاملة وتضم بيروكسيد الهيدروجين ، الأوكسجين المنفرد Single Oxyge وبيروكسي نتريت Peroxy nitrate (Bahorunt *et al* .,2006)، وعند ارتباط الجذور الحرة للأوكسجين مع الجزيئات الحيوية في خلايا الأنسجة تحولها إلى جذور حرة جديدة ، وتزداد سلسلة التفاعلات التي تولد الجذور الحرة في الحالات المرضية مسببة الضرر للخلايا ، وإنّ الأذى الناجم من تفاعلات الجذور الحرة يكون غير ملحوظ بالعادة حتى يصل الكائن إلى مرحلة متقدمة من الاجهاد الذي يسمى بالضرر ألتأكسدي Oxidative damage (Valko *et al*.,2007).

بالاضافة الى مصادر داخلية المولدة للجذور الحرة داخل الجسم، فهنالك مصادر خارجية تولد الجذور الحرة ايضاً وتشمل التلوث البيئي والتدخين والتعرض للأشعة الأيونية وتناول الأطعمة المحفوظة لمدة طويلة والملوثة ببعض المواد الكيمياوية (Matkovics, 2003) . وفق دراسة Dizdaroglu وجماعته (2002) إن ROS لها القابلية على تحطيم الجزيئات الكبيرة المكونة لخلايا الانسجة مثل البروتينات والكربوهيدرات والحامض النووية مسببة امراض متعددة وطفرات وراثية فضلا عن كونها تدمر الخلايا المكونة للانسجة بفعل بيروكسدة الدهن Lipid peroxidation .

(2-9-1) : بيروكسدة الدهون Lipid peroxidation

بيروكسدة الدهون تمثل تحلل الأحماض الدهنية غير المشبعة في أغشية الخلايا من خلال سلاسل من تفاعلات التحفيز الذاتي للجذور الحرة لإنتاج Lipid hydroperoxides والتي بدورها تتحلل وتكون مركبات أخرى مثل الالكانات alkans الألكانالات alkanals والألكينات alkenes و الألكينالات alkenalsوالهايدروكسي الكينالات hydroxy alkenals و الألديهايدات مثل المالون ثنائي الديهايد (MDA)الذي يعتبر ناتجاً ثانوياً لعملية بيروكسدة الدهن الـــــذي يشير إلى حالات ارتفاع توليد الجذور الحرة والإجهاد التأكسدي (Block *et al*.,2002; Lobo,2010) . وتؤدي بيروكسدة الدهن المتولدة نتيجة تفاعل الجذور الحرة إلى تحطيم بنية الخلايا حيث يوجد تأثير على أغشية الخلايا وتحطيمها بسبب جذور بيروكسيد الدهون وهيدرو بيروكسيدات الدهون ونواتج الأجزاء الدهنية الباقية . وان التدمير او التحطيم قد يحصل في أغشية عضيات الخلية وبشكل خاص المايتوكوندريا والجسيمات الحالة التي ينتج عنها تحرر الأنزيمات ، وزيادة الهدم بفعل الجذور الحرة (Bulkley,1983).

يحدث تفاعل بين المالون ثنائي الديهايد MAD الذي هو الناتج الثانوي لبيروكسدة الدهون مع الدهون المفسفرة والبروتينات مسبباً تغيراً في خصائصها ووظائفها (Slatter *et al*.,2000) . يملك المالون ثنائي الديهايد دور كبير في تكون طفرات بسبب تفاعله مع الحامض النووي مما يؤدي إلى حدوث الأورام السرطانية (Del Rio *et al*., 2005) .

(2-10): مضادات الأكسدة Antioxidants :

يساهم نظام مضادات الاكسدة في كسح أو إزالة النواتج الضارة المتكونه بفعل التولد المستمر للجذور الحرة في الجسم وتسمى بأنظمة الدفاع المضادة للأكسدة Antioxidant defense systems ، وهي المواد التي تعمل على تثبيط إنتاج الجذور الحرة ومنع عمليات الأكسدة في الجسم أو الإبطاء منها ،وبالتالي تكون

خطاً دفاعياً ضد التخريب الناتج من الجذور الحرة. تملك مضادات الأكسدة القدرة على اعطاء إلكترون وتحويل الجذور الحرة إلى مركبات مستقرة غير قادرة على التفاعل مع الجزيئات الحيوية في الجسم وبذلك تزيل النشاط الضار للجذور الحرة (Halliwell,2007;Godman *et al*.,2011). وفق دراسة Ratnam (2006) تم تقسيم مضادات الأكسدة إلى نوعين وهي مضادات الأكسدة الأنزيمية Enzymatic antioxidantsومضادات الأكسدة غير الأنزيميةNon-enzymatic antioxidants ، تضم مضادات الأكسدة الأنزيمية أنزيم سوبراوكسيد ديسميوتيز(SOD) والكاتاليز (CAT) وكلوتاثيون بيروكسديز (GPx) وكلوتاثيون ريديوكتيز(GRD) Glutathione reductase .

أمّا مضادات الأكسدة غيرالأنزيمية فيُعد الغذاء مصدرها وتشـــمل الكثير من الفيتامينات والمعادن المتواجدة في الأغذية أو يتم تصنعيها في الجسم مثل الكلوتاثيون والألبومين وحامض اليوريك (Barros *et al*.,2011).

ويتكون بيروكسيد الهيدروجين H2O2 ، وهو ROS غير جذري، عن طريق تفكيك جذور الأنيون الفائق superoxide anion بواسطة SOD وعن طريق الاختزال المباشر للأكسجين بواسطة الاوكسيدات oxidases . في الواقع يعكس ارتفاع H2O2 الكلوي في الفئران المعالجة زيادة إنتاج ROS في الكلى وتزداد فعالية المؤكسدات الأولية ويتم إزالة H2O2 بسرعة بواسطة GPx و CAT ، ولكن عندما يتم إنتاج H2O2 بشكل زائد ، فقد يتفاعل مع الحديد (تفاعل Fenton) لتوليد جذور الهيدروكسيل OH الذي يزيد من انتشار الإجهاد التأكسدي. ونظراً لأن H2O2 له خصائص نقل غشائية مشابهة للماء ، على عكس جذر Superoxide ، فإنه يمكن أن ينتشر بسهولة عبر الأغشية ويؤثر على الأنظمة التنظيمية في الأجزاء الخلوية الأخرى أو الخلايا المجاورة (Flora,2009 ; Ratliff *et al*., 2016).

(2-10-1) : الكلوتاثيون Glutathione

الكلوتاثيون (GSH) هو الثيول غير البروتيني ذو التراكيز الأكثر وفرة في أنسجة الثدييات كمضاد أكسدة غير انزيمي مهم داخل الخلايا ، يعمل كمنظم من حالة الأكسدة الخلوية الذي يحمي الخلايا من التلف الناجم عن بيروكسيدات الدهون وأنواع الأكسجين التفاعلية ROS وأنواع النيتروجين والمواد الحيوية الغريبة xenobiotics من خلال التخلص منها ، وسلطت الدراسات الحديثة الضوء على أهمية GSH كعنصر تحكم في تمايز الخلايا ، الانتشار ، موت الخلايا المبرمج والوظيفة المناعية ، ويملك GSH أدوار وقائية وممرضة ، إذّ يعمل على إزالة السموم من المواد المسرطنة ، فمثلاً ترتبط مستويات GSH المرتفعة

في الخلايا السرطانية بتقدم الورم وزيادة المقاومة لأدوية العلاج الكيميائي، ويعتبر GSH عنصر ضروري لإصلاح ضرر الحامض النووي DNA أثناء العلاج الكيميائي(Kennedy *et al*., 2020) .

أظهرت دراسة أن نقصان GSH داخل الخلايا يجعل الخلايا السرطانية أكثر عرضة للإجهاد التأكسدي وعوامل العلاج الكيميائي، فقد ثبت أن استنفاد GSH يحسن الفعالية العلاجية للعلاج القائم على أنواع الأكسجين التفاعلية (Niu *et al*., 2021).

وحسب ما أشارت به دراسة Wu وجماعته (2004) أنَّ GSH يُعدّ واحداً من مضادات الأكسدة السائدة في نظام مضادات الأكسدة. وهو ثلاثي الببتيد يتكون من أرتباط ثلاثة أحماض أمينية هي السستين cystein والكلوتاميت glutamate و الكلايسين Glycine، إذ يوجد معظم GSH داخل الخلايا في منطقة مخفضة يمكن أن يتفاعل مع المواد المؤكسدة مثل ROS وذلك يعني بانه يتأكسد من شكله المختزل Glutathione (GSH) إلى شكله المؤكسد المعروف بثنائي كبريتيد الجلوتاثيون Glutathione disulfide (GSSG).

ولقد ثبت أن أنواع الأكسجين التفاعلية والمواد الكيميائية يمكن أن تلحق الضرر بالحمض النووي ، وأن GSH يمكن أن يحمي من هذا النوع من الضرر (Valko *et al*., 2007). يمكن لـ GSH أيضًا إزالة السموم من المواد المسرطنة بشكل مباشر من خلال استقلاب المرحلة الثانية والتصدير اللاحق لهذه المواد الكيميائية من الخلية. من ناحية أخرى ، لوحظ ارتفاع مستويات GSH في أنواع مختلفة من الخلايا السرطانية والأورام ، وهذا يميل إلى جعل هذه الخلايا والأنسجة أكثر مقاومة للعلاج الكيميائي (Estrela *et al*., 2006).

(2-10-2) : الكلوتاثيون – أس - ترانسفيرايز Glutathione –S- transfrease

إنّ إنزيمات الكلوتاثيون - أس - ترانسفيراز (GSTs) هي عائلة من إنزيمات العصارة الخلوية المسؤولة عن إزالة السموم من مجموعة من المركبات الغريبة الحيوية xenobiotics عن طريق الاقتران بالكلوتاثيون. تتكون الإنزيمات من homodimers و heterodimers مجمعة في أنواع العائلات المستقلة: alpha (α) و pi (π) و mu (μ) و theta (θ) وكذلك إنزيم ثلاثي الميكروسومات (Beckett and Hayes, 1993) .

أمّا Hayes وجماعته (2005) فقد اشارو إلى أنّ انزيمات (GSTs) عبارة عن عائلة متعددة الجينات من ثمانية إنزيمات ثنائية الأبعاد تم تصنيفها بناءً على تسلسل الأحماض الأمينية وخصوصية مادة الأساس مثل

alpha (A)و kappa (K) و mu (M) و omega (O) و pi (P) و sigma (S) و theta (T) و zeta (Z).

جاءت دراسة Chatterjee و Gupta عام (2018) اعتمادًا على موقع GSTs تحت الخلوي، وجُمعت على أنها حشوية (A ، P، M، S، T، Z) و ميتوكوندريا (K) ، أو مرتبطة بالغشاء (بروتينات مرتبطة بالغشاء في استقلاب لإيكوزانويد Eicosanoid والكلوتاثيون Glutathione)

تم تقسيم GSTs وفقًا لموقعها الخلوي إلى ثلاث عائلات رئيسة على الأقل من البروتينات ، وهي GSTs العصاري الخلوي و GSTs للميتوكوندريا و GSTs الميكروسومي ; Sheehan *et al*., 2001) Hayes *et al*., 2005 ; Oakley, 2011).

يتم توزيع GSTs الخلوية بشكل منتشر وتنقسم بدورها إلى فئات رئيسة عدة على أساس خواصها الكيميائية والفيزيائية والتركيبية . تُعرف أيضًا Mitochondrial GSTs باسم Kappa GSTs وهي إنزيمات قابلة للذوبان تحمل أوجه تشابه بنيوية مع GSTs العصاري الخلوي. على العكس من ذلك ، فإن GSTs الميكروسومية ، والمعروفة أيضًا باسم MAPEG (بروتينات مرتبطة بالغشاء تشارك في استقلاب الإيكوزانويد والكلوتاثيون) ، هي بروتينات غشائية متكاملة ليست تطورية مرتبطة بالفئات الرئيسية الأخرى.(Morel and Aninat, 2011).

يعد إنزيم GST انزيم مضاد للأكسدة واسع الطيف (Allocati et al., 2009) ، وان أيض الحيوان يمكن أن ينتج مواد ضارة والتي يمكنها بعد ذلك أن تنتج سُمِّيَّة أقل من خلال الحد منها، ويعد GST من الإنزيمات المهمة في عملية التمثيل الغذائي لإزالة السموم(Danielson, 2002) . إذ يقوم بتطهير الكبد من السموم والبكتيريا التي يتعرض لها، ويتم إنتاجه من خلال معادلة بيروكسيد الهيدروجين Josephy , 2010) (Hayes *et al*., 2005 ;. تُعرف GSTs فضلاً عن إلى أدوارها في إزالة السموم بوظائفها التنظيمية في إرسال الإشارات الخلوية ، والتعديل اللاحق للترجمة وتشارك في السيطرة على استجابة الإجهاد والاستماتة والانتشار (Mcllwain *et al*., 2006 ;Tew and Townsend, 2011).

وتشارك GSTs في مقاومة العديد من الأدوية المضادة للسرطان من خلال نشاط اقترانها ، غالبًا ما تُظهر GSTs مستويات عالية من التعبير في الخلايا السرطانية عند مقارنتها بالخلايا الطبيعية وتلعب GSTs دور في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي والعديد من الجزيئات السامة ، وتشارك في تخليق

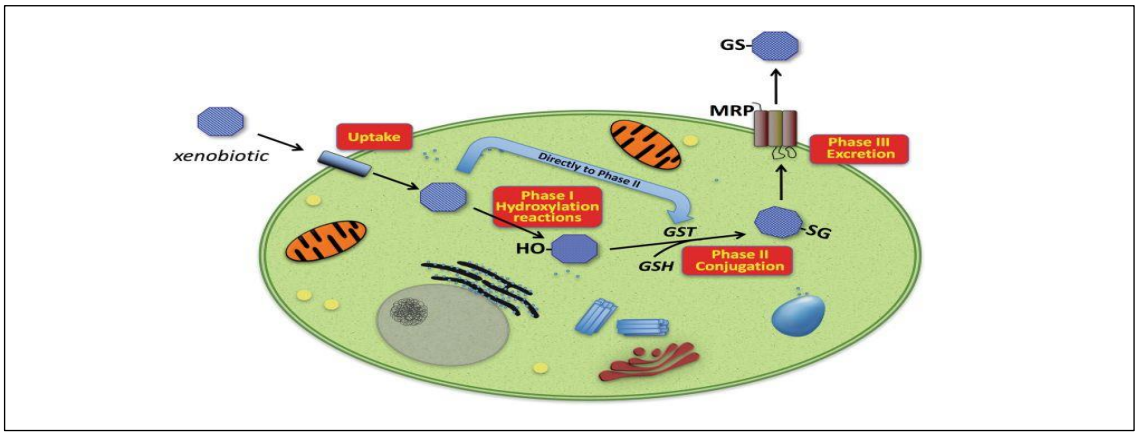
وتعديل الليكوترين leukotrienes والبروستاجلاندين prostaglandins حسب (Gate and Tew, 2001 ; Hayes *et al*., 2005).

إنزيمات المرحلة الأولى والثانية من التمثيل الغذائي تلعب دوراً حاسماً في تنشيط أو إزالة السموم من المواد المسببة للسرطان الجيني (Knasmüller *et al*., 1998) ، فإنزيمات GSTs هي إنزيمات إزالة السموم من المرحلة الثانية الموجودة في معظم أشكال الحياة وهي حيوية للحفاظ على التوازن الخلوي (Zhang *et al*., 2014)، وتحمي GSTs الحمض النووي الخلوي من التلف التأكسدي الذي يمكن أن يؤدي إلى زيادة طفرات الحمض النووي أو إحداث تلف في الحمض النووي الذي يعزز التسرطن (Li et al., 2009)

تحمل هذه الإنزيمات نطاقاً واسعاً من الوظائف في الخلايا ، مثل إزالة أنواع الأكسجين التفاعلية ROS وتجديد بروتينات الثيولات (وكلاهما من عواقب الإجهاد التأكسدي) ، وتحفيز الاقتران مع الروابط الداخلية ، وتحفيز التفاعلات في مسارات التمثيل الغذائي غير المرتبطة بإزالة السموم (Sheehan *et al*., 2001).

إنّ انزيمات GSTs تحفز اقتران الجلوتاثيون (GSH) مع مجموعة واسعة من الجزيئات الكارهة للماء والكهرباء بما في ذلك العديد من المواد المسرطنة والأدوية العلاجية والعديد من منتجات التمثيل الغذائي التأكسدي ، مما يجعلها أقل سمية ومهيئه لتصريف من الخلية (Hayes *et al*., 2005 ; Kural *et al*.,2018).

ويُظهر الشكل (2-3) الجزيئات الضارة المنتشرة عبر غشاء البلازما وداخل الخلايا، قد يتم استهدافها بواسطة إنزيمات ما يسمى بعملية التمثيل الغذائي للمرحلة الأولى وتنتمي العناصر الرئيسة إلى عائلة السيتوكروم P450 ، والتي تشتمل على العديد من الإنزيمات التي تحفز تفاعلات مختلفة بما في ذلك التفاعل الرئيس المتضمن الأكسدة والاختزال (تفاعل الهيدروكسيل) ، في المرحلة الثانية من عملية التمثيل الغذائي يتم لعب الدور الرئيسي بواسطة انزيم GSTs الذي يحفز اقتران المادة الغريبة الحيوية xenobiotics المعدلة من المرحلة الأولى إلى GSH الخاص بالخلية لصنع جزيئات محبة للماء مما يسهل التخلص منها في عملية التمثيل الغذائي. يتم بعد ذلك نقل الاتحاد الذي تم الحصول عليه بشكل نشط خارج الخلية بواسطة مضخات غشاء الخلية (المرحلة الثالثة). قد تدخل بعض المركبات في عملية التمثيل الغذائي للمرحلة الثانية مباشرة (Allocati *et al*., 2018).



الشكل (2- 3) : نظرة عامة على التحول الحيوي الأنزيمي (Allocati *et al*., 2018).

(11-2): وصف نبات المورينغا أوليفيرا Characterization of Moringa oleifera Plant

تعود شجرة المورينغا إلى النباتات سريعة النمو من ضمن مغطاة البذور Angiosperm والتي اسمها العلمي *Moringa oleifera Lam* والاسم المرادف له Moringa pterygosperma شجرة البان الزيتوني أو شجرة اليسر أو عصا الطبلة Drumstick Tree والسبب يعود لطول قرناتها او شجرة فجل الحصان Horseradish Tree نتيجة طعم جذورها الذي يشبه طعم جذور الفجل (Sanjay and Dwived, 2015).

تعتبر المورينغا من الأشجار المعمرة صغيرة إلى متوسطة الحجم ويتراوح ارتفاعها مابين (3-15متر) تمتاز بقدرتها على تحمل الأجواء الجافة، سريعة النمو ذات ساق هش وقائم أما الأوراق حسب الشكل (2-4) فتعتبر من انواع الأوراق المتبادلة المركبة المضاعفة ولها محور رئيسي طويل وفرع مشترك مع 8-10 أزواج من الوريقات وكل زوج مُؤلف من وريقة في القمة وهي الأكثر طولاً و ورقتين بيضوية متقابلة (Karthika *et al*., 2013; Qureshi and Solanki, 2015) والأزهار بيضاء اللون ذات رائحة عطرة محمولة على حامل زهري (Chaudhary and Chaurasia, 2017). واخيرا ثمار المورينغا تكون على شكل قرنات خضراء اللون غير ناضجة وعند النضج تتحول إلى اللون البني (Taher *et al* ., 2017)

و تحتوي أوراق المورينغا على مركبات ذات نشاط بيولوجي مهم تشمل الكاروتينات والفيتامينات، والفينولات ، والفلافونويدات ، الكلوكوزينات ، الأيزوثيوسيانات والصابونيات وبذلك تشتهر بفوائدها الطبية (Hisam *et al*., 2018). الفوائد الخاصة بهذا النبات لا حصر لها، مثل فعالية مضادات الأكسدة ، وقاية

كبدية ، مضاد للالتهابات والخصائص الخافضة لضغط الدم. بل هو أيضا مرتبط بأنخفاض السكر في الدم وبالتالي يُظهر تأثير مضاد لمرض السكر (Farid and Hegazy 2019)، ويطلق على نبات المورينغا أوليفيرا "بشجرة المعجزة" و" شجرة الحياة " لأنها تملك العديد من التأثيرات المفيدة (Padayachee and Baijnath 2020).

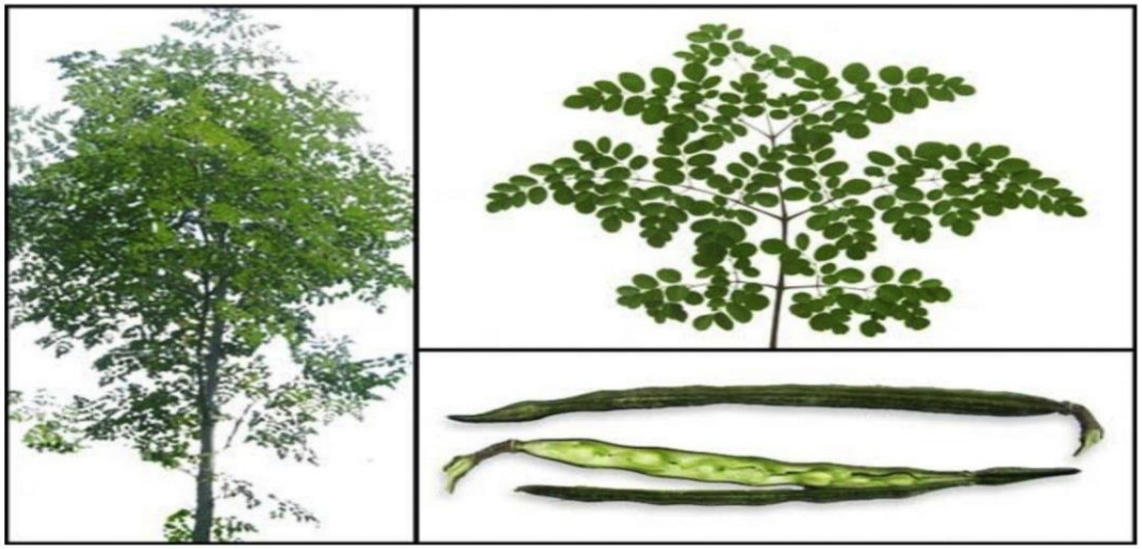
وتحتوي أوراق المورينغا على مستويات عالية من الألياف (11.23غم/ 100غم) ، كربوهيدرات (56.33 غم/ 100غم) ، وإجمالي البروتينات (9.38غم/ 100 غم) ، والدهون (7.76 غم/ 100غم). المورينغا هو مصدر ممتاز للمعادن الأساسية (مثل الصوديوم والبوتاسيوم ، المغنيسيوم والفوسفور والحديد والزنك والنحاس ، الكالسيوم والمنغنيز). يحتوي على 17 حامض أميني محدودة ، أساسية وغير أساسية، فالأحماض الأمينية الموجودة في المستويات الأعلى كانت الليوسين leucine واللايسين lysine بكميات (94.36 و 69.13 ملغم/ 100غم على التوالي). إما بخصوص الفيتامينات فهي بيتا كاروتين beta-carotene (سلائف فيتامين A) ، فيتامينات E، C، B1، B2 وفيتامين B3 المحدود *et* El Sohaimy (*al*., 2015; Bhattacharya *et al*.,2018)

وقام Coz-Bolaños وجماعته (2018) بعمليات استخلاص بمذيبات مختلفة (ماء ، إيثانول 70٪ وميثانول 70٪) ، وأظهرت مستخلصات الأوراق المجففة نسبة عالية من المركبات الفينولية ، وبالتالي فعالية مضادات الأكسدة، والمورينغا نبات متعدد الأوجه معظم أجزائه صالحة للأكل ولها قيم علاجية، وتحتوي بذوره وأزهاره وثماره (القرون) على العناصر الغذائية والمواد اللازمة للتغذية ، مثلما وصفها Fernandes وجماعته (2021) . وبسبب هذا ، كانت المورينغا منتشرة على نطاق واسع ويتم استعمالها كمكمل ضد سوء التغذية، أوراقها هي الأجزاء الأكثر استعمالاً ويمكن تجفيفها وتخزينها لاستعمالها لاحقًا (Shiriki *et al*., 2015).

(12-2): التصنيف (USDA, 2016) Classification :

Kingdom: Plantae
Sub-kingdom: Tracheobionta
Super division: Spermatophyta
Division: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Sub class: Dilleniidae
Order: Capparales
Family: Moringaceae

Genus: *Moringa*
Species: *oleifera*



شكل (2-4) : شجرة وأوراق وبذور نبات المورينغا أولفيرا
(http://www.Stuartxchange.com/ChineseList.html).

(13-2): أهمية المورينغا The Importance of Moringa Plant :

الجزء الأكثر استعمالاً من النبات هي الأوراق لاحتوائها على البروتينات والفيتامينات والكاربوهيدرات والمعادن بنسب عالية فضلاً عن احتوائها على القلويدات والتانينات والكاروتينات والصابونينات والفلافونويدات والبوليفينول بالإضافة إلى الستيرولات النباتية والكلايكوسيدات (Gopalakrishnan *et al*., 2016; Oladeji *et al*.,2017).

(1-13-2): الأهمية الغذائية Nutritional Importance

بناء على دراسة Oyeinka and Oyeyinka (2018) حيث تم استعمال أوراق المورينغا بشكل تجريبي كمحسن غذائي Food Fortificant لبعض الأغذية مثل (البسكويت، عصيدة الذرة ،الخبز،اللبن والحساء) إذ أشار باقتراح تصميم منظم ومخطط جيداً لاستعمال المورينغا في الاغذية.

وأظهرت الدراسات إن الإضافة القليلة من المورينغا إلى النظام الغذائي يساعد في زيادة القيمة الغذائية للوجبات من الطاقة والبروتين والمعادن وبالتالي الاستغناء عن المكونات الغالية وعلاج سوء التغذية بالأخص لدى الأمهات المرضعات والأطفال (Saucedo-Pompa *et al*., 2018)

بحسب ماذكر Abou-Elkhair وجماعته (2020) فإن إستعمال مسحوق بذور المورينغا كمضافات أعلاف لغذاء طائر السمان الياباني (Coturnix japonica) Japanese quail يمكن ان يمنع الآثار الضارة للإجهاد الحراري على الأداء الإنتاجي للبيض، إذ الدراسة كشفت بأن الحمية الغذائية المكملة بتركيز (0.2% و0.3%) من مسحوق بذور المورينغا قد قامت بتعزيز إنتاجية البيض بشكل عالي كما لوحظ تحسن تعبيرات بعض الجينات في خلايا المبيض .

وتعد المورينغا ذات اهمية في الوجبات الغذائية في مختلف بلدان العالم كالهند والباكستان والفلبين وتايلاند وهاواي يعود ذلك نتيجة تنوع عناصرها الغذائية (Pakade et al., 2013) وبمقارنتها بغيرها من الأغذية فهي تملك قيمة غذائية عالية لأنها غنية بالمعادن الضرورية للجسم مثل الكالسيوم والمغنيسيوم والبوتاسيوم والمنغنيز والحديد والفسفور والزنك (Sodamade et al.، 2017)

فضلاً عن احتوائها على الفيتامينات (AوCوEومجموعة فيتامين B) ، وهي مصدر مهم للبروتينات والأحماض الأمينية مثل الهستدين Histidine والتيروسين Tyrosin والاسبارتات Aspartate، وتعد مصدر للمكملات الغذائية (Pawaskar and Sasangan, 2017).

(2-13-2): الاستعمالات الطبية Medical Uses

تعد المورينغا مصدراً للبروتين ، ويستعمل مسحوق أوراق المورينغا كإضافة إلى علف أسماك تامباكي *Colossoma macropomum* الذي يسرع النمو ويمكن استعماله كمكمل ليحل محل دقيق فول الصويا (Safrida *et al*., 2020).

أظهرت دراسة أن محتوى المواد النشطة بيولوجياً في أوراق المورينغا ، مثل المركبات الفينولية والفلافونويد ، يمكن أن تقلل الدهون في البلازما التي قد تكون ناجمة عن تنظيم تعبير مستقبلات البروتين الدهني منخفض الكثافة ، تثبيط تخليق الدهون الكبدية ، إفراز البروتين الدهني .(Bhandari *et al*., 2011)

تم التوجه نحو استعمال مضادات الأكسدة الطبيعية التابعة للنباتات كونها فعالة وآمنة ورخيصة لخفض الأضرار المؤكسدة التي تسببها الجذور الحرة (Khalafalla *et al*.، 2010).

وحسب ما جاء في الدراسات فإنَ العلاج بالمورينغا أو باستعمال المواد الكيميائية المفصولة منها تلعب دوراً في تقليل الإجهاد التأكسدي بفعل الجذور الحرة والوقاية من مجموعة من الأمراض المزمنة وعلاجها وخفض خطر الإصابة بالسرطان (Abd Karim *et al*.,2016 ; Kou *et al*., 2018).

وأثبتت دراسة أنّ هناك ازدياد في محتوى البروتين وانخفاض مستويات اليوريا Urea والكرياتينين Creatinine في الدم بمجرد وجود المورينغا في النظام الغذائي للفئران ، بالتالي المساعدة بمنع اختلال وظائف الكلى (Elebiyo and Adeyemi, 2014)، من هنا جاء اقتراح عن جعل المورينغا من ضمن النظام الغذائي لغرض تعزيز المناعة لمرضى الايدز (Monera and Maponga، 2012). والمساهمة في تحسين وظائف الكبد وخفض الإجهاد التاكسدي الناتج عن الجرعات العالية من Paracetamol الباراسيتامول (Saleh *et al*., 2018).

وحسب ما توصل له Abd-Alwahab (2018) فإن لمسحوق أوراق وبذور المورينغا الذي زُرع في العراق وما يحويهِ من المركبات الكيميائية النباتية مثل مضادات الأكسدة والأحماض الدهنية والتي حُددت بإستعمال التقنيات الحديثة مثل القياس الطيفي الكتلي للغاز Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) والذي كان له الدور العلاجي والوقائي ضد التلف والتسمم الكبدي أي بمعنى نشاط مضاد لليرقان Jaundice وترميم التلف النسيجي.

وتم الإثبات إنّ تناول أوراق المورينغا الطازجة يؤدي إلى خفض ضغط الدم Hypotensive بسبب احتوائها على الكلايكوسيدات Thiocarbamate glycosides و Mustard oil glycosides ، وبسبب احتوائها على الستيرولات النباتية Phytosterols فإنها تؤدي إلى تقليل مستوى الكولسترول الدم بواسطة التثبيط التنافسي وتحسين وظائف الكبد وانزيمات القلب والحد من التهاب البروستات Prostatitis وخفض مستوى الالتهابات والألم ومعالجة الصدفية (Dilawar *et al*.,2017).

وعلى وفق دراسة Fombang و Saa (2016) فإن تناول شاي المورينغا بمقدار 200 مل ساعد في انخفاض مستوى السكر بالدم نتيجة لاحتواء أوراق المورينغا على الفلافونويدات ومضادات الأكسدة مثل a-tocopherol والتي أدت لزيادة إفراز الأنسولين وبالتالي المساهمه في خفض مستوى السكر الدم.

بالنظر إلى الدراسات التي اوضحت فإن مستخلصات أوراق المورينغا نتيجة احتواءها على الفلافونويدات والفلافونولات والبوليفينول جعلها تساهم في انخفاض نسبة السكر والبروتينات الدهنية للجرذان المصابة بداء السكر (El-Desouki *et al*., 2015; Muhammad *et al*., 2016) .

إنّ للمورينغا إفرازات صمغ Gum exudates ذات أهمية طبية كبيره في علاج سرطان الأمعاء Intestinal cancer والربو Asthma والزحار Dysentery (Gupta *et al*., 2018) ،إذ إنّ وجود مركبات نشطة بيولوجياً في المورينغا فأنها تمنحها خصائص مضادة للسرطان (Tiloke *et al*.,2018) ، مثل المركبات الفينولية كحامض الكلوروجينيك Chlorogenic acid وحامض الكوماريك Coumaric acid والتي تعلب دور للوقاية من سرطان القولون والمستقيم (Cuellar- Nunez *et al*.، 2017).

وعلى وفق دراسة Vibhute وجماعته (2015) الذي استعمل زيت بذور المورينغا في علاج التهاب المفاصل الرثوي من دون أحداث أي تهيج في الجلد . وكما تعمل المورينغا على العناية بالجلد ، وتقليل أعراض الشيخوخة بسبب احتواءها على العديد من المركبات النشطة مثل الكاروتين وفيتامين C وفيتامين E وفيتامين A والتي تعد من مضادات الأكسدة التي تمنع الجذور الحرة في الجلد (Ali *et al*.، 2013) ومكافحة الربو والالتهاب الرئوي والتهاب الشعب الهوائية وأمراض العين وداء الاسقربوط (David *et al*.,2017)

وهناك دراسة أظهرت إنّ مستخلصات المورينغا يمكن أن يكون لها فعل مقاوم ضد البكتريا مثل *Bacillus subtilis* و *Vibrio cholera* و *Staphylococcus aureus* ذلك فأن المورينغا تستعمل كمضاد مكروبي امن ورخيص (Viera *et al*., 2010)

وتم الأشارة في احدى الدراسات إن مستخلصات أوراق المورينغا لها دور تثبيطي ضد البكتريا المرضية للإنسان بشكل خاص المكورات العنقودية الذهبية (Alsaraf *et al*., 2016). اثبت Sutalangka وجماعته (2013) بإن هناك دور فعال للمورينغا لتحسين الذاكرة وعلاج الخرف Dementia .

(14-2): المواد الفعالة في أوراق المورينغا The Active Substances in Moringa Leaves

(1-14-2): الستيرولات النباتية Phytosterols

تمثل مركبات طبيعية ثانوية الأيض ويتم إنتاجها في النباتات وتملك قيمة علاجية كبيرة ، وتستعمل في صناعة الأدوية كمادة أولية (Talreja and Goswami، 2016). والستيرول Sterol هو واحد من مكونات أغشية الخلايا حقيقية النواة وهو من المكونات التركيبية الأساسية للاغشية الذي يعمل كمضاد طبيعي

للكوليستيرول إذ له بنية متماثلة مع الكوليستيرول ولكن معاكس له في العمل إذ يملك القابلية على تقليل نسبة الكوليستيرول في الدم ومنع امتصاصه من قبل الأمعاء بفعل التثبيط التنافسي (Alphonse *et al*.، 2017).

وتعد شجرة المورينغا من النباتات الغنية بالستيرولات النباتية مثل Stigmasterol Sitosterol وCampesterol والتي تمثل المادة الأولية لتصنيع الهرمونات وترفع من إنتاج هرمون الاستروجين الذي يعمل لتحفيز قنوات الغدد اللبنية على إنتاج الحليب (Mutiara *et al*.، 2013)، كما تملك مادة Stigmasterol دور الأكبر في ازالة مسببات سرطان القولون عن طريق اتصاله بالمواقع الفعالة للمسببات وبالتالي تثبيط عملها (Jauhari *et al*.، 2017).

(2-14-2):الأحماض الدهنية Fatty Acids

بناء على ماجاء في دراسة Christie and Han (2012) بأن الأحماض الدهنية هي الوحدات الأساسية للدهون أو الكليسيريدات الثلاثية وهي أحماض كاربوكسيلية اليفاتية تكون بنوعين أما مشبعة Saturated أو غير مشبعة Unsaturated .

وتحتوي المورينغا على الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة ومن بين الأحماض الدهنية غير المشبعة المهمه في غذاء الإنسان هو حامض اللينوليك Linoleic acid والذي يقع ضمن مجموعة 6-Omega ولا يصنعه جسم الإنسان وحامض الفا لينولينك a-Linolenic acid الذي يقع ضمن مجموعة 3-Omega والتي تحمي الأغشية الخلوية وتُعد مصدر للطاقة وتلعب دوراً في مقاومة أمراض القلب والتهاب المفاصل (Oliveira *et al*., 2014).

(3-14-2):الفيتامينات Vitamins

بناء على ماجاء به Elsohaimy وجماعته (2015) تدخل الفيتامينات من ضمن مكونات المورينغا ،إذ تحتوي على الكثير من الفيتامينات ومنها فيتامين A وفيتامين B وفيتامين C وفيتامينE .

توجد كميات كبيرة من مجموعة فيتامينات B في المورينغا التي تعمل على تسريع عملية الأيض الغذائي ، وتقوية الجهاز المناعي وتعزيز نمو الخلايا بما في ذلك كريات الدم الحمراء ،وبالتالي تقي من فقر الدم، والمحافظة على صحة الأنسجة العضلية والجلد والشعر (Ademiluyi *et al*.، 2018). فضلاً عن كون فيتامين B محسن لامتصاص البوتاسيوم والمغنيسيوم وبالتالي يساهم في استرخاء العضلات وتقليل حدة

القلق والاكتئاب والصداع ، ويقوم بتحويل السكريات إلى طاقة مما يؤدي إلى ارتفاع مستويات الطاقة بالجسم طبيعياً بدون الحاجة إلى أي منبهات (Moyo *et al*.,2011).

في حين فيتامين C فهو ذائب في الماء وغير قابل للذوبان في الدهون ويتوزع في كل أجزاء نبات المورينغا ويعد من مضادات الأكسدة الضرورية، لدوره الوقائي ضد الإجهاد التاكسدي ويستطيع معادلة نوع الأوكسجين النشط (ROS) ويثبط التلف التاكسدي المتكون بفعل الجذور الحرة وبالتالي المساعدة في تثبيط عملية تكوين بيروكسيد الدهون. (Ahmed *et al*., 2016).

(2-14-4): الفلافونويدات Flavonoids

تعد الفلافونويدات مركبات فينولية ذات إنتشار واسع في النباتات فهي تمثل النواتج الثانوية للأيض في النباتات وتساهم في حماية الجسم من الأمراض السرطانية والقلبية من خلال خفض الإجهاد التاكسدي بفعل الجذور الحرة (David *et al*., 2017).

تتميز المورينغا باحتوائها على مركبات نشطة مثل حامض الكلوروجينك Chlorogenic acid وحامض الكيومارك Coumaric acid والتي تساهم في الوقاية الكيميائية لسرطان القولون وسرطان المستقيم (Cuellar-Nunez *et al*.,2018). وقد لوحظ إنّ فلافونويدات أوراق المورينغا تعطي وقاية لجسم الإنسان من الاجهادات البيئية بفعل التلوث بالعناصر الثقيلة كالرصاص والذي يسبب الانحلال لكريات الدم الحمراء (Sharayu and Asmita, 2017).

تساعد الفلافونويدات على تحفيز النظام الأنزيمي الوقائي في الإنسان وحماية الجسم من العديد من الأمراض ذات العلاقة بتقدم العمر ، وبالإجهاد التاكسدي مثل أمراض السكري والسرطان والقلب والزهايمر (Kumar & Pandey, 2013).

كما تم الإشارة إلى إن أوراق المورينغا تحتوي على الفلافونويدات ومن أبرزها الروتين Rutin واللوتيولين Luteoline والكيورستين Quercetin (Khudaer *et al* ., 2016) ، ويتميز الكيورستين بأن له دور في حماية الكبد من التسمم لكونه مضاد للأكسدة (Ali *et al*., 2016) . علاوة على ذلك، فإنّ من أهم الفلافونويدات في نبات المورينغا هي الكيورستين والكامبفيرول Kaempferol والتي تحافظ على الصحة وتقلل من خطر الأمراض (Lin *et al*., 2018) .

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

3 - المواد وطرائق العمل Materials and Methods

(1-3) : المواد والأجهزة المستعملة

(1-1-3) : الادوات والمعدات Equipment and instruments

الادوات والمعدات المستعملة في هذه الدراسة:

جدول (1.3) : الادوات والمعدات والشركات المصنعة لها

ت	المعدات	المنشأ	الشركة المصنعة
1	أطراف الماصة الدقيقة (1 مل) Micropipette tips (1 ml)	Germany	Hettich
2	انابيب ابندروف Eppendrof tubes	Belgium	BioBasic Inc.
3	أنبوب جل لفصل المصل Serum separation gel tube	Belgium	BioBasic Inc.
4	جهاز سوكسيليت Soxhlet extractor	Germany	Heidolph
5	جهاز طرد مركزي Centrifuge	Germany	Hettich
6	جهاز المشراح اليدوي الدوار Rotary Microtome	Italy	Histo-Line
7	حمام مائي Water bath	Germany	Tafesa
8	سخان حراري Hot plate	Korea	LabTech
9	شراح زجاجية Glass slide	China	Mheco
10	طاحونة كهربائية Electric grinder	Turkey	Nawal
11	عدة تشريح Anatomy equipment	China	MMC
12	علب حفظ العينات Sample storage boxes	Iraq	
13	فرن كهربائي Electric oven	Turkey	Nawal
14	الماصة الدقيقة 1 (مل(1 ml) Micropipettes	Germany	Slamed
15	مجمدةFreezer	Lebanon	Concord
16	مجهر ضوئي Light Microscope	Germany	Motic
17	محاقن طبية (5 مل) Medical needles (5 ml)	China	JiangSu JiChun
18	محرك مغناطيسي Magnetic stirrer	USA	Tomy

19	مشارط طبية Medical scalpels	China	GAMMA
20	ميزان حساس Sensitive balance	Germany	Sartorius
21	ميزان وزن Weighing scale	China	Ingeco
22	Sonicator	Germany	Wisd
23	كامرة رقمية Digital camera	Japan	Canon

3-1-2 المواد الكيميائية Chemicals and solutions

المواد الكيميائية والمحاليل المستعملة في هذه الدراسة والمبينة في جدول (3-2)

جدول 3 - 2 المواد الكيميائية و المحاليل والشركات المصنعة لها:

ت	اسم المادة الكيميائية	المنشأ	الشركة المصنعة
1	ايثانول مطلقEthanol absolute	England	Gainland Chem. Comp.
2	زايلينXylen	England	Gainland Chem. Comp.
3	شمع البارافين-Paraffin wax paraplast wax.55 60c milting point	England	BDH Chemical
4	صبغة الايوسينEosin Stain	England	BDH Chemical
5	صبغة الهيماتوكسلينHematoxylin stain	England	BDH Chemical
6	فورمالينFormalin	USA	Biosolve
7	ماء مقطرDistilled water		
8	بنزوات الصوديوم sodium benzoate	south Australia	ChemSupply
9	عُدة قياس (AST, ALP, ALT) kit	Italy	sanymed
10	عُدة قياس (SOD, GST, CAT) kit	Britain	BDH
11	زايلزين Xylazine	Holland	Alpha San

12	كيتامين Ketamine	Holland	Alpha San
13	DPX mountant	Germany	Merck
14	اوراق المورينغا اوليفرا Moringa oleifera leaves	Iraq	

(2-3): طرائق العمل Method

(1-2-3) : حيوانات التجربة Experiment Animals

تم الحصول على 30 ارنباً من ذكور الأرانب البيضاء ذات العيون الحمراء ، إذ تم الحصول عليها من بعض مربي الأرانب فـي محافظتي كربلاء وبغداد ، ويتـــراوح وزنها (762 – 1809) غم . وتم إيواء الحيوانات في البيت الحيواني لكلية الطب البيطري / جامعة كربلاء كما في الشكل (3-1) تحت درجة حرارة مناسبة (25 ± 5) درجة مئوية ، وبدأت الدراسة في تشرين الثاني من عام 2021 واستمرت لمدة 30 يوم ، إذ تُركت الأرانب لمدة أسبوعين لأجل التأقلم وتمكنت من الحصول على مياه الشرب واتباع نظام غذائي اعتيادي، ثم قسمت إلى خمسة مجاميع رئيسة ، فضلاً عن مجموعة سادسة عدت مجموعة سيطرة سالبة سُمح لها بتناول الخضروات والعلف ومياة الشرب بدون معاملة طيلة مدة التجربة ووضعت المجاميع في أقفاص كبيرة مجهزة بمعالف خاصة .

الشكل (3-1): مجموعة من الارانب المُعده للتجربة في البيت الحيواني

(2-2-2): مجاميع الحيوانات Animal groups

تم تقسيم 30 أرنباً عشوائياً الى ست مجاميع وكل مجموعة تضم 5 أرانب ووضعت في اقفاص من الألمنيوم بأبعاد (50×40×50)سم للطول والعرض والارتفاع على التوالي، قفص واحد لكل مجموعة.

وقد تم تقسيم الحيوانات كالآتي :

1 .مجموعة السيطرة السالبة القياسية (Control group) C1 : في هذه المجموعة تم الاعتماد على النظام الغذائي الاعتيادي واعطيت ماء مقطر بدون المعاملة ببنزوات الصوديوم او مستخلص المورينغا طوال مدة التجريع لمدة 30 يوما.

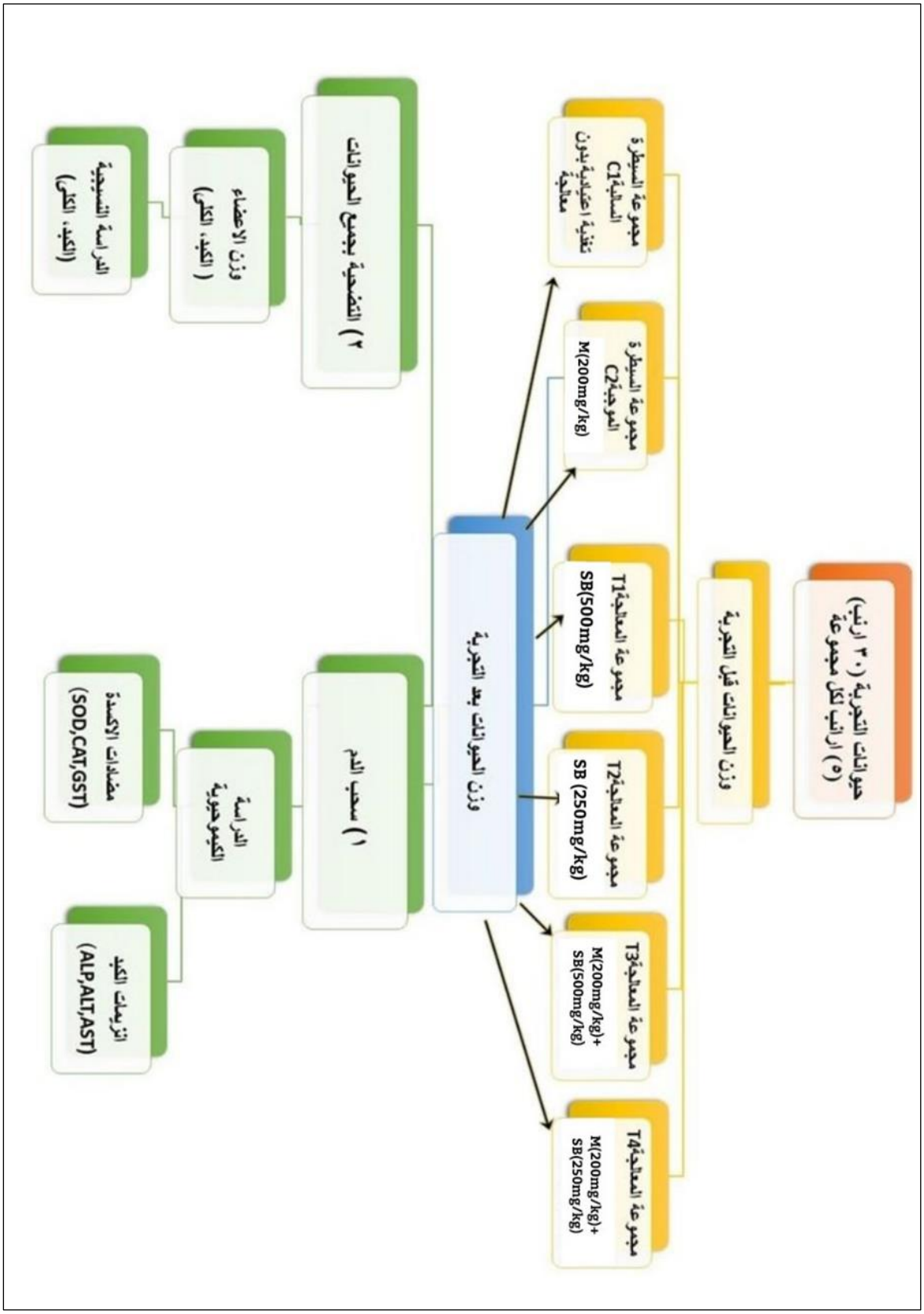
2 .مجموعة السيطرة الموجبة القياسية (Control group) C2 : تم تجريع الارانب بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كيلوغرام/وزن الجسم) لمدة 30 يوما (Akinrinde et al., 2020).

3. المجموعة الاولى T1 المعاملة: تم تجريع الارانب بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كيلوغرام/وزن الجسم) لمدة 30 يوما (Al-Ameen et al.,2022).

4. المجموعة الثانية T2 المعاملة: تم تجريع الارانب بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كيلوغرام/وزن الجسم) لمدة 30 يوما (Walczak-Nowicka and Herbet, 2022) .

5. المجموعة الثالثة T3 المعاملة: تم تجريع الارانب بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كيلوغرام/وزن الجسم) بعد مرور نصف ساعة تم التجريع بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كيلوغرام/وزن الجسم) لمدة 30 يوما.

6. المجموعة الرابعة T4 المعاملة: تم تجريع الارانب بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كيلوغرام/وزن الجسم) بعد مرور نصف ساعة تم التجريع بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كيلوغرام/وزن الجسم) لمدة 30 يوما .



الشكل (3-2): تصميم التجربة، يشير الحرف M لمستخلص المورينغا Moringa اما SB يمثل بنزوات الصوديوم Sodium benzoate

3-2-3: وزن حيوانات التجربة Weights of experiment animals

تم استعمال ميزان اعتيادي لغرض وزن الحيوانات ، فضلاً عن استعمال حاوية بلاستيك اثناء الوزن ، ووزنت حيوانات التجربة قبل البدء بالتجربة وبعد إنتهاء مدة التجريع والتي استمرت ل30 يوماً ، تم وزن الحيوانات مجدداً قبل التشريح ووزنت الأعضاء (الكبد والكلى) بعد استئصالها من الحيوانات.

4-2-3 : تحضير بنزوات الصوديوم: sodium benzoate preparation:

تم تذويب 31.250غرام من بنزوات الصوديوم في 250 مل من الماء المقطر ليتكون محلول يحوي كل 1 مل منه على 125 ملغم من بنزوات الصوديوم ، وتم تجريع الارانب بتركيز عالٍ منها (500 ملغم/كلغم) وتركيز واطى (250 ملغم/كلغم) .

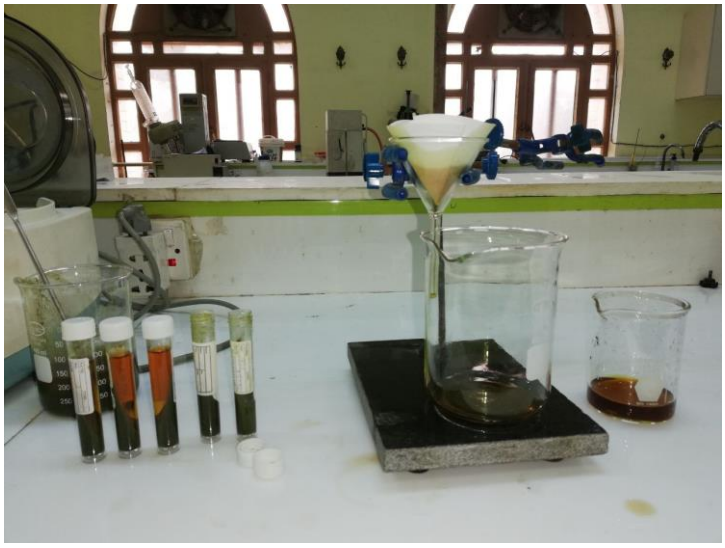
5-2-3 : تحضير مستخلص لاوراق نبات المورينغا Preparation of Moringa leaves extract

تم عمل مستخلصات من اوراق المورينغا اوليفيرا بطريقتين لاختيار الطريقة الاكثر ملائمة ، وتم الاعتماد في تجربتنا على الطريقة الاولى باستعمال مزيج من الماء وكحول الايثانول، وبمساعدة الموجات فوق الصوتية لان هذه الطريقة كانت سريعة بالاستخلاص وتعطي مستخلص جيد الذوبانية في الماء ، بينما الطريقة الثانية باعتماد جهاز السكسوليت استغرقت وقت اطول والمستخلص غير جيد الذوبانية في الماء .

1-5-2-3: الأستخلاص الكحولي بمساعدة موجات فوق صوتية Ultrasound-assisted extraction

تم عمل محلول من 20غرام من مسحوق أوراق المورينغا بواسطة خلطها مع 200 مل ايثانول وماء مقطر بواقع كحول 50 % ثم وضع المحلول في جهاز Sonicator لغرض تحطيم الأنسجة النباتية بواسطة موجات فوق صوتية لنصف ساعة مع مراقبة درجة الحرارة على ان لا تعلو 40 درجة مئوية، بعد ذلك تم استعمال جهاز الطرد المركزي centrifuge بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق فصل المكونات بحسب الوزن الجزيئي، ثم رُشح بواسطة ورق الترشيح كما في الشكل (3-3) وتم أخذ الراشح وإهمال العالق وأخيراً جُفف الراشح باستعمال الحمام المائي hot bath مع تثبيت درجة الحرارة على 78 درجة مئوية حتى تبخر المحلول وتكونت كتلة من مادة صلبة والتي تمثل مستخلص المورينغا . وتم الحصول على 4 غم

مستخلص جاف من أصل 20 غم من مسحوق أوراق المورينغا، تم وزن 8 غم من المستخلص الجاف واذابته في 160 مل ماء مقطر، للحصول على محلول لاستعماله فـــي عمليــة التجريع لاحقــاً (Rodríguez-Pérez *et al*., 2013)



الشكل (3-3):ترشيح مستخلص اوراق المورينغا

3-2-5-2: الاستخلاص الكحولي بإستعمال جهاز السوكسليت Soxhlet extractor

تم طحن أوراق المورينغا الجافة جيداً وتنقيتها من الشوائب ثم تم ملء Thimble من السليلوز بـ50غم من أوراق المورينغا المطحونة ووضعها في جهاز السوكسليت Soxhlet extractor كما في الشكل **(4-3)** ، إذ استعمل كحول الإيثانول (الاثيل المطلق) في استخلاص أوراق المورينغا من خلال تسخين الكحول بواسطة جهاز تسخين كهربائي، وبعــد 4 – 5 ساعات من تشغيل الجهاز تم جمع المستخلص ، والمستخلص كان يحوي على كحول الاثيل، ليتم وضع المستخلص في الحمام المائي مع تثبيت درجة الحرارة على 78 درجة مئوية للتخلص من الكحول ، واخيراً تم الحصول على الراسب من المستخلص وكان الوزن يتراوح بين 3-4 غم مستخلص. (Ghasi *et al*.,2000).

الشكل (3-4):جهاز السكسوليت

(6-2-3) : جمع عينات الدم Blood samples collection :

تم أخذ عينات الدم بواسطة طعنة القلب بعد إعطاء الأرانب لمزيج من المخدر المتمثل بالكيتامين Ketamine ومهدئ الأعصاب الزايلزين xylzine ، وتّم سحب 10 مل من الدم مباشرة بوساطة طعنة القلب Cardiac puncture كما في الشكل (3-5) ، لغرض الحصول على أكبر كمية ممكنة من الدم، ووضعت عينات الدم بداخل أنبوب جل لفصل المصل Serum separation gel tube ، وتركت لمدة لا تقل عن نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة . ثم نقلت الأنابيب الى جهاز centrifuge بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولعشر دقائق. ثم نُقل المصل بواسطة ماصة دقيقة Micropipettes، ووضعت في أنابيب ابندروف tubes Eppendrof وأُرسلت الى المختبر لإجراء تحاليل انزيمات الكبد AST,ALT,ALP وبعض معايير الاجهاد التاكسدي مثل انزيمات مضادات الاكسدة مثل catalase, superoxide dismutase و وانزيم GST

الشكل (3-5): جمع عينات الدم بواسطة طعنة القلب

(7-2-3): تشريح الحيوانات Dissection of animal

بعد انتهاء مدة التجربة وهي 30 يوماً تم تشريح الحيوانات بعد صيام الحيوانات لمدة 24 ساعة وسمح لها بشرب الماء، بعد التخدير ، وبعد الحصول على عينات الدم تم استئصال (الكبد والكلى) وذلك بعمل شق طولي بطني باستخدام العدة الخاصة بالتشريح كما في الشكل (3-6)، و قيست أوزان الاعضاء (الكلية اليمنى ، الكلية اليسرى والكبد) باستعمال ميزان حساس، ثم نقلت الى علب حفظ العينات التي تحتوي على الفورمالين بتركيز 10 % لغرض حفظها وعمل المقاطع النسجية.

الشكل (3-6) : تشريح ارنب واستئصال كل من الكبد والكلى

8-2-3 : تحضير المقاطع النسيجية Preparation of histological sections

تم الاعتماد في تحضير المقاطع النسيجية بحسب طريقة Suvarna وجماعته (2018) وهي كما يأتي : تم إزالة المثبت والمتمثل بمحلول الفورمالديهايد solution Formaldehyde من نماذج الكبد والكلى بواسطة غسلها بالماء لنصف ساعة ولمرات عدة بعد ذلك حُفظت العينات بالكحول الأثيلي بتركيز 50 % من أجل إجراء العمليات الخاصة بتحضير المقاطع النسجية وحسب الخطوات الآتيه :

1.الأنكاز Dehydration :

بعد غسل العينات بالماء تم نقلها الى سلسلة من التراكيز الكحول الأثيلي التصاعدية لغرض سحب الماء من داخل العينة، وكانت سلسلة تراكيز الكحول الأثيلي كالآتي :

أ. كحول اثيلي بتركيز 70 % لساعتين.

ب. كحول اثيلي بتركيز 80 % لساعتين .

ج. كحول اثيلي بتركيز 90% لساعتين .

د. كحول اثيلي بتركيز 95 % لساعتين.

ه. كحول اثيلي بتركيز 100 % لساعتين.

و. كحول اثيلي بتركيز 100 % لساعتين.

2. الترويق Clearing :

تم وضع العينات لمدة 5 دقائق في الزايلين Xylene لغرض ترويق العينات وجعلها شفافة وتصبح سهلة الإرتشاح مع الشمع لتهيئة العينات للخطوة التالية .

3. الارتشاح Infiltration :

تم نقل العينات الى قناني زجاجية تحتوي شمع البارافين Paraffin wax والزايلين بنسبة 1:1 وتوضع في الفرن لمدة ساعة وحدة ، بعدها تم نقل العينات الى قناني تحتوي على شمع البارافين ذو درجة انصهار 55 درجة مئوية لمدة 2 ساعة في فرن كهربائي درجة حرارته (59 – 60) درجة مئوية ،وذلك من أجل

إبقاء الشمع منصهراً ،ولغرض ضمان التشرب الكامل للعينات ، بعدها تم نقلها الى قناني آخرى لساعتين ايضاً داخل الفرن وتحتوي القناني على شمع البارافين المنصهر لغرض السماح بدخول الشمع بين خلايا النسيج لاعطائه تقوية لعملية الطمر التالية.

4. الطمر Embedding :

تم طمر العينات بشمع البارافين من أجل تهيئتها لعملية التقطيع ، إذ تم سكب الشمع المنصهر فوق العينات الموجودة في قالب خاص Block من أجل تجهيزها لتقطيعها الى مقاطع نسجية رقيقة. وعند سكب الشمع داخل القالب يجب ان يسكب مرة واحدة من دون تردد لغرض منع تكون طبقتين من الشمع او تكون فقاعات هوائية داخل الشمع، وتم تبريد القالب بوساطة الماء البارد بسرعة .

5. التشذيب Trimming :

تم شذب وجوه القوالب التي تحتوي على العينات بشكل يلائم حجم العينة من أجل التحضير لعملية التالية، وهي التقطيع .

6.التقطيع Sectioning :

تم وضع القالب الحاوي على العينه في جهاز المشراح اليدوي الدوار Rotary Microtome، وقطعت العينات بسمك (5) مايكرومتر وبشكل شريط Ribbon .

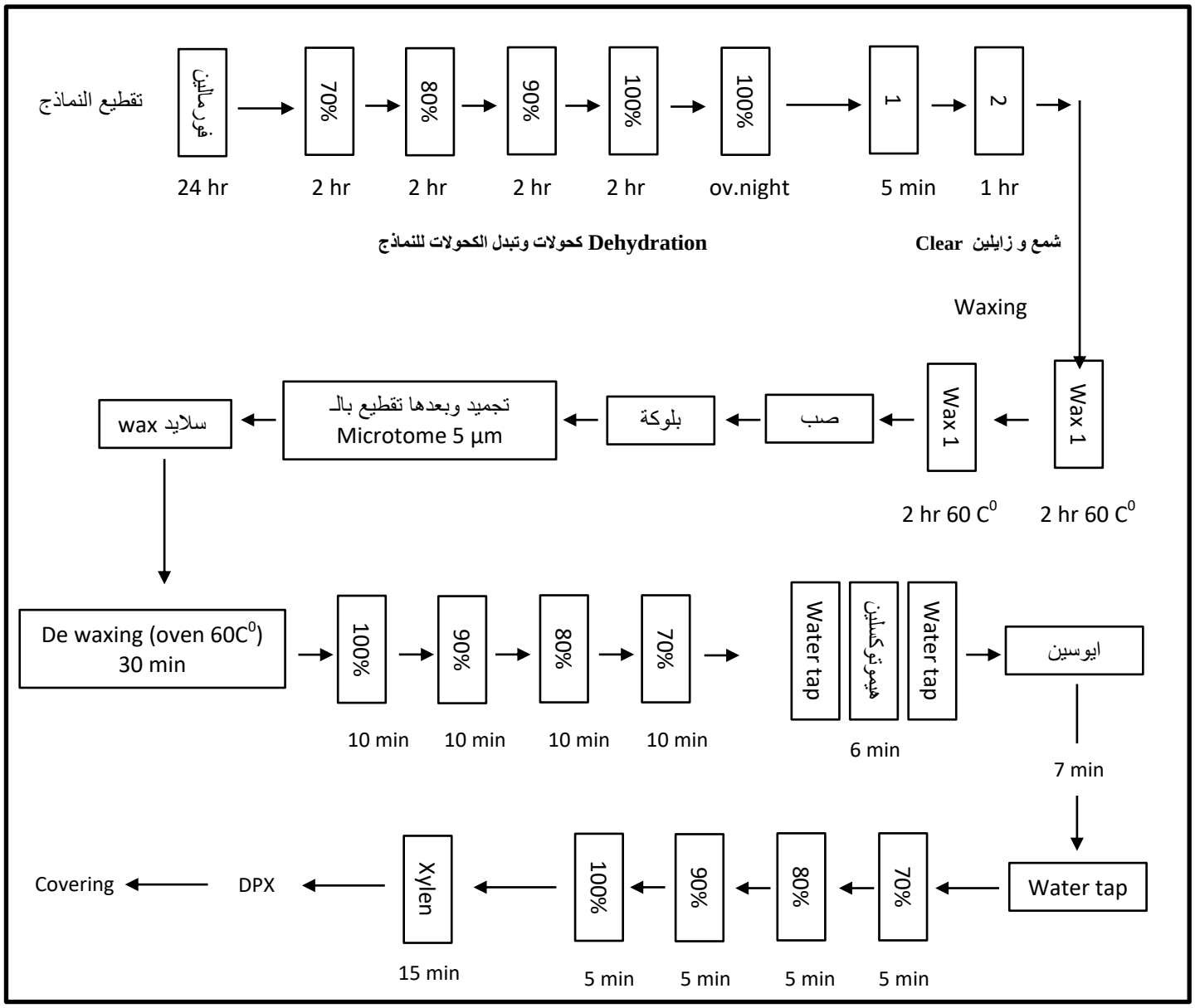
7. التحميل Mounting :

تم استعمال الشرائح الزجاجية ووضع عليها مادة لاصقة albumin Mayers ، وتم تحميل أشرطة المقاطع النسيجية عليها بعد أن تم وضعها في حمام مائي بدرجة حرارة 56 درجة مئوية لدقيقتين لغرض فرش النسيج ، بعدها تم ترك الشرائح لتجف على صفيحة ساخنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ل 24 ساعة.

8. التصبيغ Staining:

تم وضع الشرائح الزجاجية لنصف ساعة في محلول التولوين Toluene لغرض إزالة شمع البارافين من العينات ، وتم تمرير الشرائح الزجاجية في سلسلة تنازلية من الكحول الأثيلي لمدة 10 دقائق في كل تركيز تبدأ بالزايلين وبعدها كحول اثيلي 100% ،100% ، 90% , 80 % و 70 % لغرض استعادة امتصاص

الماء الى داخل النسيج Hydration . ثم مررت العينات في الماء المقطر 5 دقائق وبعدها وضع العينات في محلول صبغة الهيماتوكسلين Haematoxylin لمدة 6 دقائق ثم غطست بالماء المقطر أربع مرات ، ومن ثم بالكحول الحامضي مرتين، بعدها تم غسلها بماء الحنفية الجاري ولمدة 5 دقائق ووضعت في صبغة الأيوسين Eosin لمدة 7 دقائق ثم غطست بماء الحنفية 5 – 7 مرات ، وثم مررت الشرائح بسلسلة تصاعدية من الكحول الأثيلي وبتراكيز 70 ، % 80 ، % 90 % و 100 % لمدة دقيقتين ثم وضعت العينات في محلول الزايلين لغرض الترويق



الشكل (3-7) : مخطط يوضح خطوات التقطيع النسيجي للأعضاء

9-2-3: فحص وتصوير المقاطع النسجية: Examining and photoimaging of histological sections

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

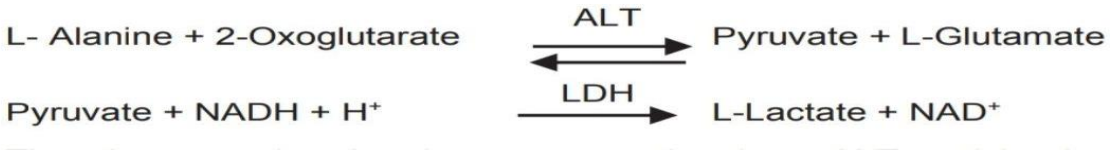
10-2-3 : الفحوصات الكيموحيوية: Biochemical assays

1-10-2-3: تقدير مؤشرات السمية الكبدية

3. تقدير نشاط ALT :

1. مبدأ العمل principle of method

وضح Bergmeyer وجماعته (1978) مخطط التفاعل وهو كما يلي :



تم قياس الانخفاض في الامتصاصية بما يتناسب مع نشاط ALT في العينة ، عند 340 نانومتر .

2. مكونات الكاشف Reagent composition

R1 ALT (GPT) IFCC	Reagent 1
2-Oxoglutarate	15 mmol/L
L-Alanine	500 mmol/L
LDH	≥ 1600 UI/L
NADH	≤ 0.18 mmol/L
Tris Buffer	100 mmol/L
pH at 30°C	7.50 ± 0.1

3. طريقة العمل procedure

Pipette in 1cm pathlength thermostated cuvette	
Reagent 1	1000 µL
Bring at 37°C, then add:	
Calibrator, Control or Specimen	100 µL
Mix. Start a timer. Record initial absorbance after 60 sec at 340 nm. Record the absorbance again every minutes during 180 sec. Measure absorbance change per minute (△Abs/min).	

4. الحسابات Calculations

$$\text{ALT Activity} = \frac{(\Delta\text{Abs/min) Specimen}}{(\Delta\text{Abs/min) Calibrator}} \times \text{Calibrator Activity}$$

With Theoretical Factor:

Activity (U/L) = ΔAbs/min x Factor

$$\text{Factor} = \frac{\text{VR} \times 1000}{6.3 \times \text{VE} \times \text{P}}$$

With:
VR = Total reactional volume (mL)
VE = Specimen volume (mL)
6.3 = Molar extinction coefficient for NADH at 340nm
P = Pathlength (cm).

3. تقدير نشاط AST :

1. مبدأ العمل principle of method

وضح Reitman and Frankel(1957) مخطط التفاعل وهو كما يلي :

$$\text{L-Aspartate} + \text{2-Oxoglutarate} \xrightleftharpoons{\text{AST}} \text{Oxaloacetate} + \text{L-Glutamate}$$

بعد ذلك ، تتفاعل الأوكسالات مع 2 ، 4 DNPH لتشكيل 2 ، 4 ثنائي نتروفينيل هيدرازونات ، والتي تمتص عند 505 نانومتر في المحلول القلوي الذي يتناسب مع نشاط AST أو ALT في الخليط التفاعلي.

2. مكونات الكاشف Reagent composition

R1	**GOT / AST**	Substrate	
Phosphate Buffer pH 7.5		85	mmol/L
L-Aspartate		200	mmol/L
2-oxoglutarate		2	mmol/L
Preservative			
R3	**GOT / AST**	Dye	
2,4-dinitrophenyl-hydrazine (DNPH)		1	mmol/L
HCl		1	mol/L
EUH210: Safety datasheet on request (HCL 2.5 - < 10%)			
R4	**GOT / AST**	Standard	
Sodium Pyruvate		2	mmol/L
Sodium Mercurothiolate		0.1	%
Phosphate Buffer pH 7.5		100	mmol/L
Preservative			

3. طريقة العمل procedure

Pipette into test tubes:	
Reagent R2	1 mL
Incubate for 5 minutes at 37°C. Add:	
Serum	200 µL
Mix and incubate at 37°C during:	Exactly 1 hour
Reagent R3	1 mL
Mix and let stand 20 minutes at room temperature. Add:	
NaOH 0.4 N	10 mL
Mix. Let stand 5 minutes and read absorbances at 505 nm against water.	

3. تقدير نشاط ALP :

1. مبدأ العمل principle of method

وفق دراسة (Kind and king, 1956 ; Belfield et al., 1971) تم التحديد اللوني لنشاط ALP على النحو التالي :

يتفاعل الفينول الحر الذي يتحرر عن طريق التحلل المائي للركيزة بعد ذلك مع 4-أمينو-أنتيبيرين في وجود فيريسيانيد البوتاسيوم القلوي لتشكل مركبًا أحمر اللون والذي تقاس امتصاصه عند 510 نانومتر ويتناسب طرديا مع نشاط ALP في العينة.

2. مكونات الكاشف Reagent composition

R1	**ALKALINE PHOSPHATASE**	Substrate-Buffer	
Disodium Phenyl phosphate		5	mmol/L
Carbonate-bicarbonate buffer pH 10		50	mmol/L
Stabilizer			
R2	**ALKALINE PHOSPHATASE**	Standard	
Phenol corresponding to 20 U King and Kind			
R3	**ALKALINE PHOSPHATASE**	Blocking Reagent	
4-Amino-antipyrine		60	mmol/L
Sodium arsenate		240	mmol/L

3. طريقة العمل procedure

Prepare tubes as follows :	Reagent blank	Specimen blank	Standard	Assay
Reagent R1	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Incubate 5 minutes at 37°C.				
Specimen				50 µL
Reagent R2 (Standard)			50 µL	
Let stand **exactly 15 minutes at 37°C.**				
Reagent R3	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Mix well.				
Reagent R4	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Specimen		50 µL		
Demineralised water	50 µL			
Mix. Incubate 10 minutes at room temperature and away from light. Read absorbances of the blank specimen, standard and assay at 510 nm against reagent blank. Coloration is stable for 45 minutes away from light.				

4. الحسابات Calculations

1) Results (Kind and King unit):

Quantity of enzyme which, on reaction's conditions, liberates 1 mg of phenol in 15 minutes at 37°C.

$$\text{ALP activity (Kind and King units/ 100 mL)} = \frac{\text{Abs Assay - Abs Specimen blank}}{\text{Abs Standard}} \times 20$$

2) Result (IU/L) = 7,09 x Result (Kind and King Unit/100 mL)

2-10-2-3: تقدير نشاط إنزيمات الإجهاد التأكسدي :

1. تقدير فعالية انزيم Superoxide dismutase (SOD) :

وفق طريقة Marklund وجماعته (1974) تم تحديد نشاط تمت عملية القياس عن طريق استعمال طريقة بسيطة وسريعة ، بناءً على قدرة الإنزيم على منع أكسدة بيروكالول في درجة الحموضة 8.2.

إعداد الكواشف

تريس EDTA -البفر درجة الحموضة 8.2

تم إذابة 2.85 جم من تريس و 1.11 جم من EDTA-Na2 في 1 لتر منDW

محلول بيروكالول (0.2 مم)

تم إذابة وزن 0.252 جم من بيروكالول في محلول قدره 0.06 مل من حمض الهيدروكلوريك المركز المخفف في 1 لتر من.DW

الإجراء

تم ضبط الطيف الضوئي لقراءة الصفر باستعمال المخزن المؤقت تريس .EDTA تم تحضير أنابيب اختبار التحكم والعينة ثم ضخها في أنابيب الاختبار.

الكواشف	محلول الاختبار (µl)	محلول الكفئ(µl)
النموذج	50	-
بفر الترس	1000	1000
الماء المقطر	-	50
بيروكالول	1000	1000

تمت قراءة الامتصاص عند الطول الموجي 420 نانومتر ضد محلول الكفئ في وقت صفر وبعد دقيقة واحدة من إضافة بيروكالول.

حساب فعالية السوبر اوكسيد دسميوتيز

$$\% \text{ Inhibition of pyrogallol autoxidation} = \frac{\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{test}}}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100\%$$

$$\text{SOD Activity (U/ml)} = \frac{\text{\% inhibition of pyrogallol autoxidation}}{50\%}$$

2. تقديرفعالية انزيم الكاتليز Catalase :

تم تقدير الفعاليه وفق طريقة (Hadwan and kadhum., 2018)

اعداد الكواشف

تم تحضير محلول حمض الكبريتيك (0.5 مولاري) بالتخفيف المناسب لحمض الكبريتيك المركز في 200 مل من الماء المقطر.

وتحضير محلول الأمونيوم ميتا فناديت (0.01 M) بأذابة 0.2925 غم من الأمونيوم ميتا فناديت في 200 مل من حمض الكبريتيك المحضر في الخطوة 1.

أما تحضير دارئ الفوسفات (50 ملي مولاري؛ الرقم الهيدروجيني 7.0) فعن طريق خلط المحاليل أ و ب بنسبة 1: 1.5. تم تحضير المحلول (أ) عن طريق إذابة 6.81 جم من KH_2PO_4 في لتر واحد من الماء المقطر، وتم تحضير المحلول (ب) عن طريق إذابة 8.90 جم من $Na_2HPO_4.2H_2O$ في لتر واحد من الماء المقطر. ومحلول بيروكسيد الهيدروجين القياسي: تم تحضير محلول H_2O_2 الطازج (10 ملي مولاري) عن طريق مزج 0.1134 مل من 30٪ H_2O2 مع 100 مل من محلول دارئ الفوسفات.

طريقة العمل

محلول الكفئ	انبوب الاختبار القياسي	انبوب اختبار النموذج	الكواشف
-----	------	100 µl	مستخلص النموذج القياسي
3000 µl	1000 µl	900 µl	دارئ الفوسفات
----	2000 µl	2000 µl	بيروكسيد الهيدروجين
امزج الانابيب جيدا ثم احضن في حمام مائي بدرجة 37 سيليزي لمدة دقيقتين.			
2000 µl	2000 µl	2000 µl	كاشف الامونيوم فناديت
بعد ذلك، احفظ الانابيب في درجة حرارة الغرفة لعشر دقائق، ثم اقرأ الامتصاصية عند طول موجي 452 نانو متر.			

الحسابات

تم حساب فعالية انزيم الكاتليز من المعادلة التالية:

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

حيث S^o هي امتصاصية الانبوب القياسي و S هي امتصاصية أنبوب اختبار النموذج.

3. تقدير فعالية الكلوتاثيون- S- ترانسفيراز (GST) :

تم تقدير فعالية الكلوتاثيون -S - ترانسفيريز بطريقة (Habig et al. 1974) يتكون خليط التفاعل من 1.575 مل من محلول فوسفات الصوديوم (0.1 مولاري ، والرقم الهيدروجيني 7.4) ، و 0.2 مل من الكلوتاثيون المختزل (1 ملي مولاري) ، و 0.025 مل CDNB 1ملي مولاري) و 0.2 مل من المصل بحجم إجمالي 2.0 مل. تم تسجيل التغيرات في الامتصاصية عند 340 نانومتر وتم حساب نشاط الإنزيم على شكل اتحاد nmol CDNB / دقيقة / ملغم مكون بروتين باستخدام معامل امتصاص مولاري يبلغ 9.6×10^{3} م $^{-1}$ سم

Enzymatic activity =

$$\frac{\text{O.D of test} - \text{O.D of blank}}{9.6 \times 0.05} \quad \text{X } 1000 \text{ IU/ltr}$$

11-2-3:التحليل الإحصائي Statistical analysis

تم التعبير عن كل البيانات التي تم الحصول عليها بالمتوسط Mean ± الخطأ المعياري للمتوسط SEM، وتم التحليل الإحصائي لنتائج الكيموحيوية وأوزان الأعضاء بواسطة برنامج GraphPad Prism 8.4.2 بطريقة تحليل التباين أحادي الاتجاه (One way ANOVA)، و التحليل الاحصائي لأوزان الأرانب قبل وبعد التجريع باستعمال برنامج Statistical Package for Social Science (SPSS) بحسب (Kirkpatrick , 2015). عّدت ($P < 0.05$) ذات دلالة إحصائية (Almundarij *et al.*، 2020) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1: التغيرات الوزنية weight change

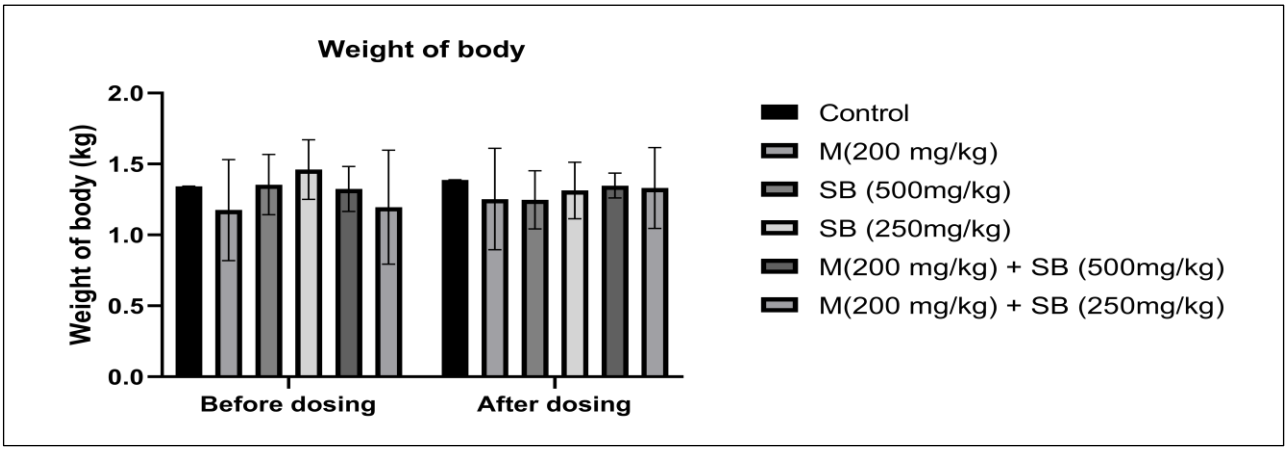
4-1-1: التغير في وزن الجسم Change in body weight

لم تسجل النتائج التي تم التوصل إليها أية فروق معنوية ($P>0.05$) في متوسط أوزان الأرانب قبل التجريع بالمقارنة مع أوزانها بعد التجريع كما مبين في الجدول (4-1) والشكل (4-1).

الجدول (4-1) : تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على أوزان الارانب (كغم) قبل وبعد التجريع

أوزان الارانب (كغم) / مجاميع الارانب	مجموعة السيطرة السالبة	مجموعة السيطرة الموجبة المتمثلة بمستخلص اوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم)	مجموعة التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)
الاوزان قبل التجريع	1.342 ± 0.001	1.175 ± 0.356	1.355 ± 0.212	1.461 ± 0.209	1.324 ± 0.159	1.196 ± 0.402
الاوزان بعد التجريع	1.386 ± 0.003	1.253 ± 0.357	1.247 ±0.204	1.313 ± 0.199	1.348 ±0.087	1.331 ± 0.285

المتوسط mean ± الانحراف المعياري للمتوسطات Standard deviation of means (SD)



الشكل (4-1) : وزن الجسم الكلي قبل وبعد التجريع لمجاميع الارانب المعاملة ببنزوات الصوديوم Sodium benzoate (SB) ومستخلص اوراق نبات المورينغا Moringa (M). القيم تمثل متوسط Mean ± الانحراف المعياري للمتوسطات (SD).

كشفت نتائجنا عن عدم وجود تغيرات معنوية في وزن الجسم في المجاميع المعاملة ببنزوات الصوديوم (250 و 500 ملغم/كلغم) والتي تتفق مع Khoshnoud *et al*., (2017) ; Kehinde *et al*., (2018) حيث لم تغير المعاملة بالبنزوات من وزن الجسم قبل التجريع بالمقارنة مع الوزن بعد التجريع، بينما لم تتفق النتيجة الحالية مع Helal et al., (2019) الذين وجدوا انخفاضًا ملحوظًا في وزن جسم الجرذان المعاملة ببنزوات الصوديوم. واشارت نتائجنا بعدم حدوث فروق معنوية في الوزن قبل التجريع للحيوانات التي جرعت بمستخلص المورينغا مقارنه بوزنها بعد التجريع والتي تتفق مع Gebregiorgis *et al*.,(2012);Bayu *et al*.,(2020). وفي حين لم تتفق نتائجنا مع دراسة Akinrinde وجماعته (2020) التي أشارت إلى زيادة وزن جسم الجرذان المعالجة بمستخلص اوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) .

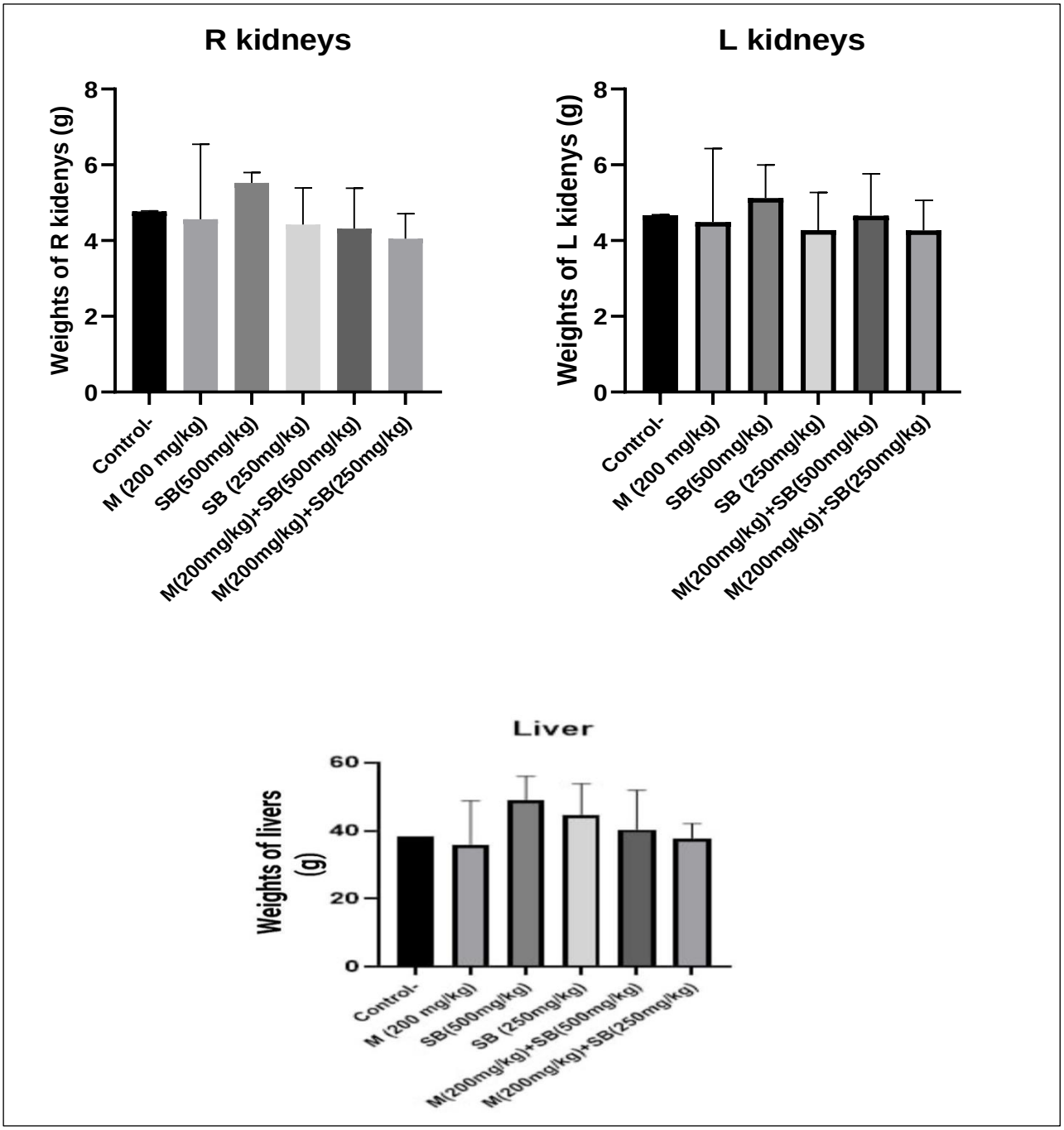
2-1-4: التغير في وزن الأعضاء (الاكباد والكلى) Change in organs weight (livers & kidneys)

لم يتم التسجيل في هذة الدراسة عن وجود فروق معنوية ($P>0.05$) في متوسط أوزان الأعضاء (الاكباد والكلى اليمنى واليسرى) لكل مجاميع الأرانب مثلما مبين في الجدول (4-2) والشكل (4-2).

الجدول (4-2) : تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على أوزان اعضاء الارانب (الكبد والكلية اليمنى واليسرى) (غم)

أوزان الاعضاء (غرام) / مجاميع الارانب	مجموعة السيطرة السالبة	مجموعة السيطرة الموجبة المتمثلة بمستخلص اوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم)	مجموعة التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)	قيمة الاحتمالية P value
الاكباد	38.32 ± 0.015	35.84 ± 12.95	48.88 ± 7.159	44.57 ± 9.228	40.37 ± 11.56	37.81 ± 4.308	0.2068
الكلى اليمنى	4.77 ± 0.015	4.560 ±1.984	5.52 ±60.267	4.426 ± 0.964	4.314 ±1.072	4.052 ±0.659	0.3407
الكلى اليسرى	4.67 ± 0.015	4.490 ±1.943	5.120 ±0.879	4.274 ± 0.995	4.654 ±1.107	4.272 ± 0.789	0.8387

المتوسط mean ± الانحراف المعياري للمتوسطات Standard deviation of means (SD)



الشكل (4-2) : أوزان الاعضاء (الاكباد والكلى اليمنى واليسرى) لمجاميع الارانب المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا(M) ، القيم تمثل متوسط Mean ± الانحراف المعياري للمتوسط (SD).

أظهرت النتائج زيادة في وزن الكبد والكلى اليمنى واليسرى نتيجة تأثير لبنزوات الصوديوم بكلا التركيزين الواطئ والعالي (250 و 500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) عندما جرعت الارانب لمدة 30 يوم ولكن لم تكن هذه الزيادة معنوية على مستوى أحتمالية ($P<0.05$) هذه النتيجة تتفق مع ; Khoshnoud *et al*., (2017) Kehinde *et al*.,(2018) حيث لم تغير المعاملة بالبنزوات من وزن الكبد والكلى بالمقارنة مع كل المجاميع

المعاملة. وتوافق ذلك مع الدراسات السابقة بإن بنزوات الصوديوم تسبب زيادة الوزن المطلق للكبد والكلى في كل من الأرانب والفئران (Oyewole *et al*.,2012; Agarwal *et al*.,2016; Radwan *et al*.,2020) . ومن جانب آخر المعالجة بمستخلص أوراق المورينغا قد خفض وزن الكبد والكلى اليمنى واليسرى وكان الانخفاض غير معنوي مقارنة بالتركيز العالي والواطئ من بنزوات الصوديوم وقلل من تأثير بنزوات الصوديوم في زيادة وزن الكبد والكلى . وذلك لم يتوافق مع دراسة Etchu وجماعته (2017) التي أشارت إلى وجود فروق معنوية في وزن الكبد والكلى في الأرانب.

2-4 المعايير الكيموحيوية biochemical parameters :

1-2-4 انزيمات الكبد Liver enzymes :

وعلى وفق نتائج الدراسة لم يتم ملاحظة اي فروق معنوية ($P>0.05$) في فعالية انزيمات AST , ALP في مجاميع الأرانب التي جرعت بمستخلص أوراق المورينغا اوليفيرا و بنزوات الصوديوم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة كما موضح في الجدول (4-3) والشكل (4-3).

أظهرت النتائج التي تم التوصل إليها وجود انخفاض معنوي($P<0.05$) لفعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة كما في الجدول (4-3) والشكل (4-3).

وأظهرت دراستنا وجود انخفاض معنوي($P<0.05$) لفعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) كما في الجدول (4-3) والشكل (4-3).

وقد لوحظ على وفق الشكل (4-3) وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وكذلك في مجموعة الارانب التي جرعت بالتركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة .

وقد لوحظ على وفق الشكل (4-3) وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وكذلك

في مجموعة الارانب التي جرعت بالتركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم)) بالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) .

وبيّنت النتائج مثلما هو في الشكل (4-3) عن وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ثم عوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة.

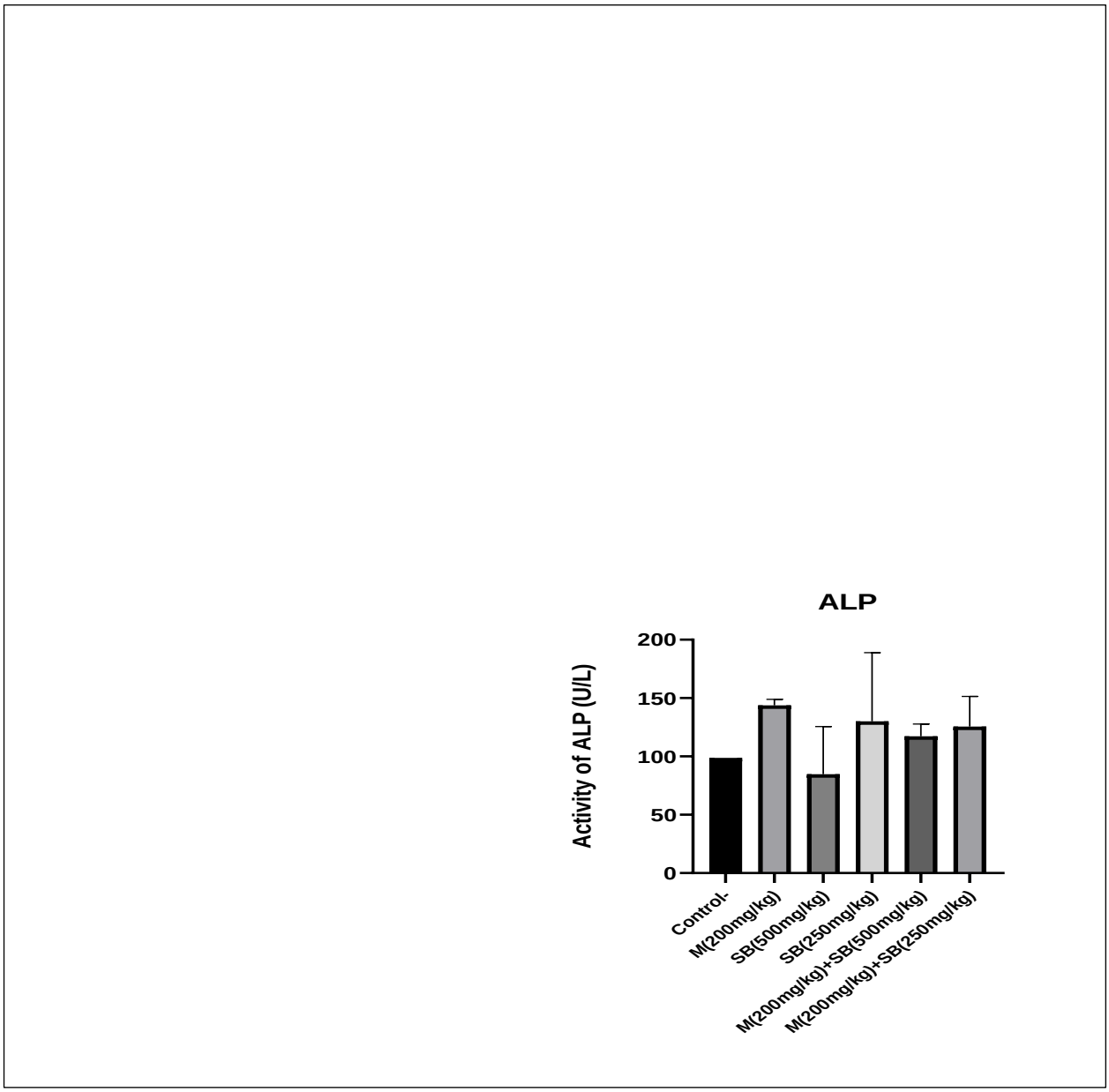
ويُظهر الشكل (4-3) وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) لفعالية أنزيم ALT في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ثم عوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم)

الجدول (4-3) : تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على لفعالية انزيمات الكبد.

انزيمات الكبد / مجاميع الارانب	مجموعة السيطرة السالبة	مجموعة السيطرة الموجبة المتمثلة بمستخلص اوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم)	مجموعة التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)	قيمة الاحتمالية P value
ALP (U/L)	98.78 ± 0.011 **a**	143.8 ± 5.201 **a**	84.77 ± 40.78 **a**	130.0 ± 58.85 **a**	117.2 ± 10.50 **a**	125.7 ± 25.69 **a**	0.071
ALT (U/L)	18.38 ± 0.012 **a**	9.486 ± 4.085 **b**	11.06 ± 5.921 **b**	10.94 ± 8.498 **b**	7.915 ± 5.422 **b**	19.09 ± 7.320 **a**	0.022
AST (U/L)	13.41 ±1.661 **a**	13.59 ±6.836 **a**	12.94 ±9.214 **a**	15.64 ±2.158 **a**	9.904 ± 5.469 **a**	13.13 ±6.277 **a**	0.779

المتوسط mean ± الانحراف المعياري للمتوسطات(Standard deviation of means (SD

تشير الحروف المختلفه الى وجود فروق معنوية بين المجموعة المعاملة في الصف الواحد مع مستوى معنوية ($P<0.05$) والحروف المتشابة الى عدم وجود فروق معنوية .



الشكل (4-3) : معدل فعالية انزيم AST و ALT وALP في مصل الأرانب للمجاميع المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M) ، القيم تمثل متوسط Mean ± الانحراف المعياري للمتوسط (SD).

وفق الدراسة الحالية لم يكن هناك فروق معنوية في مستويات انزيمات الكبد AST و ALP في ما بين المجاميع المعالجة سواء التي جرعت ببنزوات الصوديوم أو بمستخلص أوراق المورينغا اوليفيرا . قد تشير هذه النتيجة إلى أن الضرر الذي سببته بنزوات الصوديوم لم يصل إلى المستوى الذي يمكن أن يؤثر على مستويات انزيمات الكبد في الدم ، ووفقًا لدراسة سابقة عادةً ما تكون مستويات إنزيمات الكبد مرتفعة في السمية الكبدية الحادة Acute hepatotoxicity ، ومع ذلك فإنها تميل إلى الانخفاض مع التسمم لفترات

طويلة بسبب تلف الكبد (Oe,2004) ، وفي الدراسة الحالية ربما تسببنا في نوع من السمية شبه المزمنة الحادة sub-chronic .

ولم تتفق هذه النتيجة مع ما أشارت به الدراسات السابقه في النماذج الحيوانية إلى أن إعطاء بنزوات الصوديوم على المدى القصير تسبب في ارتفاع ملحوظ في انزيمات الكبد مثل (ALT, AST, ALP) (Ibekwe *et al*., 2007 ; Hennigan *et al*., 2012).

أظهرت النتائج في الشكل (4-3) الى وجود انخفاض معنوي($P<0.05$) لفعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ، قد يعود السبب لكون اوراق المورينغا اضافت مضادات اكسدة عززت من حيوية الخلايا الكبدية والكلوية (khudaer *et al*., 2016).

وأظهرت النتائج في الشكل (4-3) الى وجود انخفاض معنوي($P<0.05$) لفعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ، ربما السبب كون استقلاب بنزوات الصوديوم ساهم بتكوين الجذور الحرة والتي سببت اكسدة لمحتويات الخلايا الكبدية والكلوية مثل اكسدة دهون اغشية الخلايا وتكوين بيروكسيد الدهون والذي هو اهم علامات الاجهاد التأكسدي وفضلاً عن اهمية المورينغا الغنية بمضادات الاكسدة والتي بدورها قللت من الجذور الحرة لفعاليتها الوقائية وبالتالي تقليل تسرب انزيم ALT الى الدورة الدموية وتم تسجيل انخفاض لفعاليته في المصل (Oyewole and Oladele,2017).

وقد لوحظ على وفق الشكل (4-3) وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وكذلك في مجموعة الارانب التي جرعت بالتركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة، ولم تتفق هذه النتيجة مع دراسة Oladele *et al*., (2020) التي اشارة الى ارتفاع انزيمات الناقلة لمجموعة الامين Transaminases وهي (AST , ALT) عند المعاملة ببنزوات الصوديوم .

وقد لوحظ على وفق الشكل (4-3) وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي جرعت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وكذلك

في مجموعة الارانب التي جرعت بالتركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ، وربما يكون السبب بأن التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم قد كون الجذور الحرة والتي بدورها اكسدت المكونات الحيوية لاغشية الخلايا كالدهون او البروتينات ، اما مستخلص المورينغا ربما اضاف مضادات اكسدة ولكن لم تكن كافية للوقاية من التأثير الضار لمستقلبات بنزوات الصويوم (Chalasani *et al*., 2004).

وبيّنت النتائج مثلما هو في الشكل (4-3) عن وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم ALT في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ثم عوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة ، ربما يعود السبب لامتلاك مستخلص أوراق المورينغا تأثير إصلاحي على ضرر الكبد ، فهو يساهم في تعافي خلايا الكبد مما يؤدي إلى تسريع تجديد الخلايا البرنكيمية والليزوزومات ، وبالتالي حماية ضد تحطم غشاء الخلية الناتج من مستقلبات بنزوات الصوديوم (Otomoso *et al*., 2015).

ويُظهر الشكل (4-3) وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) لفعالية أنزيم ALT في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ثم عوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وثم التركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم)، ربما يعود السبب لكون مستخلص المورينغا أوليفيرا قلل من الإجهاد التأكسدي عن طريق خفض بيروكسيد الدهون ، و أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) في الأرانب (Altaee *et al*., 2021) . إذ وثَّقت عدد من الدراسات أن المورينغا أوليفيرا لها خصائص مضادة للأكسدة لحماية أو تخفيف الضرر الخلوي ، وأظهرت مستخلصات ومركبات المورينغا وخاصة الكيرسيتين quercetin ، والكامبفيرول kaempferol ، والأيزوثيوسيانات isothiocyanates ، والروتين rutin ، والميريسيتين myricetin ، وحمض الأسكوربيك ascorbic acid ، وبيتا كاروتين β-carotene ، إمكانات مضادة للأكسدة عن طريق الكسح المباشر للجذور الحرة (Pakade *et al*., 2013) .

2-2-4 مضادات الأكسدة الانزيمية Enzymatic antioxidants

لوحظ انخفاض معنوي (P<0.05) لفعالية انزيم SOD في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم)، ثم اعطيت التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة كما في الجدول (4-4) والشكل (4-4).

لم يتم تسجيل اي فروق معنوية (P >0.05) في فعالية انزيم CAT بين مجاميع الأرانب بحسب الجدول (4-4) والشكل (4-5) .

أظهرت النتائج التي تم التوصل إليها وجود انخفاض معنوي(P<0.05) لفعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة المعاملة بالتركيزالعالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) كما في الجدول (4-4) والشكل (4-4).

وقد لوحظ على وفق الشكل (4-4) وجود ارتفاع معنوي (P<0.05) في فعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب التي عولجت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة .

وبيّنت النتائج مثلما هو في الشكل (4-4) عن وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في فعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب التي عولجت بالتركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) مقارنة مع المجموعة المعاملة بالتركيزالعالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) .

ويُظهر الشكل (4-4) وجود انخفاض معنوي (P<0.05) لفعالية أنزيم GST في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ثم عوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة المعاملة بالتركيزالعالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم).

في حين يُظهر الشكل (4-4) وجود انخفاض معنوي (P<0.05) لفعالية أنزيم GST في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ثم عوملت بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة المعاملة بالتركيزالعالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) .

ويُظهر الشكل (4-4) وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) لفعالية أنزيم GST في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة السيطرة السالبة.

الجدول (4-4) : تأثير التجريع ببنزوات الصوديوم ومستخلص أوراق المورينغا على فعالية مضادات الاكسدة الانزيمية.

مضادات الأكسدة الانزيمية / مجاميع الارانب	مجموعة السيطرة السالبة	مجموعة السيطرة الموجبة المتمثلة بمستخلص اوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم)	مجموعة التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (500ملغم/ كلغم)	مجموعة مستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) + بنزوات الصوديوم (250ملغم/ كلغم)	قيمة الاحتمالية P value
SOD (U/ml)	0.826 ± 0.0117 **a**	0.503 ± 0.136 a	0.498 ± 0.323 **a**	0.712 ± 0.079 **a**	0.668 ± 0.170 **a**	0.447 ± 0.119 * **b**	0.0104
CAT (catal/ ml)	1.629 ± 0.012 **a**	1.263 ± 0.791 **a**	1.113 ± 0.623 **a**	0.902 ± 0.297 **a**	1.415 ± 0.904 **a**	0.678 ± 0.305 **a**	0.155
GST (U/L)	0.097 ± 0.028 **** **c**	0.242 ±0.084 *** **b**	0.602 ±0.1003 **a**	0.187 ±0.097 **** **c**	0.185 ±0.169 **** **c**	0.209 ± 0.099 **** **c**	<0.0001

المتوسط mean ± الانحراف المعياري للمتوسطات(Standard deviation of means (SD

- يمثل SOD انزيم سوبر اكسيد ديسموتاز Superoxide dismutase

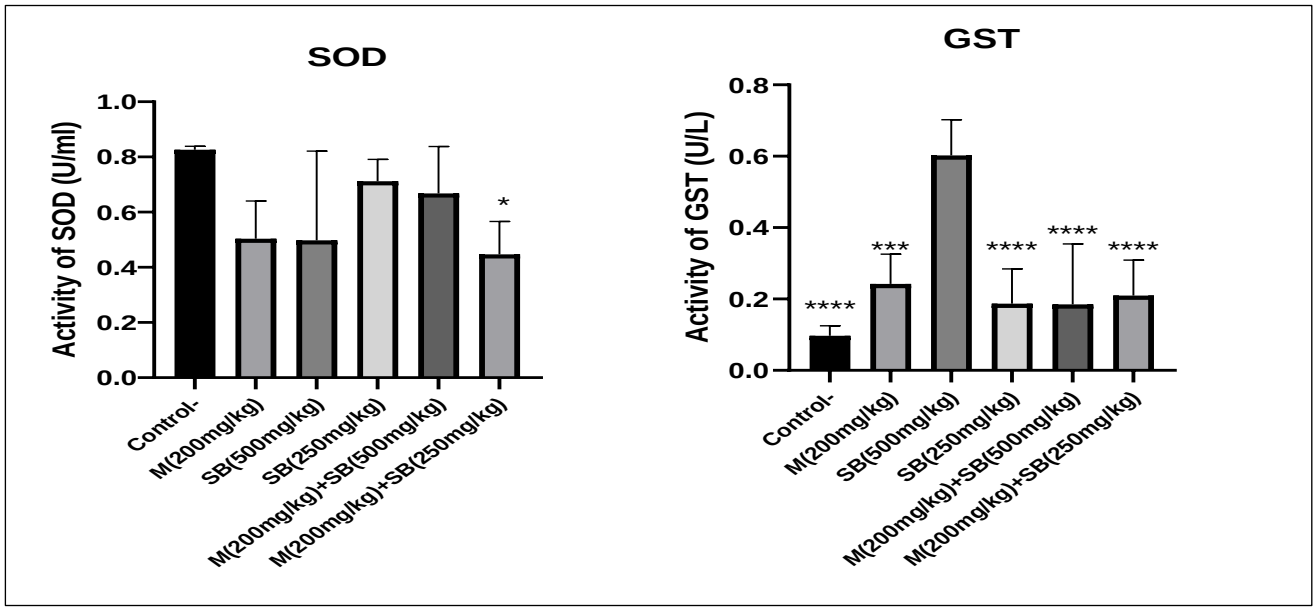
- يمثل CAT انزيم الكاتاليز Catalase

- يمثل GST انزيم كلوتاثيون- اس -ترانسفيراز Glutathione S-transferase

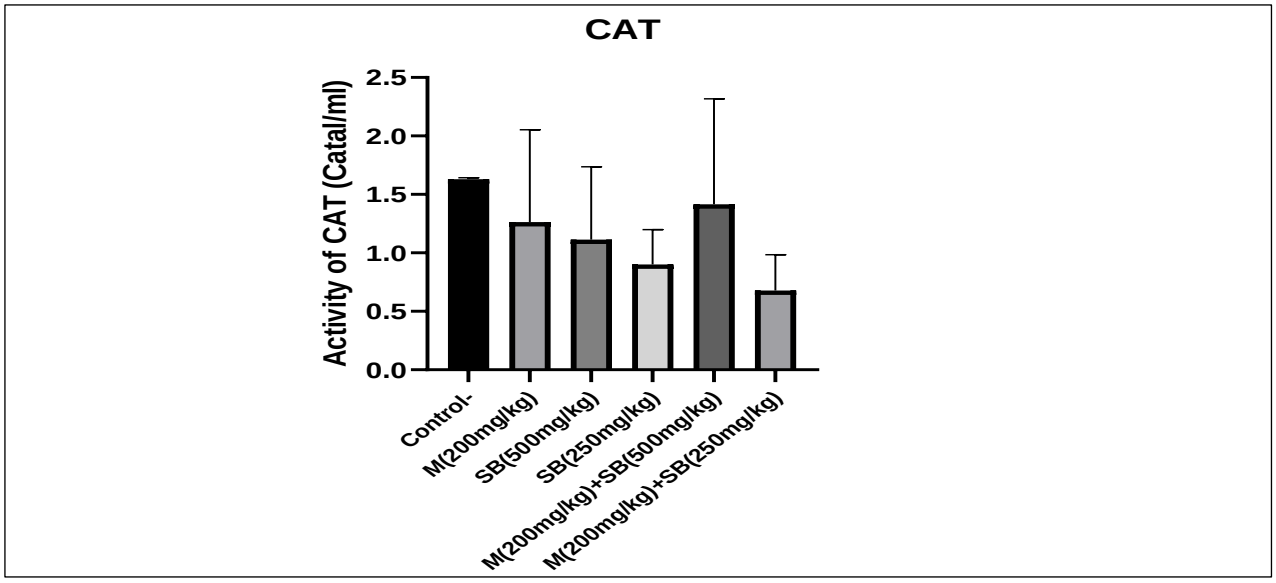
تشير الحروف المختلفه الى وجود فروق معنوية بين المجموعة المعاملة في الصف الواحد مع مستوى معنوية ($P<0.05$) والحروف المتشابة الى عدم وجود فروق معنوية.

الرمز * في صف SOD يشير الى وجود فروق معنوية بين المجموعة المعاملة في الصف الواحد بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة مع مستوى معنوية ($P<0.05$).

االرمز * في صف GST يشير الى وجود فروق معنوية بين المعاملات في الصف الواحد بالمقارنة مع المجموعة المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم مع مستوى معنوية ($P<0.05$).



الشكل (4-4) : معدل فعالية SOD و GST في الدم لمجاميع الأرانب المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M) ، القيم تمثل متوسط Mean ± الانحراف المعياري للمتوسط (SD) .



الشكل (4-5) : معدل فعالية CAT في الدم لمجاميع الأرانب المعاملة ببنزوات الصوديوم (SB) و مستخلص اوراق نبات المورينغا (M) ، القيم تمثل متوسط Mean ± الإنحراف المعياري (SD).

لقد أظهرت نتائج هذه الدراسة مثلما هو مبين في الشكل (4-4) انخفاضًا معنويًا ($P<0.05$) في نشاط انزيم SOD في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم)، ثم اعطيت التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم /وزن الجسم) مقارنه بمجموعة السيطرة السالبة ويعود ذلك لقدرة مستخلص أوراق المورينغا على إضافة مضادات أكسدة والتي تم استنفاذها من أجل الوقاية من التأثير الضار لبنزوات الصوديوم من خلال التخلص من مستقلباته .

على وفق دراسة Widodo وجماعته (2020) الذين أشاروا إلى أنّ مستخلص أوراق المورينغا يعزز نشاط مضادات الأكسدة في الفئران. فقد اظهر Abarikwu وجماعته (2017) أن مستوى SOD قد زاد بعد العلاج بـالمورينغا في الفئران .

يعد (SOD) ، (CAT) ،والكلوتاثيون بيروكسيديز (GPx) ، والكلوتاثيون إس ترانسفيراز (GST) والكلوتاثيون المختزل (GR) هي أنواع مختلفة من مضادات الأكسدة الأنزيمية التي تلعب دورًا رئيساً في الحد من الأضرار الذي يسببها الاجهاد التأكسدي . ويعد SOD هو أول إنزيم مضاد للأكسدة يعمل ضد الجذور الحرة ، وبالتالي يمثل الخط الأول من المعالجة ضد الضرر التأكسدي (Fink and Scandalios, 2002) ، إذ يعمل انزيم SOD على الحد من الضرر التأكسدي عن طريق تحويل الانيون الفائق O2- إلى H2O2 و O2 ، النشاط المشترك للأنزيمات المضادة للأكسدة يزيل السموم الغريبة الحيوية (Litwack *et al*., 1971).

وفق الشكل (4-5) لم تسجل اي فروق معنوية في فعالية انزيم CAT في مجاميع الأرانب المعالجة ببنزوات الصوديوم او بمستخلص المورينغا على حدى او مع بعضهما ولم تتفق هذه نتيجة مع دراسة (Khodaei and Kholghipour, 2019) التي أشارت إلى وجود انخفاض معنوي في فعالية انزيم CAT للمجاميع المعاملة ببنزوات الصوديوم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة.

وعلى وفق الشكل (4-4) لوحظ ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب التي عوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم /وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة وقد يعود السبب لأن استقلاب بنزوات الصوديوم في انسجة الكبد والكلى ساهم بزيادة إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) والتي تميل لتصبح أكثر استقراراً من خلال أكسدة الدهون والبروتينات في أغشية الخلايا وبالتالي تدمير بنية الغشاء والسماح بتسرب انزيم GST إلى الدورة الدموية مما يؤدي الى ارتفاع نشاطه في المصل (Maisuthisakul *et al*., 2007).

أشارت هذه النتيجة إلى زيادة بيروكسيد الدهون الذي ينتج من تكسير الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة والتي تعد واحدة من أحد مظاهرها من الجذور الحرة التي تشير إلى حدوث السمية الخلوية. هذه النتيجة متوافقه مع نتائج Dibnath and Mandal (2000) و Ojo *et al*., (2006) .

ينتج الإجهاد التأكسدي عن الإفراط في إنتاج المواد المؤكسدة أو آليات الدفاع غير المتوازنة التي تلعبها مضادات الأكسدة والإنزيمات المرتبطة بها. أحد الأمثلة على ذلك هو خلل التنظيم في توازن GSH ومستويات وظائف GSTs المتغيرة حيث قد ينخفضان أو يزيدان معاً (Uttara *et al*., 2009 ; Johnson *et al*., 2012). ان إنزيم GST مسؤول إلى حد كبير عن عمليات إزالة السموم من المركبات الغريبة الحيوية واستقلاب مسببات الإجهاد التأكسدي (Benekos *et al*., 2010 ; Cummins *et al*., 2013) .

وانزيم (GST) يشارك في عملية التمثيل الغذائي ويعد علامة جيدة على إصابة خلايا الكبد، ويتم توزيعه في الغالب في الكبد و الكلى ، ويتم إطلاقه بسرعة بعد تحفيز السمية الكبدية الحادة ، وحجم التغيير في هذا الإنزيم يتناسب مع شدة الإصابة (Giffen *et al*., 2002) إنّ ارتفاع تراكيز GST في البلازما توفر مؤشراً سريعاً ومحدداً وحساساً لحدة تلف خلايا الكبد(Romero *et al*., 1988) . فقد يكون ارتفاع α-GST في مستوى البلازما مؤشرًا مبكراً لتلف الكبد. اشارت أحدى الدراسات إنّ مستوى ا لـ α-GST في البلازما هو مؤشر فعلي لسلامة خلايا الكبد ، أو مؤشر حيوي لتلف الكبد (Flendrig *et al*., 1999).

يتبع توزيع GST في النماذج الحيوانية نمطاً مشابهاً لذلك الموجود في البشر ، وبالتالي يقومون بأدوار مماثلة كمؤشرات مبكرة لتلف الأعضاء ، لقد ثبت أن α-GST هو علامة أكثر حساسية من الانزيمات الناقلة للأمين Aminotransferases في تقييم الأضرار الكبدية في كبد الفئران (van *et al*., 1997) ، وأثبتت الدراسات النسجية الكيميائية المناعية أن α-GST يقع في خلايا الكبد ويُقال إن نشاطه في البلازما يعكس تلف الكبد بشكل أفضل من ذلك الناتج عن انزيمات ناقلات الأمين Aminotransferases (ALT,AST) (Mazur *et al*., 2003). بينما تم تحديد موقع μ-GST للفئران في الأنابيب الملتوية البعيدة لكلى الجرذان ، هذا فضلاً عن العثورعلى α- GST في النبيبات البولية البعيدة (Oberley *et al*., 1995).

يظهر انزيم α-GST بشكل واسع في الكبد حيث يكون تركيزه عالٍ في الخلايا الكبدية ، فقد تم العثور على انزيم GST بتراكيز عالية (حوالي 3 ملغم/غم من الوزن الرطب) في الكبد (van *et al*., 1997) . ونصف العمر له قصير في البلازما مما يجعل مراقبته أكثر فائدة في اختبارات وظائف الكبد الكيموحيوية كعلامة على تلف خلايا الكبد (Helaly and Mahmoud, 2003) .

فقد اشارت دراسة بانه في حالة حدوث تلف في الخلايا الكبدية ، فإن الإنزيمات تتحرر بكميات كبيرة في مجرى الدم (Beckett *et al*.,1993) . ونصف عمر انزيم GST في البلازما ما يقرب من (1 - 2) ساعة (Beckett *et al*.,1985 ; Steegers *et al*., 1995). وإنّ ارتفاع تراكيزه في البلازما يحدث بشكل أسرع من التغييرات في AST و ALT ذات نصف عمر (17 ساعة و 47 ساعة) على التوالي بعد تلف خلايا الكبد (Beckett *et al*.,1985) .

وعلى وفق الشكل (4-4) فقد لوحظ انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب التي عوملت بمستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة الارانب المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم /وزن الجسم) ، قد يعود السبب إلى احتواء أوراق المورينغا على مواد فعالة كالفينولات والفلافونويدات والكلوتاثيون، إذ تقوم الفلافونويدات بتثبيط التعبير عن انزيم (GST) في حالة عدم وجود سموم مما يؤدي الى انخفاض نشاطه في المصل مثلما حدث في هذه الدراسة (Prabhu *et al*., 2011) .

فقد تم استعمال المركبات الفينولية الطبيعية مثل البوليفينول والفلافونويد والكركمين والتي تُعرف بإسم المركبات المثبطة لنشاط GST في المختبر (Sudibyo, 2000; Hamed, *et al*., 2014; Arinc and Yilmaz, 2014; Guneidy, *et al*., 2017). و يثبط الكيرسيتين والذي هو من الفلافونيدات الموجودة في المورينغا فعالية انزيم GST بشكل كبير في الجسم الحي حيث خفض من مستويات mRNA لإنزيم GST في كبد الفئران التي تتغذى على نظام غذائي مكمل بالكيورستين (Wiegand *et al*., 2009) .

وعلى وفق الشكل (4-4) لوحظ انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم اعطيت التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم /وزن الجسم) وكذلك لوحظ انخفاض في فعالية هذا الإنزيم في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم اعطيت التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم /وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة الارانب المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم /وزن الجسم) قد يكون ذلك بسبب استقلاب بنزوات الصوديوم وحدوث إجهاد تأكسدي نتيجة أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) المتكونه بفعل استقلابه وبالتالي إحداث الأضرار في خلايا أنسجة الكلى والكبد للأرانب ، فضلاً عن ما تحتوية أوراق المورينغا من مواد فعالة كالفينولات والفلافونويدات والكلوتاثيون، إذ تقوم الفلافونويدات بتحفيز التعبير عن انزيم (GST) والذي بدوره يساهم من خلال اقترانه مع الكلوتاثيون (GSH) لإزالة السموم (Sau *et al*.,).

(2010 ، بعد تأييض بنزوات الصوديوم وطرح مستقلباتها خارج الخلية ، مما قد يؤدي الى تقليل حدوث الاضرار في أغشية الخلايا الكبدية والكلوية نتيجة زيادة مضادات الاكسدة بفعل المعاملة بالمورينغا وذلك ربما ساهم بدوره في انخفاض تسرب انزيم GST من الخلايا إلى الدورة الدموية وبالتالي اظهرت اوراق المورينغا دورها الوقائي في اكتساح الجذور الحرة التي تكونت بفعل استقلاب بنزوات الصوديوم في الكلى والكبد (Lambole *et al*.,2012) .

قد يكون بيروكسيد الدهون هو سبب التسمم الخلوي، وبالتالي يمكن اِستنتاج أن المستويات العالية من بيروكسيد الدهون تضر بأنسجة الكبد وتساهم في انخفاض مضادات الأكسدة GSH و SOD و GST و CAT وتضعف من قدرتها على القضاء على إنتاج ROS الزائد (Ranawat *et al*., 2010).

تم الإثبات بأن بنزوات الصوديوم ترفع مستوى دهون الكلية ، وبيروكسيد الدهون ، والكلوتاثيون بيروكسيديز ، والشوارد (الصوديوم والبوتاسيوم و كلوريد)، وخفض مستوى البروتين الكلي. بالتالي لها تأثير على وظائف الكبد ووظائف الكلى والدهون وعلامات الإجهاد التأكسدي (Helal *et al*., 2015 ; Tawfek *et al*., 2019) .

والمسحوق المجفف لأوراق المورينغا هو مصدر غني لفيتامين A ، الفينولات ، الكلوتاثيون ، بيتا-توكوفيرول وبيتا-كاروتين ، تم الإشارة إلى أن مستخلص أوراقه يظهر نشاطاً جيداً مضاداً للأكسدة (Prasad., 2013).

لقد أشارKhudaer وجماعته (2016) إلى إنّ أوراق المورينغا تحتوي على الفلافونويدات ومن أبرزها الروتين Rutin واللوتيولين Luteoline والكيورستين Quercetin، ويمتاز الكيورستين بأن له دور في حماية الكبد من التسمم لدوره المضاد للأكسدة (Ali *et al*.، 2016) .

تحتوي أوراق المورينغا على كمية عالية جدًا من مادة البوليفينول ، وكيرسيتين ، وكايمبفيرول ، مع بيتا-كاروتين ،ولوتين، وتعد الفينولات هي مواد كيميائية نباتية رئيسة مسؤولة عن نشاط مضادات الأكسدة ، إنّ مضادات الأكسدة النباتية التي تحدث بشكل طبيعي هي في الغالب الفينولات بما في ذلك الفلافونويد والكومارين واللكنين وقد يعمل عدد من هذه المركبات بشكل تآزري في زيادة مستوى النشاط المضاد للأكسدة داخل هذه المنتجات النباتية وبالتالي خلق الفوائد العلاجية المرغوبة. تملك الفينولات نشاط في إزالة الجذور الحرة وبالتالي هي تملك نشاط مضادة للأكسدة (Ramakrishnan and Venkataraman, 2011) .

وتم الإشارة عن مشاركة بعض المركبات الفينولية في نظام الدفاع الخلوي بما في ذلك أنظمة إنزيمات إزالة السموم ومضادات الأكسدة .(Huang *et al*., 2010) وفق ما أشار به Ren وجماعته (2003) بأنّ الفلافونويد تحفز أيضاً التعبير الإنزيمي في المرحلة الثانية من التحول الحيوي مثل انزيم GST و quinon reductase ، وإنّ أوراق المورينغا (في كل 100 غرام) غنية بالمعادن مثل الكالسيوم (440 ملغم) ، والفوسفور (70 ملغم) ، والمغنيسيوم (42 ملغم) ، والبوتاسيوم (259 ملغم) ، إلى جانب الفيتامينات مثل فيتامين C (200 ملغم) (Amaglo *et al*., 2010) .

وعلى وفق دراسة Bayram وجماعته (2012) التي أشارت إلى إنّ تأثير النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويد يعتمد على قدرتها على زيادة التعبير عن العديد من الإنزيمات المضادة للأكسدة من خلال مسار نقل الإشارة المعتمد على Nrf2 ، إذ يشارك عامل النسخ Nrf2 في تنظيم التعبير الجيني لكل من (GST و γ-glutamyl cysteine synthetase وNADPH: quinone oxidoreductase 1) تمت دراسة تحفيز GST بواسطة المواد الغريبة الحيوية Xenobiotics وقد وجدت العديد من المواد الكيميائية المساهمة في تنشيط نسخ انزيم GST تتضمن الفلافونويدات والأيزوثيوسيانات والهيدروكربونات العطرية (Xu *et al*., 2005). وجد زيادة في فعالية GST بوساطة الفلافونويد في العديد من الدراسات في الجسم الحي .(Moon *et al*., 2006)

وقد لوحظ مثلما مبين في الشكل (4-4) انخفاض معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم GST في مجموعة الأرانب التي عوملت بالتركيز الواطيء من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم /وزن الجسم) بالمقارنة مع مجموعة الارانب المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم /وزن الجسم) وذلك ربما يعود بسبب كون الجذور الحرة المتكونه من استقلاب بنزوات الصوديوم نتيجة المعالمة بالتركيز الواطيء كانت اقل من الجذور الحرة المتكونه نتيجة المعالمة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم والذي بدورة سوف ينعكس على شدة الضرر الذي اصاب الخلايا الكبدية او الكلوية ، إذ كان الضرر في التركيز الواطيء أقل من الضرر في التركيز العالي ، وبالتالي ساهم ذلك بانخفاض تسرب انزيم GST من الخلايا الى المصل بالمقارنة مع مجموعة التركيز العالي .

إنّ حالة الإجهاد التأكسدي الناتجة عن زيادة أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) تسبب تحطيم الحمض النووي، البروتينات والدهون في خلايا الكبد مما يؤدي إلى تدهور هذه الخلايا ، ثم تفككها وتطرح محتوياتها في مجرى الدم ، بما في ذلك الإنزيمات (Ghouri *et al*., 2010 ; Huang *et al*,. 2012). يتم إطلاق

انزيم GST بسرعة بعد تحفيز السمية الكبدية الحادة ، وحجم التغيير في هذا الإنزيم يتناسب مع شدة الإصابة (Giffen *et al*., 2002).

وبناء على دراسة Finkel عام (2011) فقد اثبت بأنه ينتج من تلف بنية الخلية الكثير من الإجهاد التأكسدي والتعرض لأنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) ، وإنّ المستويات العالية من بيروكسيد الدهون تضر بأنسجة الكبد وتضعف من قدرة مضادات الأكسدة للقضاء على إنتاج ROS الزائد .(Ranawat *et al*,. 2010). كما تم الإشارة في دراسة إلى أن تليف الكبد وتدهوره يحدثان بسبب الإجهاد التأكسدي (Hazar *et al*., 2008).

ويُظهر الشكل (4-4) وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) لفعالية أنزيم GST في مجموعة الأرانب التي عولجت بمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا (200 ملغم/كلغم /وزن الجسم) بالمقارنة مع المجموعة السيطرة السالبة وقد يعود ذلك لقدرة مستخلص أوراق المورينغا على إضافة مضادات أكسدة .

3-4 التغيرات النسجية المرضية Histopathological Changes

1-3-4 التغيرات في نسيج الكبد Histological changes in Liver

أظهر التصوير النسجي تحت المجهر الضوئي لمقاطع الكبد عن ظهور تغيرات مختلفة بين مجاميع الأرانب مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة ، وتُظهر مقاطع الكبد لمجموعة السيطرة السالبة الفصيص الكبدي بشكل طبيعي والخلايا الكبدية مرتبة بشكلها الشعاعي الطبيعي ، وهي تظهر كحبال تمتد من الوريد المركزي Central vein (CV) ، ولوحظ ايضاً الخلايا البطانية Endothelial cells و خلايا كوبفر Kupffer cells شُخصت خلايا الكبد على إنها طبيعية ذات نوى مركزية مستديرة وسيتوبلازم متجانس والخلايا الكبدية مرتبة حول الوريد المركزي في مجموعات السيطرة السالبة كما هو موضح في الشكل (4-6) .

وشكلت أنسجة كبد الأرانب التي جرعت بمستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم) مظهراً منتظماً للخلايا الكبدية Hepatocytes ومرتبة بشكل شعاعي حول الوريد المركزي (CV) ، إذ شوهد الفصيص الكبدي طبيعياً ومع عدم وجود خلايا التهابية مثلما في الشكل (4-7).

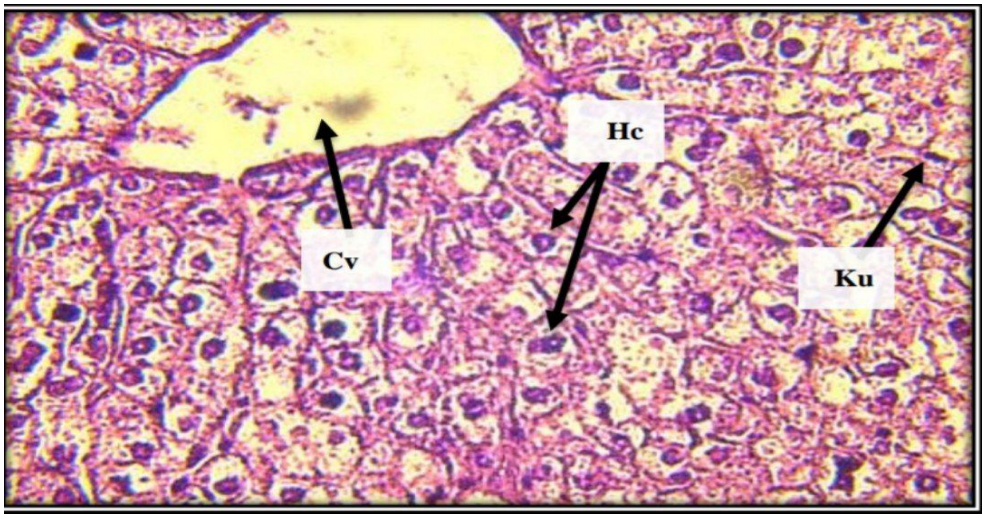
وأظهرت أنسجة الكبد في مجموعة الأرانب التي عُوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) احتقاناً دموياً في الوريد المركزي Central vein Congestion ، وتخريب التركيب الشعاعي للخلايا الكبدية المرتبة حول الوريد المركزي (CV) في الفصيص الكبدي ، وكثرة

ارتشاح الخلايا الالتهابية Infiltration lymphocytes المتمثلة بخلايا كوبفر Kupffer cells وتواجد عدد من الخلايا الميته Dead cell ، فضلاً عن تنكس دهني degeneration Steatosis متمثل بتراكم لدهون داخل الفصيص الكبدي كما يظهر في الشكل (4-8)

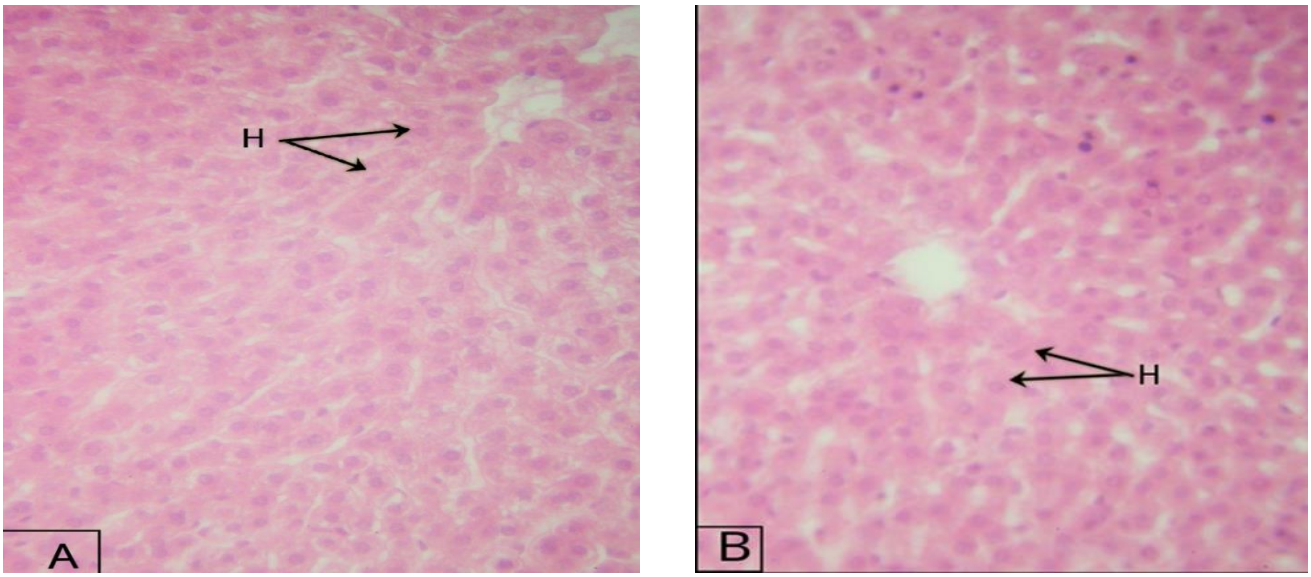
وأظهرت أنسجة الكبد في مجموعة الأرانب التي عُوملت بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) تراكم الدهون بشكل قطرات زيتية صغيرة microstatiosis عددها كثير في معظم أجزاء المقاطع الفحوصة للكبد بين الفصيصات الكبدية ، وارتشاح بعض الخلايا الالتهابية Infiltration Kupffer cells، وتخريب بسيط للمظهر المميز للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي مثلما موضح في الشكل (4-9).

وأظهرت دراستنا لتغييرات النسيجية للكبد في المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم) من وزن الجسم عن وجود عدد ضئيل من الخلايا الدهنية الزيتية microstatiosis ، وارتشاح للخلايا الالتهابية قرب الوريد المركزي (CV) ، وعدم انتظام الخلايا الكبدية بشكل حبال حول الوريد المركزي ، مع ظهور تحسن في نسيج الكبد ، ربما يُعزى ذلك لتأثير الوقائي لمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا و بقاء الوريد الكبدي متوسع كما موضح في الشكل (4-10) .

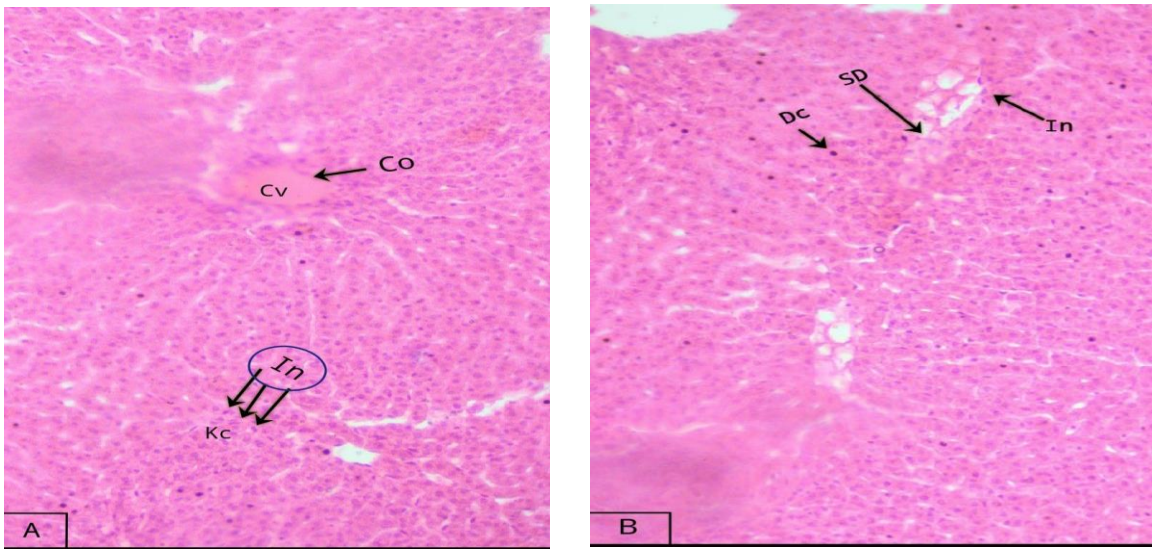
في حين أظهرت أنسجة الكبد لمجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم) المظهر الطبيعي لنسيج الكبد ، وقلة ارتشاح الخلايا الالتهابية، مع قلة وجود الخلايا الدهنية، وانتظام الخلايا الكبدية بشكل حبال حول الوريد المركزي للفصيص الكبدي مثلما موضح في الشكل (4-11).



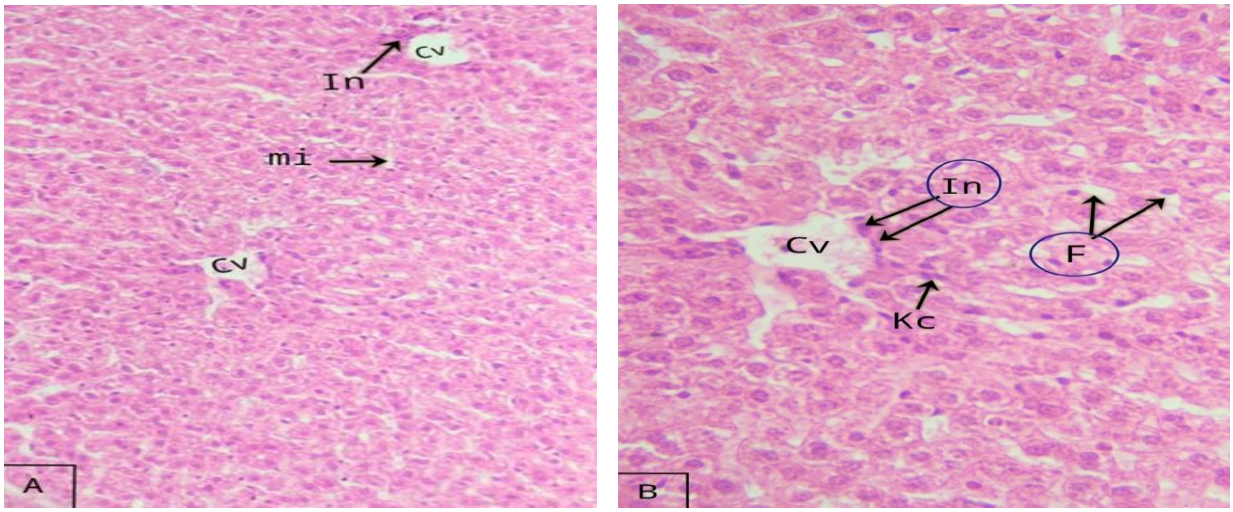
شكل (4 - 6) : مقطع مستعرض في كبد أرانب مجموعة السيطرة السالبة ، يظهر التركيب النسيجي الطبيعي للكبد ، يبدو فيه الفصيص الكبدي بصورة طبيعية ، يظهر الخلية الكبدية Hepatocyte (Hc)، الوريد المركزي(Cv) Central vein ، خلية كوبفر Kupffer cell (Ku) بقوة تكبير (400X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



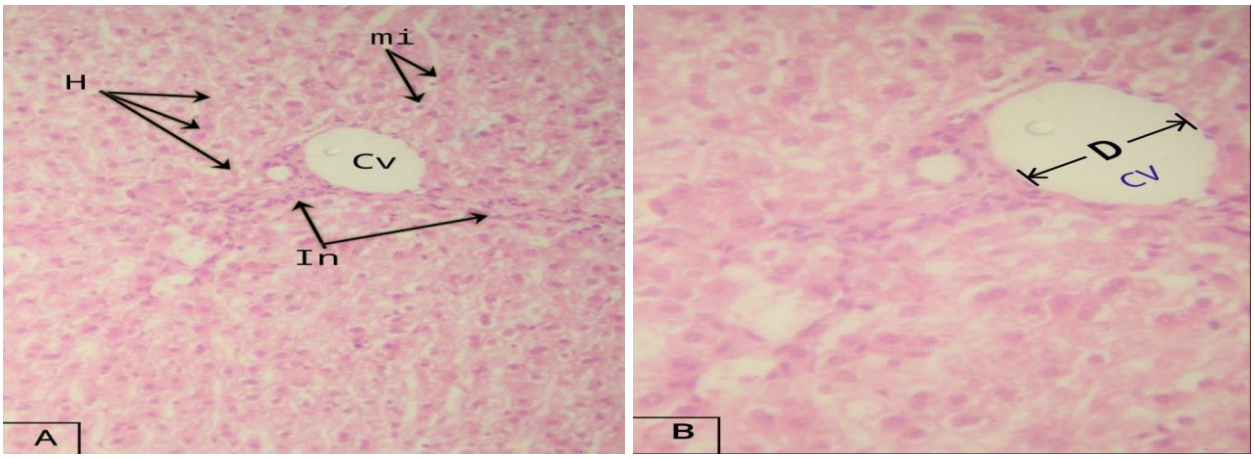
شكل (4 - 7) : مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) المقطع A وB يعرضان مظهر منتظم للخلايا الكبدية Hepatocytes (H) ومرتبة بشكل شعاعي حول الوريد المركزي (CV) ،شوهد الفصيص الكبدي (HL) طبيعي وعدم وجود خلايا التهابية تحت قوة تكبير (400x) على ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



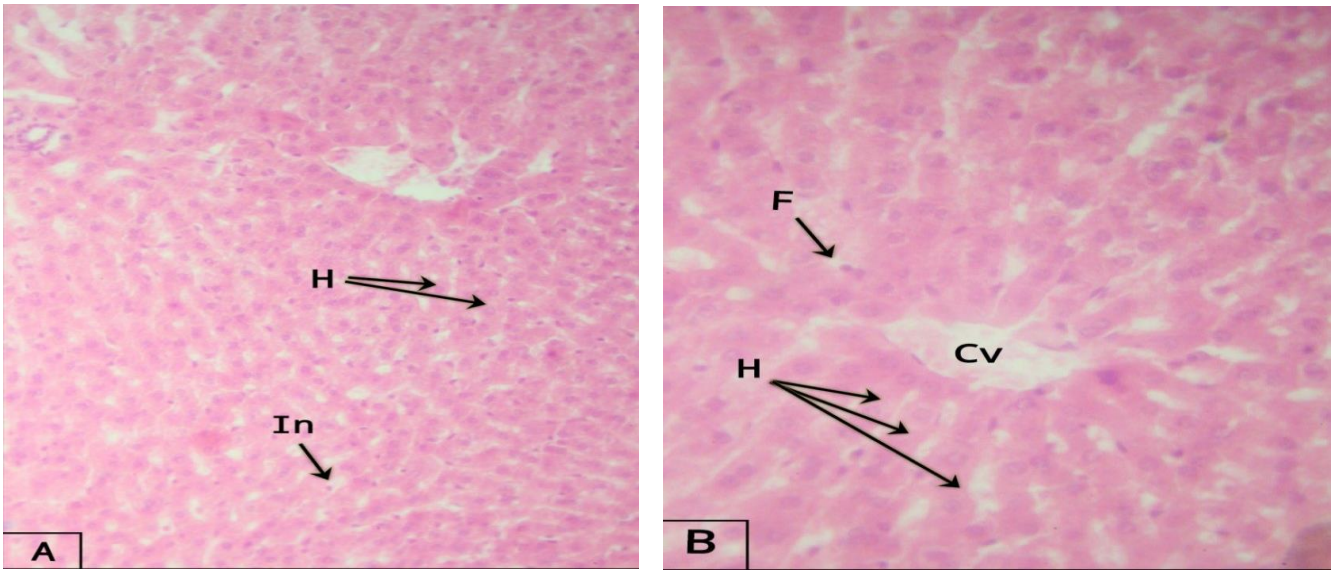
شكل (4 - 8) : مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ، يُظهر A) احتقان دموي في الوريد المركزي Central vein Congestion (CO) وتخريب التركيب الشعاعي للخلايا الكبدية المرتبة حول الوريد المركزي (Cv) في الفصيص الكبدي وكثرة ارتشاح الخلايا الالتهابية Infiltration lymphocytes (In) المتمثلة بخلايا كوبفر Kupffer cells (Kc) والمقطع B) يظهر تنكس دهني steatosis degeneration (SD) داخل الفصيص الكبدي hepatic lobule وكثرة ارتشاح الخلايا الالتهابية Infiltration Kupffer cell (In) وتواجد عدد من الخلايا الميته Dead cells (DC) بقوة تكبير (200X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



شكل (4 - 9) : مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ، يظهر A) تراكم الدهون بشكل قطيرات زيتية صغيرة microsteatosis (mi) عددها كثير في معظم أجزاء المقاطع المفحوصة للكبد، ارتشاح بعض الخلايا الالتهابية Infiltration Kupffer cells (In) حول الوريد المركزي (Cv) ، تخريب بسيط للمظهر المميز للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي بقوة تكبير (200X)، ويُظهر المقطع B) ارتشاح بعض الخلايا الالتهابية Infiltration Kupffer cell (In) حول الوريد المركزي (Cv) ، تراكم لقطرات الدهون Fat (F) في مناطق بين الفصيصات الكبدية Hepatic lobules بقوة تكبير (400X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



شكل (4 - 10) : مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ، يُظهر المقطع A) وجود عدد ضئيل من الخلايا الدهنية microsteatosis (mi) ، ارتشاح للخلايا الالتهابية Infiltration Kupffer cells (In) قرب الوريد المركزي ، عدم انتظام الخلايا الكبدية hepatocytes (H) بشكل حبال حول الوريد المركزي مع ظهور تحسن في نسيج الكبد ربما يُعزى ذلك لتأثير الوقائي لمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا تحت قوة تكبير (200x) والمقطع B) بقاء الوريد الكبدي متوسع Hepatic vein dilatation (D) تحت قوة تكبير (400x) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



شكل (4 - 11) : مقطع مستعرض في كبد أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ،المقطع A) يظهر المظهر الطبيعي لنسيج الكبد وانتظام الخلايا الكبدية hepatic cells (H) ، قلة ارتشاح الخلايا الالتهابية Infiltration Kupffer cells (In) تحت قوة تكبير (200X) ،المقطع B) يظهر قلة وجود الخلايا الدهنية fat cells (F) ، و التركيب الشعاعي للخلايا الكبدية cells (H) hepatic بشكل حبال حول الوريد المركزي للفصيص الكبد hepatic lobule تحت قوة تكبير (400X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).

إذ أظهرت أنسجة كبد الأرانب التي جرعت بمستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم) مظهراً منتظماً للخلايا الكبدية Hepatocytes ، ومرتبة بشكل شعاعي حول الوريد المركزي ، فقد شوهد الفصيص الكبدي طبيعي وعدم وجود خلايا التهابية كما موضح في الشكل (4-7).

توافقت دراستنا مع نتائج Mohamed وجماعته (2020) إذ لم يكشف كبد الأرانب المعالجة بمستخلص أوراق المورينغا لمدة 30 يوم عن أي تغيرات في الأنسجة

أظهرت أنسجة الكبد في مجموعة الأرانب التي عُوملت بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) احتقاناً دموياً في الوريد المركزي ، وتخريب التركيب الشعاعي للخلايا الكبدية المرتبة حول الوريد المركزي وكثرة ارتشاح خلايا كوبفر (الخلايا الالتهابية) ، ووجود عدد من الخلايا الميته، فضلاً عن تنكس دهني Steatosis degeneration متمثل بتراكم لدهون، مثلما موضح في الشكل (4-8).

يمثل الكبد مركز الاستقلابٍ في الجسم ، فيكون عرضة للمواد الكيميائية السامة التي تسبب أضراراً مثل التهاب خلايا الكبد (التهاب الكبد) ، وتنكس الخلايا وحتى موت الخلايا (النخر) (Crawford, 2007). وتتدهور خلايا الكبد وتنتخر بآلية تحفيز الإنزيم والجذور الحرة ، مما يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي الذي هو يتميز بزيادة بيروكسيديز الدهون وانخفاض مستويات الكلوتاثيون في الكبد (Perucca, 2002).

وعلى وفق نتائج هذه الدراسة فقد لوحظ ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في فعالية انزيم GST لمجموعة الارانب المعاملة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) فحسب ما تشير له الدراسات بأن إنزيمات التسرب الخلوي الكبدية هي إنزيمات خلوية قابلة للذوبان تشمل ALT ، AST و alpha glutathione S-transferase (α-GST) وغيرها التي لها نشاط عالٍ في خلايا الكبد ، ويتم تحريرها عند تلف أغشية الخلايا الكبدية المصاحبة للإصابة تحت المميته (قابلة للرجعة) ، أو نخر خلايا الكبد (إصابة لا رجعة فيها)، وظهور هذه الإنزيمات في الدم لا يعني بالضرورة موت الخلايا(Solter, 2005) .

إنّ الآلية المقترحة لشرح ظهور إنزيمات العصارة الخلوية في الدم مع تلف قابل للإصلاح هي بواسطة تشكيل الفقاعات الغشائية التي تنفصل وتسمح بإنسداد الغشاء دون موت الخلية، وتؤكد التغييرات الأساسية لموت الخلايا القابل للرجوع حدوث نزيف من غشاء البلازما، والارتفاعات الكبيرة في الإنزيمات تمثل موت الخلية ، في حين أن الارتفاعات الطفيفة قد تمثل نزف الغشاء (Stockham and Scott, 2008) .

وقد توافقت هذه النتائج مع دراسة Al-Ameen وجماعته (2022) ، إذ تم الإشارة إلى وجود بعض التغيرات في الكبد متمثلة باحتقان الوريد المركزي ، وتضيق الجيوب وتنكس دهني ونخر في خلايا المجاميع المعاملة ببنزوات الصوديوم (200، 400، 500 ملغم/كلغم)مقارنة بمجموع السيطرة السالبة.

ويمكن أن يعزى احتقان الأوعية الدموية إلى الاستجابة الالتهابية من قبل جسم الحيوان للآثار الضارة للمواد السامة التي تميزت بزيادة تدفق الدم إلى منطقة الإصابة، وقد يكون أيضًا نتيجة تلف وتدمير في بطانة الأوعية الدموية بفعل المواد السامة أو المؤكسدة ، وبناء على ذلك فإن هذه النتائج متوافقة مع دراسة Alsamarraiوجماعته (2020) والتي كشفت عن زيادة في كمية الدهون المترسبة في سيتوبلازم خلايا الكبد لمجاميع الارانب التي عولجت ببنزوات الصوديوم .

وتتوافق هذه النتائج مع ماتوصلت إليه دراسة Alsamarrai وجماعته (2020) إذ لوحظ في مجاميع المعالجة ببنزوات الصوديوم ارتشاح للخلايا الليمفاوية وحتى تنخر ، كنوع من حماية النسيج لنفسه عن طريق فقدان بعض خلاياه للحفاظ على النسيج الكلي ، وهذا يسمى موت الخلايا المبرمج، وان الزيادة في عدد خلايا كوبفر المبلعمة لبعض أمراض الكبد كآلية دفاعية فعالة ضد العوامل الضارة ، ويسبب كل من موت الخلايا المبرمج ونخر الخلايا الكبدية زيادة في نفاذية غشاء الخلية ، مما يؤدي إلى إطلاق الإنزيمات الكبدية الناقله Transaminases التي تضم (AST, ALT) في مجرى الدم ; Mallya *et al.*, 2017) Omodanisi *et al.*, 2017). فقد لوحظ تأثير بنزوات الصوديوم على تحفيز الموت المبرمج apoptosis للخلايا (El-Shennawy *et al.*, 2020) . وتشير دراسة إلى ان بنزوات الصوديوم يسبب تليف أنسجة الكبد (Kaboğlu and Aktaç, 2002) .

استناداً إلى بعض الدراسات فإنّ أسبوعين من التجريع الفموي لبنزوات الصوديوم بتركيز (200 ملغم/ كلغم) قد سببت بعض الآثار الضارة على كبد الفئران ووظائف الكلى ; Oyewole *et al.*, 2012) Khoshnoud *et al.*, 2018) ولاحظ Bakar و Aktac (2014) في المجموعة المعاملة ببنزوات الصوديوم عند مقارنتها بمجموعة السيطرة أعمدة خلايا الكبد غير منتظمة ، وتضخم الخلايا الكبدية ، وتنكس وعدم تنظيم القسم النسيجي للكبد بشكل رئيس عند المعاملة ببنزوات الصوديوم.

تتأثر كل مراحل الاستجابة الالتهابية بالإجهاد التأكسدي ، بما في ذلك إطلاق الجزيئات التي تعمل كإشارات خطر داخلية من الأنسجة التالفة ، وتفعيل مستقبلات المناعة وتحفيز مسارات الإشارات التي تبدأ الاستجابة الخلوية التكيفية لمثل هذه الإشارات الضارة (Lugrin *et al.*,2014) ، فقد أثبتت دراسة التأثير

السام لبنزوات الصوديوم على أنسجة الكبد ، كما انها تسبب تراكم حطام الخلايا الذي يحفز استجابات الخلايا الالتهابية للإصابات (Heidari *et al*., 2016) ، ويستجيب الجسم أثناء تلف الأنسجة من خلال إنتاج السيتوكينات الالتهابية النوعية المناعية (Dong *et al*., 1998).

وعلى وفق دراسة Belardelli عام (1995) تصل هذه السيتوكينات إلى الأنسجة المختلفة من خلال الدوران الجهازي الطبيعي وينتج تفاعل حاد ، والكمية الكُلية لعلامات الالتهاب المتحرره تعكس نوع وشدة تلف الأنسجة. تصنع السيتوكينات الالتهابية دور حاسم في تنظيم نشاط الخلايا الشجرية dendritic cells الخلايا وحيدة الخلية monocytes والخلايا اللمفاوية البائيه B lymphocytes والخلايا اللمفاوية التائية T lymphocytes والخلايا المقدمة للمستضد antigen processing ، والخلايا البطانية endothelial cells.

إنّ حدوث تنكس في خلايا الكبد وتخريب مظهرها وتضخمها يعزى إلى كمية الصوديوم الموجودة في مادة بنزوات الصوديوم ، والتي بدورها تؤثر على النسب الطبيعية الموجودة في الخلايا وهذا يتفق مع دراسة Sinha and D'souza (2010) على الفئران المعالجة ببنزوات الصوديوم ، إذ قد تكون التغيرات التنكسية هذه ناجمة عن إزالة الصوديوم من الخلايا ثم يتبعه انخفاض التجهيز بالطاقة ATP وبالتالي ، فإنّ تقليل الطاقة المطلوبة لتنظيم تركيز أيون الخلية قد تلعب دوراً في انتفاخ وتورم خلايا الكبد، وهذا يدل على ان الطاقة هي من متطلبات الخلية في محاولة للتغلب على السمية(Elwi , 1973) .

يقوم الكبد بإزالة السموم والتحويل الحيوي للمركبات الداخلية والخارجية، ويملك وظيفة مناعية من خلال نظام البلعمة ، ووظائف الإخراج عن طريق تحويل المركبات إلى أشكال قابلة للذوبان في الماء لإفرازها بواسطة القنوات الصفراوية ، والجهاز البولي أو الأمعاء (Stockham and Scott, 2008) .

من هنا فإنّ الضرر الذي تسببه بنزوات الصوديوم في أنسجة الكبد يظهر من خلال التأثير السام والمباشر على خلايا الكبد (Wells *et al*., 2016) ، مما يؤدي إلى تسرب محتويات خلايا الكبد بما في ذلك هذه الإنزيمات في الدورة الدموية، إذ يعد الكبد من أكبر الأجهزة المتخصصة لأداء وظائف مختلفة في الجسم ، بما في ذلك إزالة السموم وبالتالي تجعله عرضة للضرر بسبب هذه المواد والتمثيل الغذائي لها في الكبد . (Guyton and Hall, 2011) ، ويمكن أن تُعزى ارتفاع مستويات إنزيمات الكبد إلى تشكيل الجذور الحرة التي تهاجم أغشية خلايا الكبد مما يؤدي إلى تسرب الانزيمات(Cotran *et al*., 1999) .

ويعتمد حجم الزيادة في إنزيمات المصل على عدد خلايا الكبد المتضررة ، وشدة الإصابة، إذ يمكن أن تحدث تغيرات ملحوظة في معلمات المصل لإصابة الخلايا الكبدية أو الصفراوية مع عدم وجود دليل مورفولوجي على الإصابة والعكس صحيح، فأثناء إصابة الكبد قد تظهر اختلافات في المعايير الكيموحيوية والتغيرات المورفولوجية بسبب المدة الزمنية لهذه التأثيرات (Solter, 2005) .

وقد لوحظ في دراسة عولجت فيها الفئران ببنزوات الصوديوم (10، 75، 100، 750 ملغم) وصبغة غروب الشمس الصفراء (5، 20، 50، 200 ملغم) لمدة 12 اسبوعاً التغييرات النسيجية لأنسجة الكبد ، فقد لوحظ احتقان في الوريد المركزي وموت الخلايا المبرمج ونخر في الخلايا الكبدية ، وانتشار للخلايا الليفية fibroblasts في أنسجة الكبد (Ali *et al*., 2019) . وعلى وفق احدى الدراسات عندما عولجت الجرذان الحوامل بـبنزوات الصوديوم (0.5 ، 1 ، 1.5 ملغم/ مل) لوحظ تكسر الحمض النووي في أنسجة كبد الأم والجنين(Saatci *et al*., 2016)

أظهرت أنسجة الكبد في مجموعة الأرانب التي عُوملت بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) تراكم الدهون بشكل قطرات زيتية صغيرة microstatiosis عددها كثير بين الفصيصات الكبدية ، وارتشاح بعض الخلايا الالتهابية (خلايا كوبفر) ، وتخريب بسيط للمظهر المميز للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي كما موضح في الشكل (4-9) .

إنّ التعرض لبعض المواد السامة يؤثر على الريبوسومات وقدرتهم على إنتاج سلاسل الببتيد نتيجة لانخفاض تخليق الببتيد ، فيحدث تناقص في كمية البروتينات المشاركة في نقل الدهون الثلاثية ، وتتناقص خلايا الكبد و البروتينات وتُفقد أيضاً إنزيمات التمثيل الغذائي للدهون (Holm *et al*., 1993) . في الوقت نفسه ، يتم إنتاج الدهون الثلاثية بشكل مستمر بمعدل طبيعي ، مما يؤدي إلى تراكم الكريات الدهنية تدريجياً . في دراسة Alsamarrai وجماعته (2020) يمكن أن يرجع التنوع في سيتوبلازم خلايا الكبد إلى تدهورعضيات الخلية ولاسيما الميتوكوندريا مع انخفاض في مضخات الصوديوم والبوتاسيوم يتبعها تراكم الماء، ولعل هذه النتائج تتوافق مع ما توصل إليه Fujitani (1993) إذ لاحظ انتفاخ في بعض خلايا الكبد بواسطة بنزوات الصوديوم، فقد كشفت الدراسة عن زيادة عدد خلايا كوبفر في المجموعات المعالجة مع بنزوات الصوديوم سواء بالتركيز العالي او الواطئ . ونتائجنا متوافقة مع نتائج El-Shamy وجماعته (1999).

وقد اثبتت الدراسات أن بنزوات الصوديوم تسبب أضرارًا كبيرة في خلايا الكبد ، وانتفاخ (فجوة) ، وتدهور مادة الكروماتين ، وعدم تنظيم خلايا الكبد ، وتوسع الوريد المركزي ، ونزيف في كبد الحيوانات (Sinha and D' Souza 2010; Khidr *et al*., 2012 ; Hassan *et al*., 2016).

وبناء على دراسات سابقة يسبب العلاج بجرعة (200 ملغم/كلغم) من بنزوات الصوديوم لأسبوعين عن طريق الفم الآثار الضارة على الكبد ووظائف الكلى في الفئران، ويمكن أن تعزى التغيرات العامة في أنسجة الأعضاء إلى تأثير البنزوات والذي يسبب الإجهاد التأكسدي للخلايا ، إذ تؤدي البنزوات إلى توليد الجذور الحرة بواسطة أكسدة الدهون والعضيات ولاسيما أغشيتها ، فضلاً عن إنها تؤثر على تركيب البروتينات في الخلية ، مما يؤدي إلى تحفيز الموت المبرمج المعروف بإسم موت الخلايا المبرمج ، كل ذلك يؤثر سلبًا على أنسجة الجسم ، بما في ذلك الكبد والكلى(Oyewole *et al*., 2012 ; Khoshnoud *et al*., 2018) .

بينما اثبتت هذه الدراسة التغييرات النسيجية للكبد في المجموعة التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم) من وزن الجسم عن وجود عدد ضئيل من الخلايا الدهنية الزيتية microstatiosis ، وارتشاح للخلايا الالتهابية قرب الوريد المركزي، وعدم انتظام الخلايا الكبدية بشكل حبال حول الوريد المركزي مع ظهور تحسن في نسيج الكبد ، وربما يُعزى ذلك لتأثير الوقائي لمستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا و بقاء الوريد الكبدي متوسع كما موضح في الشكل (4-10).

إنّ زيادة الضرر في النسيج الكبدي عند وجود تركيز عالي من بنزوات الصوديوم قد يكون بسبب التركيز المنخفض من الإنزيمات المضادة للأكسدة التي تؤدي في النهاية إلى تكوّن الجذور الحره ، وتلف الأنسجة الكبدية (Li *et al*., 2015) .

وإن المستويات المرتفعة من الجذور الحرة تجعل النظام عرضة للإجهاد التأكسدي بسبب عدم كفاءة نظام الدفاع المضاد للأكسدة ، قد يؤدي إلى تعطيل الوظيفة الخلوية من خلال تعزيز حساسية الأغشية لبيروكسيد الدهون (Haidara *et al*., 2006) .

يؤدي الإجهاد التأكسدي في المايتوكوندريا في النهاية إلى التهاب ونخر خلوي (Lucchesi *et al*., 2013) ، بسبب التلف كبير في الأنسجة عن طريق الإجهاد التأكسدي ، ولهذا تم اختيار مستخلص أوراق المورينغا الإيثانولي على أساس الدراسات السابقة التي أظهرت دور المستخلص في تعزيز النشاط الوقائي

لنظام مضادات الأكسدة وإبطاء التطور المرضي لتغيرات الأنسجة الناتجة عن التعرض للمواد الغريبة .(Khalil *et al*., 2020 ; Mohamed *et al*., 2019)

تُظهر مستخلصات المورينغا أوليفيرا وظائف غذائية أو دوائية متعددة بما في ذلك مضادات الأكسدة ، ومضادات السرطان ، ومضادات الالتهابات ، والوقاية من أمراض الكبد ، والحماية العصبية ، ونقص السكر في الدم ، وخفض الدهون في الدم ،إذ ترتبط الوظائف المفيدة للمورينغا أوليفيرا ارتباطاً وثيقاً بمحتواها العالي من المواد الكيميائية النباتية مثل الفلافونويد والفينولات والكلوكوزينولات والأيزوثيوسيانات والأحماض الفينولية (El-Hadary and Ramadan, 2019) ، وتقوم الفلافونويدات بتحفيز تعبير انزيم GSTs والذي هو إنزيم واسع الطيف مزيل لسموم الكبد، إذ يحمي أنسجة الكبد والكلى من التدمير بسبب الأكسدة، وهو ما يلعب دورًا مهماً في الوقاية من السرطان ولاسيما سرطان الكبد (Eaton and Bammler , 1999) . ويحوي الكبد على نسبة عالية من الـ GST- α والتابع لـ GSTs العصاري الخلوي (Igarashi *et al*., 1991).

أظهرت أنسجة الكبد لمجموعة الأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم) المظهر الطبيعي لنسيج الكبد ، وقلة ارتشاح الخلايا الالتهابية، وقلة وجود الخلايا الدهنية، وانتظام الخلايا الكبدية بشكل حبال حول الوريد المركزي للفصيص الكبدي مثلما موضح في الشكل (4-11) .

إذ يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى تأكسد الدهون بوساطة الجذور الحرة مع إمكانية إتلاف أغشية الأنسجة، وبالتالي يعد بيروكسيد الدهون هو مؤشر فعال على الضرر التأكسدي الخلوي (Wilson and MacDonald 1986; Willekens *et al*.1997).

ويقلل مستخلص المورينغا أوليفيرا من الإجهاد التأكسدي عن طريق خفض بيروكسيد الدهون ، و أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) في الأرانب (Altaee *et al*., 2021) . وعلى وفق النتائج التي توصل إليها البحث الحالي والمتوافقة مع دراسة Wardhani (2020) بإن قلة ارتشاح الخلايا الالتهابية يعود لكون مستخلص المورينغا يمكن أن يعمل كمضاد للالتهابات حيث يحتوي ايزوثايوسانيك isothiocyanic ، والأحماض الفينولية ، والفلافونويد ، والتربينويدات .

ولمستخلص أوراق المورينغا تأثير إصلاحي على ضرر الكبد ، فهو يساهم في تعافي خلايا الكبد مما يؤدي إلى تسريع تجديد الخلايا البرنكيمية والليزوزومات ، وبالتالي حماية ضد تحطم غشاء الخلية

(Otomoso *et al*., 2015) . فضلاً عن إنه يُظهر تحسناً مبكراً في غشاء خلايا الكبد، وهو مظهر واضح لتأثير مضادات الاكسدة (El-bakry *et al*., 2016).

وهذه النتائج متوافقة مع دراسة Vergara-Jimenez وجماعته (2017) فقد خفف مستخلص أوراق المورينغا من تأثير بنزوات الصوديوم على الكبد بعد المعاملة ل30 يوم ، وقد يكون هذا بسبب التأثير الوقائي للمستخلص الذي يحتوي على خصائص مضادة للأكسدة قوية ناتجة عن المكونات النشطة بيولوجياً (البوليفينول ، والأحماض الفينولية ، والفلافونويد ، والقلويدات ، والجلوكوزينولات ، والأيزوثيوسيانات ، والصابونين) ، والفيتامينات ، والكاروتينات ، والمعادن الدقيقة والكبيرة (تانينات). على وفق دراسة Hollmanوجماعته (1999) التي أشارت إلى تأثير مركبات الفلافونويد على فعالية انزيم GST في الكبد.

وتظهر GSTs نشاط الكلوتاثيون بيروكسيديز وتحفز تقليل الهيدروبيروكسيدات العضوية، ومن بين المركبات التي يقللها الإنزيم ،هي الدهون الفوسفاتية والأحماض الدهنية وأكسيدات الحمض النووي التي تنتجها بيروكسيد الدهون والأضرار التأكسدية للحمض النووي (Hayes *et al*., 2005) . وتُظهر انزيمات GSTsأيضًا نشاط thiol transferase ولها دور في تفاعلات تحلل الثيول (Deponte, 2013) .

إلى جانب إزالة السموم ، فإن GSTs قادرعلى تنظيم توازن الأكسدة والاختزال في الخلايا لحمايتها من الأشعة فوق البنفسجية والإجهاد التأكسدي (Loyall *et al*., 2000; Roxas *et al*., 2000; Jiang *et al*., 2010).

4-3-2 التغيرات في نسيج الكلى Histological changes in kidneys

أظهر التصوير النسجي تحت المجهر الضوئي لمقاطع الكلى عن ظهور تغيرات بين مجاميع الأرانب مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة ، إذ ظهرَ نسيج كلى مجموعة السيطرة السالبة بمظهر طبيعي كانت كل من الكبيبات ومحفظة بومان ،والنبيب البولي القريب والبعيد والخلايا المبطنة للنبيبات طبيعية مثلما موضح في الشكل (4- 12) .

وأظهرت أنسجة كلى الأرانب التي عولجت مع مستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) مظهراً طبيعياً للخلايا الكلوية، إذ كانت النبيبات الكلوية طبيعية في لب الكليه مع وجود بعض الخلايا الالتهابية في لب وقشرة الكلية، مثلما في الشكل (4-13).

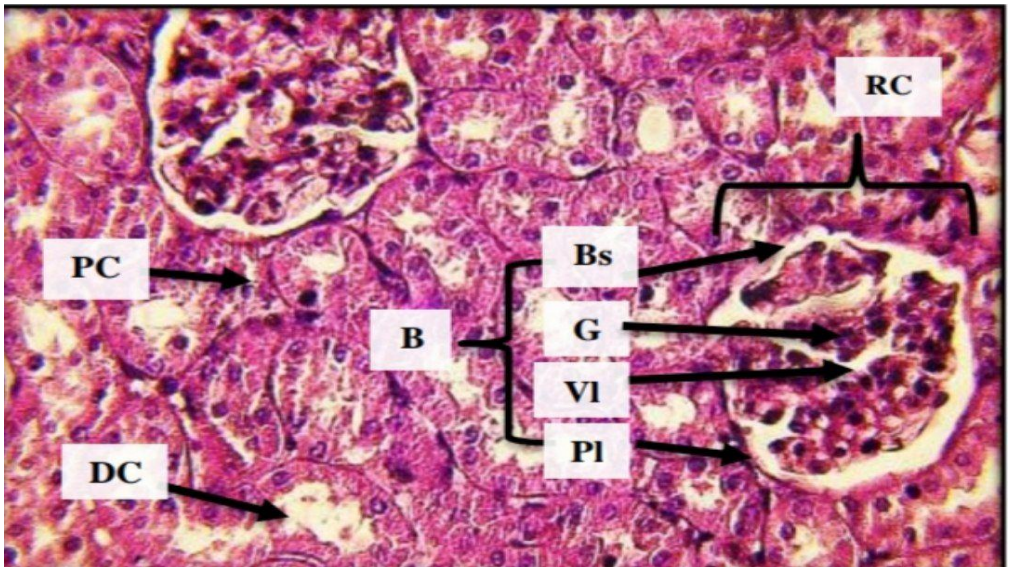
في حين أظهرت أنسجة الكلى في دراستنا لمجموعة الأرانب التي عُوملت بالتركيز العالي (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) انكماش الكبيبة الكلوية، وزيادة فراغ بومان، وكثرة الخلايا الالتهابية، وتوسع في

النبيبات البولية dilatation ، وتنخر في الخلايا المبطنه لنبيبات البولية ، ولوحظ في نسيج لُب الكلية توسع لنبيبات البولية وتراكم لدهون مثلما يظهر في الشكل (4-14).

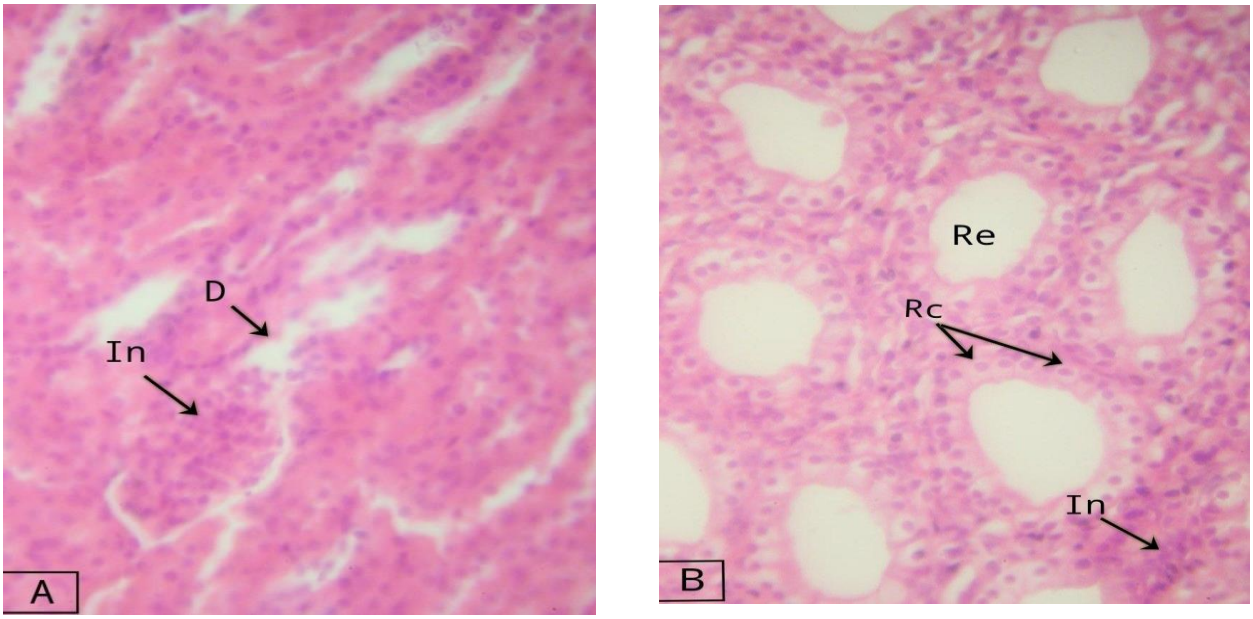
ولوحظ في أنسجة كلى الأرانب التي عُوملت بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) توسع لبعض النبيبات البولية، فضلاً عن تراكم بسيط للخلايا الدهنية مثلما موضح في الشكل (4-15) .

فقد أظهرت دراستنا لتغييرات النسجية لكلى الأرانب المعالجة بمستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) مظهراً طبيعياً للكبيبات الكلوية، وتوسع بسيط في بعض النبيبات البولية ، مع ارتشاح بسيط للخلايا الالتهابية وتنخر في الخلايا المبطنه لنبيبات البولية، وتحسن طفيف لنسيج الكلية ربما يعود السبب لاستعمال مستخلص أوراق المورينغا، و أظهر لب لكلية أرنب آخر لذات المجموعة النبيبات البولية طبيعية مع وجود قليل لبعض الخلايا الالتهابية بين النبيبات البولية مثلما موضح في الشكل (4-16).

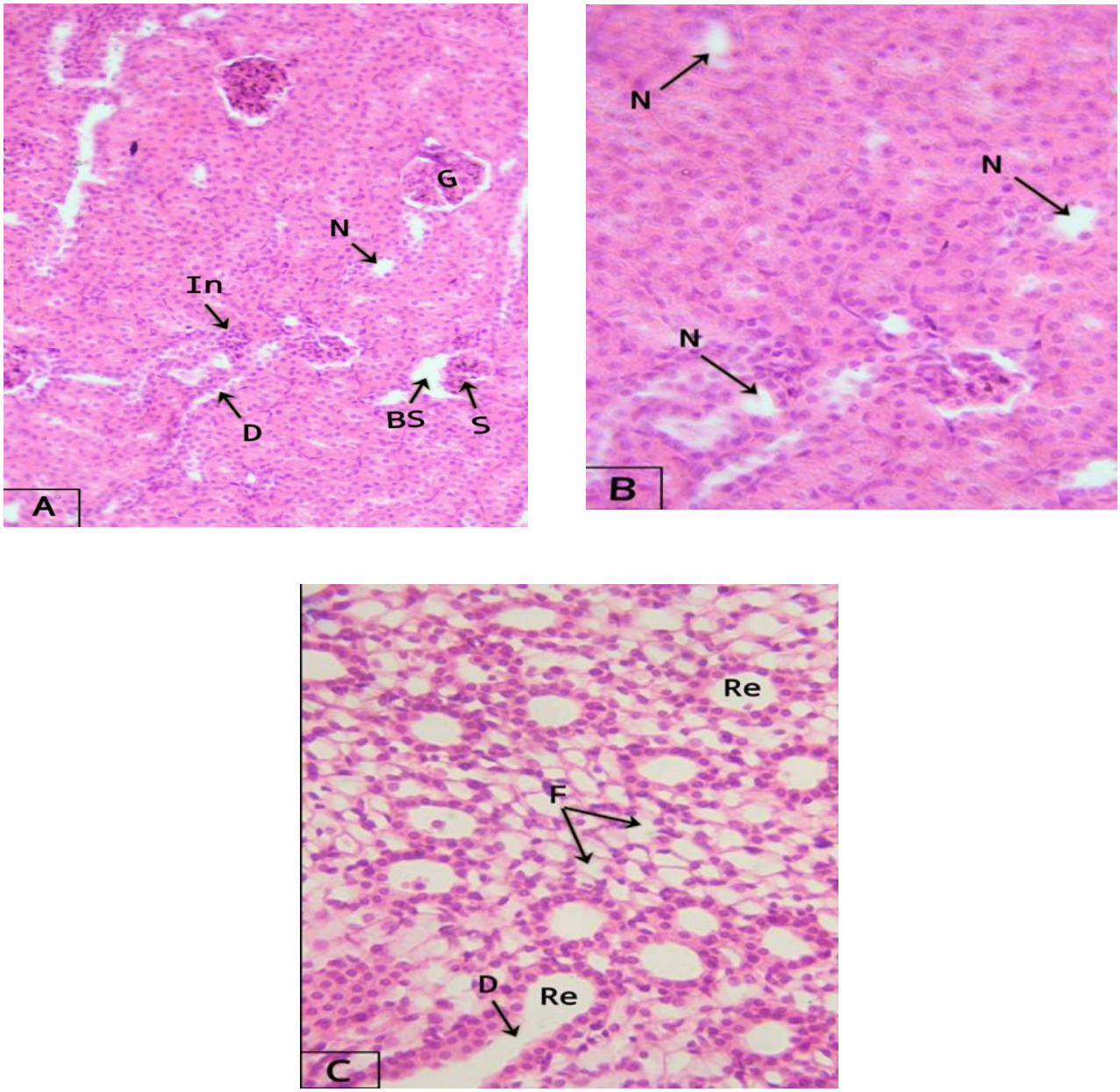
أمّا أنسجة الكلى للأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) فأظهر نسيج لب الكلية عن وجود Hyaline cast، ارتشاح وتراكم المواد البروتينية في النبيبات البولية لبعض الأرانب ووجود عدد قليل من الخلايا الدهنية مثلما موضح في الشكل (4-17).



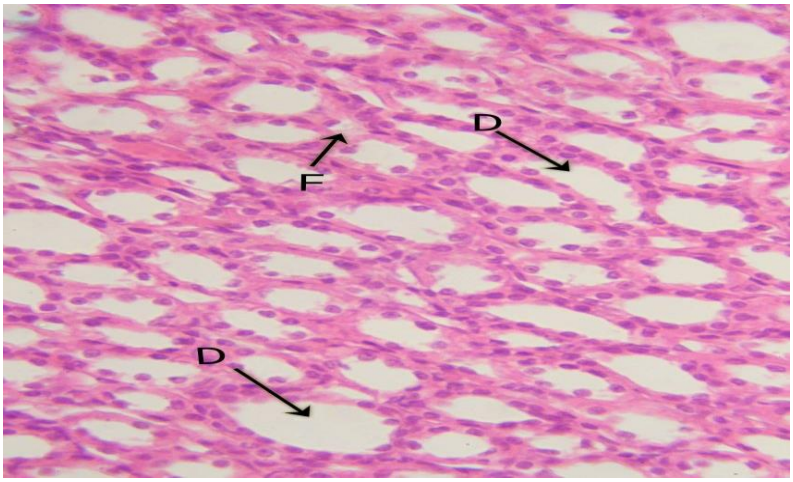
شكل رقم (4 - 12) : مقطع مستعرض في كلى أرانب مجموعة السيطرة السالبة يعرض التركيب النسيجي طبيعي، تظهر فيه الجسيمة الكلوية Renal corpuscle (Rc) ، وتتكون من محفظة بومان Bowman's capsule (BC) ، والكبيبة (G) Glomerulus ، محاطة بطبقة جدارية Parital layer (PL) ، والطبقة الاحشائية Viscer layer (VL) ، وفراغ بومان Bowman's space (BS). ويوضح ايضاً النبيب الملتوي الداني Proximal convoluted tubules (PCT) والقاصي Distal convoluted tubule (DCT) ، بقوة تكبير (400x) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



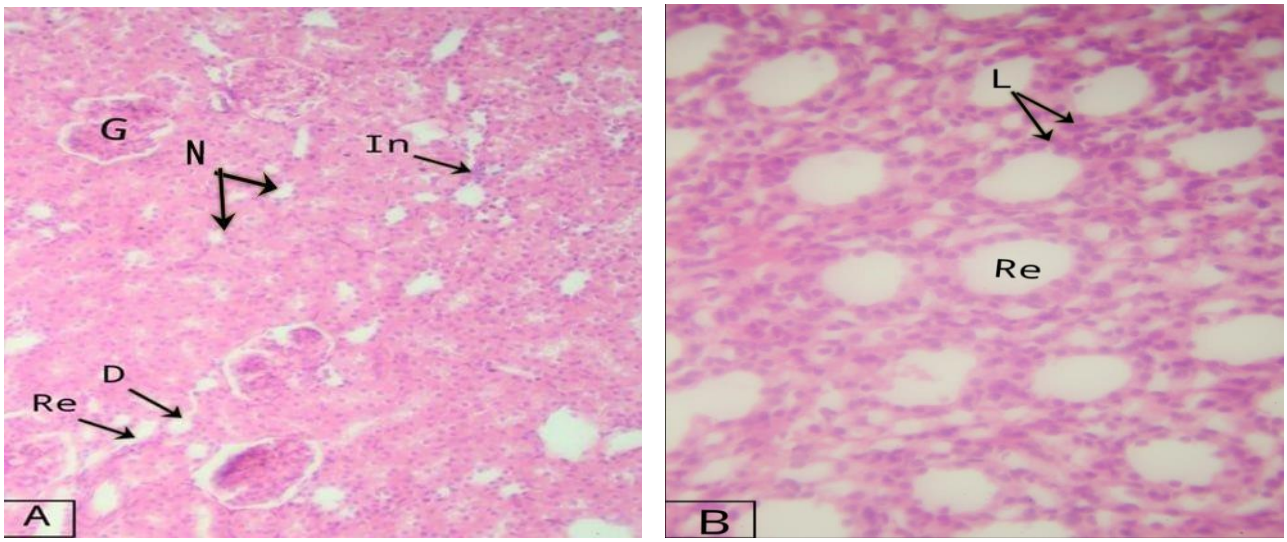
شكل (4 - 13) : مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم)، المقطع A) يعرض قشرة الكلية Cortex بمظهر تقريباً طبيعي مع ارتشاح قليل للخلايا الالتهابية Infiltration Lymphocytes (In) وتوسع dilatation (D) لبعض النبيبات البولية تحت قوة تكبير (200X) والمقطع B) يعرض لب الكلية Medulla مع خلايا كلوية طبيعية renal cell (Rc) ، و النبيبات الكلوية طبيعية renal tubules (Re) مع ارتشاح قليل للخلايا الالتهابية Infiltration Lymphocytes (In) تحت قوه (400X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



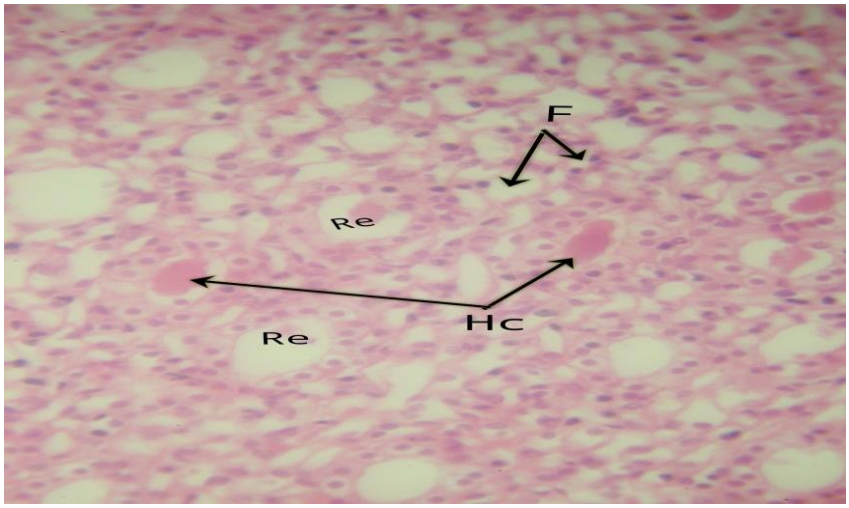
شكل (4 - 14) : مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم)، يُظهر المقطع A) انكماش shrinkage (S) الكبيبة الكلوية Glomerulus (G) ، زيادة فراغ بومان Bowman's Space (BS) ، كثرة ارتشاح الخلايا الالتهابية Infiltration Lymphocytes (In) في النسيج الكلوي ، توسع dilatation (D) في النبيبات البولية renal tubules (Re) تحت قوة تكبير (200X) ، المقطع B) يكشف عن تنخر Necrosis (N) في الخلايا المبطنه لنبيبات البولية renal tubules (Re) تحت قوه تكبير (400X) . C) يعرض نسيج لُب الكلية Medulla توسع لنبيبات البولية renal tubules dilatation (D) وكثرة تراكم الخلايا الدهنية Fat cells (F) بقوة تكبير (200X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



شكل (4 - 15) : مقطع مستعرض في لب كلية أرانب المجموعة المعالجة بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) يظهر توسع dilatation (D) لبعض النبيبات البولية renal tubules (Re) وتراكم بسيط للخلايا الدهنية Fat cells (F) بقوة تكبير (200X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain)



شكل (4 - 16) : مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ، المقطع A) قشرة الكلية Cortex يُظهر الكبيبات الكلوية طبيعية Glomerulus (G) ، توسع بسيط dilatation (D) في بعض النبيبات البولية (Re) مع ارتشاح بسيط لبعض الخلايا الالتهابية Infiltration Lymphocytes (In) ، وتنخر necrosis (N) في الخلايا المبطنه لنبيبات البولية ، تحسن المظهر النسيجي للكلية ربما يعود السبب لاستخدام مستخلص أوراق المورينغا بقوة تكبير (200X). المقطع B) أظهر لب كلية medulla أرنب آخر لذات المجموعة النبيبات البولية طبيعية renal tubules (Re) مع وجود قليل لبعض الخلايا الالتهابية Lymphocytes (L) بين النبيبات البولية. تحت قوة تكبير (400X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).



شكل (4 - 17) : مقطع مستعرض في كلية أرانب المجموعة المعالجة بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ، يعرض المقطع نسيج لب الكلية Medulla عن وجود Hyaline cast (Hc)، ارتشاح وتراكم المواد البروتينية Infiltration protein substances في النبيبات البولية (renal tubules (Re لبعض الأرانب ووجود عدد قليل من الخلايا الدهنية fats cell (F) تحت قوة تكبير (200X) ملونة بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين (Hematoxylin & eosin stain).

أظهرت أنسجة كلى الأرانب التي عولجت مع مستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) مظهرًا طبيعيًا للخلايا الكلوية، إذ كانت النبيبات الكلوية طبيعية في لب الكليه مع وجود بعض الخلايا الالتهابية في لب وقشرة الكلية مثلما في الشكل (4-13).

إن وجود القليل من الخلايا الالتهابية في دراستنا ربما بسبب وجود سمية منخفضه للمورينغا ، وذلك لأنّ تركيب الكلى غني بالأحماض الدهنية غير المشبعة والتي تكون عرضه للتلف والضرر أكثر من الكبد ، فحسب دراسة Ozbek عام (2012) التي اشارت إلى أنّ الكلى عضو شديد التأثر لإصابته بأنواع الأكسجين التفاعلية ROS بسبب وفرة الأحماض الدهنية غير المشبعة طويلة السلسلة في تكوين ، أو تركيب دهون الخلايا الكلوية، بينما الكبد فهو عضو يتجدد بسرعة نسبية (Gonzalo-Orden et al., 2003) ، وذلك يعكس عدم تضرره بمستخلص أوراق المورينغا مقارنة بالكليه .

وأظهرت دراسات السمية في الحيوانات أن مستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا قد يكون آمنًا للاستهلاك، ولكن قد تسبب المورينغا سمية عن طريق تراكم بعض العناصر (Ali *et al*. 2019) ، فكمية 70 غرام من أوراق المورينغا المجففة في اليوم هي الحد الأقصى للجرعة الموصى بها (Asiedu-Gyekye *et al*., 2014). لان المورينغا أوليفيرا لديها سمية منخفضة ، وهي آمنه للاستهلاك البشري حتى عند الجرعات العالية .(Qamar *et al*., 2019 ; Sutalangka *et al*., 2013)

أظهرت أنسجة الكلى في دراستنا لمجموعة الأرانب التي عُوملت بالتركيز العالي (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) انكماش الكبيبة الكلوية، وزيادة فراغ بومان، وكثرة الخلايا الالتهابية، وتوسع في النبيبات البولية dilatation، وتنخر في الخلايا المبطنه للنبيبات البولية ولوحظ في نسيج لُب الكلية توسع لنبيبات البولية وتراكم لدهون كما يظهر في الشكل (4-14) .

تعد الكلى عضواً شديد التأثر لإصابته بأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) بسبب وفرة الأحماض الدهنية غير المشبعة طويلة السلسلة في تكوين او تركيب دهون الخلايا الكلوية (Ozbek , 2012).

بحسب دراسة Yazar وجماعته (2002) فتهاجم أنواع الأكسجين التفاعلية الأحماض الدهنية غير المشبعة في أغشية الخلية والمكونات السيتوبلازمية داخل الخلايا ، والتي تمثل ارتفاع مستوى (MDA) في الأنسجة الكلوية للفئران . ويشير استنفاد إنزيمات مضادات الأكسدة الكلوية مثل SOD إلى عدم قدرة آليات مضادات الأكسدة على مواجهة التوليد المتزايد لانواع الاوكسجين التفاعلية ROS .

قد تكون هذه النتائج بسبب ROS المسؤولة عن إتلاف جميع الجزيئات الخلوية بما في ذلك الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة والكربوهيدرات وبروتينات الغشاء والحمض النووي ، مما قد يؤدي إلى ضعف الوظائف الخلوية (Al-Damegh, 2014) ، فالحدود القصوى لـ ROS من شأنها أن تؤدي إلى الشيخوخة أو موت الخلايا المبرمج أو التهاب الخلايا المبرمج (Dodson *et al*., 2019; Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016) .

وعلى وفق دراسة Finkel (2011) اثبت بأن التعرض لأنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) يسبب تلف بنية الخلية والكثير من الإجهاد التأكسدي ، إذ يؤدي الإجهاد التأكسدي في المايتوكوندريا في النهاية إلى التهاب ونخر خلوي (Lucchesi *et al*., 2013) .

ويحدث توزيع فريد لكل α-GST و π-GST في الكلى ويقع α-GST في المقام الأول في الأنابيب البولية القريبة ، في حين أن π-GST هو موجود بشكل رئيس في منطقة النبيبات البولية البعيدة من النيفرون (Campbell *et al*., 1991)، فقد تمكنت الدراسات من تحديد حدوث أضرار للأنابيب القريبة أو البعيدة في الكلى عن طريق مراقبة GST البولية (Egar *et al*., 1997) ، وتم الإشارة إلى زيادة التعبير عن GST وتحديداً π-GST ، في تحول الأورام الخبيثة لمجموعة متنوعة من الخلايا والأنسجة بما في ذلك الخلايا الكلوية (Grignon *et al*., 1994) .

وقد لوحظ من خلال هذه الدراسة ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في فعالية GST في مجموعة الأرانب التي جرعت بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) وتوافق ذلك مع دراسة Sadzuka وجماعته (1994) التي أشارت إلى إنّ الزيادة في انزيم GST ترافقت مع حدوث نخر في خلايا الأنبوب البولي القريب .

كما تم اثبات أن العوامل السامة للكلية تزيد من تركيز µ-GST الخاص بالكلية (Trakshell and Maines, 1988; Moser *et al*., 1995). وذلك ربما يشير إلى السمية التي أظهرتها بنزوات الصوديوم في دراستنا .

وعلى وفق دراسة Elwi وجماعته (1973) تم تفسير النخر على أنه الموت الموضعي لأنسجة المجموعة بعد إصابة بالتحطم الحاد او الشديد . وأضافوا أن التغييرات المبكرة في الخلايا الميتة كانت عبارة عن انتفاخ في السيتوبلازم بسبب تشرب السوائل داخل الخلية وتجلط الخلايا الظهارية في البروتوبلازم ، بعد ذلك ، تفقد الخلايا أغشيتها وتصبح غير مميزة عن بعضها البعض وتصبح النواة منكمشه والكروماتين كثيف ومظلم ، ويتمزق الغشاء النووي وتتحطم النواة إلى قطع صغيرة "karyorhexis".

يتم تنظيم تعبير السيتوكينات الالتهابية بواسطة منظم الالتهاب NF-jB وزيادة تركيز السيتوكينات الالتهابية، ويمكن أن يعزى إلى زيادة التعبيرعن NF-jB منظم الالتهاب (Lawrence *et al*., 2001) ، وظهور ارتفاع في السيتوكينات الالتهابية هو رد على أن المادة الحافظة المتمثلة ببنزوات الصوديوم تتسبب في تلف الأنسجة الداخلية وتفعيل مسار إشارات منظم الالتهاب NF-jB . فكثير من أنواع المضافات الغذائية مثل بنزوات الصوديوم وكارمويسين carmoisine وترترازين tartrazine وجدت بأنها تزيد من التعبير عن منظم الالتهاب NF-jB حسب دراسة Raposa *et al*. (2016) . وبالتالي ذلك يفسر كثرة ارتشاح الخلايا الالتهابية في دراستنا .

وأظهرت دراسة لأنسجة الكلى في ذكور الفئران المعالجة ببنزوات الصوديوم (200 ملغم/كلغم) ونتريت الصوديوم (80 ملغم/كلغم) ومزيجهم ل 8 أسابيع وذمة حول الكبيبات ، وانكماش الكبيبات ، وانحلال لبعض النبيبات الكلوية ، وتجوف للخلايا ، ونواة محدبة ، ونخر ، ووجود خلايا التهابية في تجويف النبيبات الكلوية (Radwan *et al*., 2020)

فقد توافقت هذه النتائج مع ماتوصلت إليه دراسة Alsamarrai وجماعته (2020) على أنسجة الكلى في الأرانب المعاملة بتراكيز من بنزوات الصوديوم ، إذ لوحظت تغييرات نسيجية في الكلى مثل نخر وتلف الأنابيب الكلوية ، واحتقان ، وجود خلايا التهابية ، وتلف في النوى و الغشاء القاعدي.

وأشار Bakar و Aktac (2014) إلى التغييرات النسيجية للكلى عند المعاملة ببنزوات الصوديوم بالمقارنة بمجموعة السيطرة فقد لوحظ إصابة الغشاء في السطح القمي للخلايا الأنبوبية، والخلايا الأنبوبية فقدت النوى ، وانحلال البنية الكبيبية ، وإصابة الغشاء القاعدي والإصابة الظهارية الحشوية تظهر في القسم الكلوي . على وفق دراسة Zeghib وجماعته (2021) اثبت ان بنزوات الصوديوم اثرت على أنسجة الكلى والكبد. إذ وجد إنّ بنزوات الصوديوم قد تؤثر على الكلى أكثر من الكبد.

وعندما يحدث تلف الخلية والإجهاد التأكسدي ، تستجيب الأعضاء والأنسجة من خلال تنظيم توازن الأكسدة والاختزال الصحيح لتعويض تأثيرات أنواع الأكسجين التفاعلية (Willcox *et al*., 2004).

ولوحظ تأثير بنزوات الصوديوم على ارتفاع مستويات الإجهاد التأكسدي والعمليات الالتهابية في أمراض القنوات الصفراوية والكلى، والأمراض التنكسية العصبية ، والسرطان ، والسكري ، وأمراض القلب والأوعية الدموية (Liguori *et al*., 2018) .

يمثل الإجهاد التأكسدي اضطراباً في الأكسدة الخلوية، والتوازن والإفراط في إنتاج ROS ، ويعد الإجهاد التأكسدي سبباً لكثير من الأمراض وذلك لأنه يستحث تعديلات على الوظيفة في الدهون والبروتينات والأحماض النووية. والخلل بين أنواع الأكسجين التفاعلية ومضادات الأكسدة قد يؤدي إلى عوامل مثل الإفراط في التعبير عن الجينات المسرطنة ، وتوليد مركبات الطفرات ، و تعزيز نشاط تصلب الشرايين أو التهاب، وهذا قد يؤدي إلى السرطان ، والتنكس العصبي ، وأمراض القلب والأوعية الدموية والسكري أو أمراض الكلى (Saha *et al*., 2017 ; Niemann *et al*., 2017; Barone *et al*., 2018) .

بينما لوحظ في أنسجة كلى الأرانب التي عُوملت بالتركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) توسع لبعض النبيبات البولية فضلاً عن تراكم بسيط للخلايا الدهنية مثلما موضح في الشكل (4-15) .

فالتغييرات في الأنسجة قد تكون بسبب زيادة بيروكسيد الدهون وينتج كميات كبيرة من ROS و RNS كجذور حرة والتي تؤدي إلى زيادة نشاط عمل الجهاز المضاد للأكسدة (Mazin *et al*., 2018 ;

.(Khodaei *et al*., 2019 ، تأثير بنزوات الصوديوم يشمل موت الخلايا والتأثير السام لها والتأثير المطفر والمسرطن (Raposa *et al*., 2016 ; Shahmohammadi *et al*., 2016) .

فقد تم الإثبات بأن بنزوات الصوديوم ترفع مستوى الدهون الكلية ، وبيروكسيداز الدهون ، والكلوتاثيون بيروكسيديز ، والشوارد (الصوديوم والبوتاسيوم و كلوريد) ، وخفض مستوى البروتين الكلي، بالتالي لها تأثير على وظائف الكبد ووظائف الكلى والدهون وعلامات الإجهاد التأكسدي ; Helal *et al*., 2019) .(Tawfek *et al*., 2015 إذ توجد أدلة قوية تشير إلى إن الإجهاد التأكسدي يعزز تلف المكونات الخلوية ، بما في ذلك البروتينات ، والدهون ، والأغشية ، والحمض النووي (Sosa *et al*., 2013). فضلاً عن توليد بنزوات الصوديوم للإجهاد التأكسدي لها تأثيرات سلبية على جهاز المناعة والكبد والكلى ,Pongsavee) . 2015)

فقد أظهرت دراستنا لتغييرات النسجية لكلى الأرانب المعالجة بمستخلص أوراق المورينغا (200 ملغم/كلغم/وزن الجسم) ثم التركيز العالي من بنزوات الصوديوم (500 ملغم/كلغم/وزن الجسم) المظهر الطبيعي للكبيبات الكلوية، وتوسع بسيط في بعض النبيبات البولية مع ارتشاح بسيط لبعض الخلايا الالتهابية ، تنخربسيط في الخلايا المبطنه لنبيبات البولية وتحسن بسيط لنسيج الكلية ربما يعود السبب لأستعمال مستخلص أوراق المورينغا، و أظهر لب لكلية أرنب آخر لذات المجموعة النبيبات البولية طبيعية مع وجود قليل لبعض الخلايا الالتهابية بين النبيبات البولية مثلما موضح في الشكل (4-16).

وكثيراً ما لوحظ الإجهاد التأكسدي في أمراض الكلى (Uddin *et al*., 2021 ;; Hwang *et al*., 2019) . وأصبح عامل تشخيصي (Rapa *et al*., 2019) . إذ وثَّقت عدد من الدراسات أن المورينغا أوليفيرا لها خصائص مضادة للأكسدة لحماية أو تخفيف الضرر الخلوي ، وأظهرت مستخلصات ومركبات المورينغا وخاصة الكيرسيتين quercetin ، والكامبفيرول kaempferol ، والأيزوثيوسيانات isothiocyanates ، والروتين rutin ، والميريسيتين myricetin ، وحمض الأسكوربيك ascorbic acid ، وبيتا كاروتين-β carotene، إمكانات مضادة للأكسدة عن طريق الكسح المباشر للجذور الحرة(Pakade *et al*., 2013) .

تؤدي التأثيرات السامة لـ ROS إلى أكسدة الدهون lipid peroxidation (LPO) وإنتاج 4-hydroxynonenal و malondialdehyde (MDA). نتيجة LPO يتم تحفز الضرر التأكسدي في الأنسجة. (Wells *et al*., 2016 ; Jamshidzadeh *et al*., 2017).

ويؤدي الإجهاد التأكسدي في المايتوكوندريا في النهاية إلى التهاب ونخر خلوي (Lucchesi *et al*., 2013). يقلل المورينغا أوليفيرا من النخر وتوسع الأنابيب الكلوية في الفئران (Saleh *et al*., 2018) . يقلل مستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا من الإجهاد التأكسدي وتلف الكلى والكبد(Arafat *et al*., 2018) .

إنّ نبات المورينغا يحتوي على أنشطة مضادة للسرطان ، ومضادة لمرض السكر ، ومضادة للالتهابات، ومضادة لتصلب الشرايين ، ومضادة للاستماتة ، ووقاية الكبد ، ووقاية الأعصاب ، ووقاية للقلب (Abdel-Daim *et al*., 2020 ; Albasher *et al*., 2020; Abd-Elhakim *et al*., 2021).

يُعرف مستخلص أوراق المورينغا أوليفيرا بخصائصه الطبية والوقائيةلأنّه يحتوي على مستويات عالية من مضادات الأكسدة (Cuellar-Nuñez *et al*., 2018) والبوليفينول (Dollah *et al*., 2016) .

فأنسجة الكلى للأرانب التي جرعت بمستخلص المورينغا (200 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) ثم التركيز الواطئ من بنزوات الصوديوم (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) فقد أظهر نسيج لب الكلية عن وجود Hyaline cast ، ارتشاح وتراكم المواد البروتينية في النبيبات البولية لبعض الأرانب ووجود عدد قليل من الخلايا الدهنية كما موضح في الشكل (4-17).

ويتم تكوين Hyaline cast بسبب انخفاض إعادة امتصاص البروتين داخل النبيبات الكلوية ، مما يؤدي إلى تراكم هذة البروتينات داخل تجاويف النبيبات البولية ، وهذه المواد البروتينية تسبب زيادة الضغط داخل النبيب وانخفاضاً في معدل الترشيح الكبيبي (Racusen *et al*., 1991) ، وعادة ما يتم ملاحظة Casts في النبيبات البعيدة ، ومع ذلك ، هناك دليل على أنها توجد أيضاً في النبيبات القريبة وحتى في الكبيبات (Start *et al*., 1988).

ففي بعض الاحيان يتم رؤية عدد قليل جداً من الـ Casts في فحوصات البول دون حدوث خلل في وظيفة الكلى ، إذ تعد الـ Cast المكونة من Hyaline هي الأكثر مشاهدة ، ويعد (0 - 2) من الـ Casts لكل مجال أمرًا طبيعيًا ، إذ يؤثر ارتفاع تركيز البول الناتج من الجفاف ، وارتفاع تركيز الألبومين على ظهور Hyaline Casts في البول (McPherson and Pincus, 2017) ، ويمكن أيضًا رؤية Hyaline Casts عندما يكون هناك انخفاض في ضخ الكلية مؤدي إلى تباطؤ تدفق البول (Cavanaugh and Perazella, 2019).

فحسب دراسة Luque وجماعته (2017) فإنّ إفراز البروتينات ومركبات العلاج الدوائي وإعادة امتصاصها في البول له تأثير كبير على تكوين Casts . وضح AL-Shinnawy في (2009) إنّ زيادة

تركيز بروتينات المصل بسبب بنزوات الصوديوم قد يكون ناتجاً عن تنشيط بناء البروتين أثناء تلف الكبد وأمراض الكلى المزمنة والالتهاب.

لاحظت دراسة حديثه عولجت فيها الفئران ببنزوات الصوديوم (10، 75، 100، 750 ملغم) وصبغة غروب الشمس الصفراء (5، 20، 50، 200 ملغم) لمدة 12 اسبوعاً تغييرات نسيجية للكلى متمثلة بملاحظة البروتين المصبوب في تجويف أنابيب أنسجة الكلى ، واحتقان في وعاء الدم الكلوي ، وفجوة في الأنابيب الكلوية والخصلة الكبيبية (Ali *et al*., 2019).

وعلى وفق دراسة Fombang و Saa (2016) فإنّ تناول شاي المورينغا بمقدار 200 مل ساعد في انخفاض مستوى السكر بالدم نتيجة لاحتواء أوراق المورينغا على الفلافونويدات ومضادات الأكسدة مثل a-tocopherol والتي أدت لزيادة إفراز الأنسولين ، وبالتالي المساهمه في خفض مستوى السكر الدم.

بالنظر إلى الدراسات التي أوضحت بأن مستخلصات أوراق المورينغا نتيجة احتواءها على الفلافونويدات والفلافونولات والبوليفينول جعلها تساهم في انخفاض نسبة السكر والبروتينات الدهنية للجرذان المصابة بداء السكر (Muhammad *et al*., 2016) .

وتم الاعتراف سابقًا بالمحتوى المضاد للأكسدة في المورينغا ، لأنه يحمي بشكل فعال الخلايا من الأضرار التأكسدية التي تسببها الجذور الحرة (Khalil *et al*., 2020) . على وفق دراسة Abdou وجماعته (2019) فقد اثبت بأن مستخلص أوراق المورينغا يحمي من التهاب الكلى الخلالي، وتحسن المورينغا وظائف الأعضاء من خلال العمل كمنظم للأكسدة والتلف (Kou *et al*., 2018) .

الاستنتاجات Conclusions:

1. أظهر إستعمال بنزوات الصوديوم بالتركيز العالي (500 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) اضراراً نسيجية وكيموحيوية شديدة على كل من الكبد والكلى كانت أكثر حدة من بنزوات الصوديوم بالتركيز الواطيء (250 ملغم/كلغم/ وزن الجسم).

2. إنّ مستخلص أوراق المورينغا يقلل من الإجهاد التأكسدي بفعل انواع الاوكسجين التفاعلية Reactive oxygen species (ROS) الناتجة من استقلاب بنزوات الصوديوم في الكلى والكبد .

3. أظهر انزيم GST انخفاضاً معنوياً في كل مجاميع الأرانب سواء أكانت المعاملة ببنزوات الصوديوم بالتركيز الواطيء (250 ملغم/كلغم/وزن الجسم) أم مجموعة الارانب المعاملة بمستخلص أوراق المورينغا(200 ملغم/كلغم/ وزن الجسم) ومجاميع الأرانب المعاملة ببنزوات الصوديوم مع مستخلص أوراق المورينغا بالمقارنة مع الأرانب المعاملة ببنزوات الصوديوم بالتركيز العالي (500 ملغم/كلغم/ وزن الجسم).

4. إنّ تناول بنزوات الصوديوم عن طريق الفم يسبب تلف في نسيج الكلى أكثر من الكبد ، بسبب امتلاك الكبد لنظام مضادات أكسدة قوي وأكثر نشاطاً يمكن أن يحمي الخلايا من الإجهاد التأكسدي.

التوصيات Recommendations :

1. يجب مراعاة تراكيز بنزوات الصوديوم المضافة للمواد الغذائية لحفظها ودراسة ذلك ، فقد يكون لها تأثير تراكمي مستقبلاً ، فضلاً عن تقليل استعمال بنزوات الصوديوم كمادة حافظة في المشروبات الغازية والعصائر التي تضاف فيها فيتامين C لانة بتعرضه لحرارة الشمس والاضاءة سوف يزيد من فرصة تحوله الى مواد مسرطنة كالبنزين .
2. دراسة التأثيرات النسيجية من المعاملة ببنزوات الصوديوم على كل من نسيج القلب والعضلات والرئتين والدماغ .
3. دراسة التأثير السمي لمستخلص أوراق المورينغا على المعايير الكيموحيوية والنسيجية للكلى والكبد والدماغ .
4. دراسة لمستخلصات بذور المورينغا أوليفيرا ضد الإجهاد التأكسدي المستحث بفعل بنزوات الصوديوم في أنسجة الكبد والكلى للحيوانات

المصادر والمراجع

المصادروالمراجع:

Abarikwu, S.O.; Benjamin, S.; Ebah, S.G.; Obilor, G.; and Agbam, G.(2017). Protective effect of *Moringa oleifera* oil against HgCl2-induced hepato- and nephro-toxicity in rats. J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol, 28, 337–345.

Abd Karim, N.A.; Ibrahim, M.D.; Kntayya, S.B.; Rukayadi, Y.; Abd Hamid, H. and Abdull Razis, A.F. (2016). *Moringa oleifera* Lam: targeting chemoprevention. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention,17 (8): 3675-3686.

Abd-alwahab, W. I. (2018). Identifying and Study of some of Phytochemical compounds and Anti-Jaundice Activity for powder of leaves and seeds of *Moringa oleifera* in male albino rats. Tikrit Journal of Pure Science, 23(2), 66-72.

Abdel Aziz, I. I. and Zabut, B.M.(2012). Blood indices of sodium-benzoate administrated albino rats: effect of Olive oil and/or time-dependent recovery . Egyptian Journal of Biology, 14: 50-56 .

Abdel-Daim, M.M.; Khalil, S.R.; Awad A.; Abu Zeid, E.H.; El-Aziz, R.A. and El-Serehy H.A. (2020). Ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves influences NF-κB signaling pathway to restore kidney tissue from cobalt-mediated oxidative injury and inflammation in rats Nutrients, 12, p. 1031 -1037.

Abd-Elhakim, Y.M.; Mohamed, W.A.M.; El.Bohi K.M.; Ali H.A.; Mahmoud F.A. and Saber T.M. (2021). Prevention of melamine-induced hepatorenal impairment by an ethanolic extract of *Moringa oleifera*: changes in KIM-1, TIMP-1, oxidative stress, apoptosis, and inflammation-related genes Gene, 764, Article 145083

Abdou, K.H.; Moselhy, W.A.; Mohamed, H.M.; El-Nahass, E.S. and Khalifa, A.G. (2019). *Moringa oleifera* leaves extract protects titanium dioxide nanoparticles-

induced nephrotoxicity via Nrf2/HO-1 signaling and amelioration of oxidative stress. Biol. Trace. Elem. Res, 187, 181–191.

Abou-Elkhair, R.; Abdo Basha, H.; Slouma Hamouda Abd El Naby, W.; Ajarem, J. S.; Maodaa, S. N.; Allam, A. A.; and Naiel, M. A. (2020). Effect of a Diet Supplemented with the *Moringa oleifera* Seed Powder on the Performance, Egg Quality, and Gene Expression in Japanese Laying Quail under Heat-Stress. Animals, 10(5), 809 - 819.

Ademiluyi, A. O.; Aladeselu, O. H.; Oboh, G.; and Boligon, A. A. (2018). Drying alters the phenolic constituents, antioxidant properties, α-amylase, and α-glucosidase inhibitory properties of Moringa (Moringa oleifera) leaf. Food Science & Nutrition, 6(8), 2123-2133.

Adeyemi, O. S.; and Elebiyo, T. C. (2014). *Moringa oleifera* supplemented diets prevented nickel-induced nephrotoxicity in wistar rats. Journal of nutrition and metabolism :1-9.

Agarwal, A.; Sharma, A.; Nigam, G.L.; Gupta, A.; Pandey, V.D.; Malik, A.; Yadav, A. (2016) Histological profile of liver of albino rats on oral administration of sodium benzoate. J. Anat. Sci, 24, 29–32.

Ahmed, K.S.; Banik, R.; Hossain, M.H. and Jahan, I.A. (2016). Vitamin C (L-ascorbic Acid) content in different parts of *Moringa oleifera* grown in Bangladesh. American Chemical Science Journal, 11(1): 1-6.

Akinrinde, A. S.; Oduwole, O.; Akinrinmade, F.J. and Bolaji-Alabi, F. B.; (2020). Nephroprotective effect of methanol extract of Moringa oleifera leaves on acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion in rats. Afri Health Sci.;20(3).

Al-Ameen, S.A.; Jarjees, E.H. and Tawfeeq, F.Kh.; .(2022). Effect of sodium benzoate on some biochemical, physiological and histopathological aspects in adult male rats. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 36, No. 2, 267-272

Albasher, G.; Alrajhi, R.; Alshammry E. and Almeer R., (2020). Moringa oleifera leaf extract attenuates Pb acetate-induced testicular damage in rats Comb. Chem. High Throughput Screen. 4:70-78.

Al-Damegh, M.A. (2014) Stress-induced changes in testosterone secretion in male rats: role of oxidative stress and modulation by antioxidants open. J. of Ani. Sci., 4:70-78.

Ali, A.; Akhtar, N.; Khan, M.S.; Khan, M.T.; Ullah, A. and Shah, M.I. (2013). Effect of *Moringa oleifera* on undesireble skin sebum secretions of sebaceous glands observed during winter season in humans. Biomedical Research, 24 (1): 127-130.

Ali, A; Yusof, A; Chin, L; Ibrahim, M.N and Muneer, S. (2019) Development and standardization of *Moringa oleifera* leaves as a natural dietary supplement [J]. J Diet Suppl., 16(1):66–85.

Ali, F.T.; Hassan, N.S. and Abdrabou, R.R. (2016). Hepatoprotective and antiproliferative activity of moringinine, chlorogenic acid and quercetin. International Journal of Research in Medical Sciences, 4(4): 1147-1153.

Ali, M.Y.; Hassan, A.M.S; Mohamed Z.A and Ramadan, M.F. (2019). Effect of food colorants and additives on the hematological and histological characteristics of albino rats. Toxicology and Environmental Health Sciences,11(2):155- 167.

Allocati, N.; Masulli, M.; Di Ilio, C and Federici L., .(2018). Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases, Oncogenesis 7 (1) 8

Allocati, N; Federici, L; Masulli, M and Di Ilio, C. (2009) ،"Glutathione transferases in bacteria" ،FEBS J. ،276 (1): 58–75.

Almundarij, T. I.; Zaki, A. K. A.; Albarrak, S. M.; Alharbi, Y. M.; Almuzaini, S. A., and Abo-Aziza, F. A. (2020). Evaluation of the Anti-diabetic Activities of Colored Rice Varieties in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Systematic Reviews in Pharmacy, 11(11), 1424-1433.

Al-Omar, M. A.; Beedham,C and Alsarra, I. A. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. Saudi Pharmacentical ,12: 1-18.

Alphonse, P.A.S.; Ramprasath, V. and Jones, P.J.H. (2017). Effect of dietary cholesterol and plant sterol consumption on plasma lipid responsiveness and cholesterol trafficking in healthy individuals, British Journal of Nutrition, 117(1): 56-66.

Alsamarrai, A.H.J; Khaleel Z.I and Mustafa M.A. (2020). Study of some enzymatic and histopathological variants of the effect of sodium benzoate on rabbit. European Journal of Molecular & Clinical Medicine,07(09):624-635.

Alsaraf, K. M.; Abd, S. T., and Husain, N. S. (2016). An antimicrobial activity of *Moringa oleifera* extract in comparison to chlorhexidine gluconate (in vitro study). Journal of baghdad college of dentistry, 28(1): 183-187.

AL-Shinnawy, M., (2009). Physiological effect of a food additive on some haematological and biochemical parameters of male albino rats. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology, 2 (1), 143–151.

Altaee, R.A. and Fadheel, Q.J. (2021). The nephroprotective effects of *moringa oleifera* extract against contrast induced nephrotoxicity. J. Pharm. Res. Int, 33, 63-70.

Amaglo, N.K; Bennett, R.N; Lo Curto, R.B; Rosa, E.A.S; Lo Turco, V and Giuffrida A, (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. Food Chem., 122(4):1047-1054.

Amin, K.A., Abdel-Hameid, H., and Abd-Elsttar, A.H., (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 48 (10),2994–2999.

Amit, S. K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S. R., and Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. Agriculture & Food Security, 6(1), 1-22.

Ammonul.Available.online:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/020645lbl.pdf
(accessed on 10 February 2022).

Arafat, N.; Awadin, W.; ElShafei, R.; El-Metwalley, V. and Saleh, R. (2018).Protective Role of *Moringa oleifera* Leaves Extract Against Gentamicin-induced Nephro- and Hepato- Toxicity in Chickens. Alex. J. Vet. Sci, 58, 173.

Arinc, E. and Yilmaz, D.,(2014). Mechanism of inhibition of CYP1A1 and glutathione S-transferase activities in fish liver by quercetin, resveratrol, naringenin, hesperidin, and rutin. Nutrition and Cancer, 2(3), 1-8.

Arranz, J., et al., (2004). Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. Journal of Leukocyte Biology, 75 (6), 1156–1165.

Asiedu-Gyekye, I.J; Frimpong-Manso, S; Awortwe, C; Antwi, D.A and Nyarko, A.K. (2014) Micro- and macroelemental composition and safety evaluation of the nutraceutical *Moringa oleifera* leaves. J Toxicol ID 786979:1–13.

Atli, G. and Grosell, M. (2016).Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (Lymnaea stagnalis) during acute copper exposure. Aquat Toxicol;176:38-44.

Atta, A.H., Soufy, H., Nasr, S.M., Soliman, A.M.,. Nassar, S.A, Al Maweri, A., Desouky H.M. and A. Abdalla .(2017). Hepatoprotective and antioxidant effects of methanol extractof *Moringa oleifera* leaves in rats Wulfenia Journal, 24, pp. 249-268

Azab E.A, Fikry A.A, Halima, M.A. and Abdul R. (2019). Nephroprotective Effect of Aqueous Extract of Parsley against Nephrotoxicity Induced by Carbon Tetrachloride in the Male Rats. Journal of Biotechnology and Bioengineering. 3(4),16-26.

Azuma, S.L.; Quartey, N.K.-A. and Ofosu, I.W. (2020). Sodium Benzoate in Non-Alcoholic Carbonated (Soft) Drinks: Exposure and Health Risks. Sci. Afr., 10, e00611.

Bahorunt, T. ; Soobrattee, M. ; Luximon, V. and Romma, O. (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. Inter J Med. 1(2): 25- 41.

Bakar, E. and Aktac, T. (2014). Effects of sodium benzoate and citric acid on serum, liver and kidney tissue total sialic acid levels: An ultrastructural study. J Appl Biol Sci., 8:9-15.

Balatsinou, L.; Di Gioacchino, G.; Sabatino, G.; Cavallucci, E.; Caruso, R.; Gabriele, E.; Ramondo, S.; Di Giampaolo, L.; Verna, N. and Di Gioacchino, M. . (2004). Asthma Worsened by Benzoate Contained in Some Antiasthmatic Drugs. Int. J. Immunopathol. Pharmacol, 17, 225–226

Barone, E., Arena, A., Head, E., Butterfield, D.A. and Perluigi, M. (2018). Disturbance of redox homeostasis in Down Syndrome: Role of iron dysmetabolism. Free Radic Biol Med, 114, 84–93.

Barros, A. I. R. N. A.; Nunes, F. M. ; Gonçalves, B. ; Bennett, R. N. and Silva, A.P. (2011). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa Mill*.). Food Chem., 128(1) : 165–172.

Bayram, B., Ozcelik, B., Grimm, S., Roeder, T., Schrader, C. and Ernst, I. M. A. (2012). A diet rich in Olive phenolics reduces oxidative stress in the heart of SAMP8 mice by induction of Nrf2-dependent gene expression. Rejuv. Res., 15:71–81.

Bayu, F; Afework, M; Geleta, B; Ergete, W. and Makonnen, E. (2020). Effect of Chronic Administration of Aqueous Leaves Extract of Moringa Stenopetala on Blood Parameters and Histology of Liver and Kidney in Rats. Ethiop J Health Sci. 3;30(2):259-268.

Beckett, G.J. and Hayes, J.D. (1993). Glutathione S-transferases: biomedical applications. Adv Clin Chem; 30: 281 – 380.

Beckett, G.J; Dyson, E.H; Chapman, B.J; Templeton, A.J and Hayes, J.D. (1985). Plasma glutathione S-transferase measurement by radioimmunoassay: a sensitive index of hepatocellular damage in man. Clin. Chim. Acta., 146: 11 – 19.

Belardelli, F., (1995). Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. APMIS: acta Pathologica, Microbiologica, Immunologica Scandinavica, 103 (3), 161–179.

Belfield, A. and Goldberg, D. M. (1971). Revised assay for serum phenyl phosphatase activity using 4-amino-antipyrine enzyme., 12: 561-573

Benekos, K., Kissoudis, C., Nianiou-Obeidat, I., Labrou, N., Madesis, P. and Kalamaki, M. (2010). Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. J. Biotechnol. 150, 195–201.

Bergmeyer, H. U., Scheibe, P. and Wahlefeld, A. W. (1978). Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clinical chemistry, 24(1), 58–73.

Bhandari, U., Khanna, K.N. and Panda, B.P. (2011). The effect of high-fat diet-induced obesity on cardiovascular toxicity in Wistar albino rats. Hum Exp Toxicol VBP., 30(9),1313-21

Bhattacharya, A., Tiwari, P., and Kumar, S. (2018). A Review of the Phytochemical and Pharmacological Characteristics of *Moringa oleifera* Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 10 (4), 181-191

Bijlani, R.L.(2004). Apllid renal physiology In:Understanding medical physiology.Third edition.Jaypee Brothers ,New Delhi.4: 522-23.

Block, C. ; Dietrich, M. ; Norkus, E. ; Morrow, J. and Poker, L.(2002). Factors associated with oxidative stress in human populations. Amer. J. Epidermal. 156(3): 274-278.

Bridges, J.W.,(1970). The fate of benzoic acid in various species. The Biochemical Journal, 118 (1), 47–51.

Bulkley, G. B. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease processes. Surgery, 94(3): 407- 411.

Buphenyl (Sodium Phenylbutyrate) Tablets BUPHENYL®(Sodium Phenylbutyrate) Powder. Available online: https://www. accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020572s016,020573s015lbl.pdf (accessed on 10 February 2022).

Campbell, J., Corrigall, A., Guy, A., and Kirch, R., (1991) . Immunohistological localisation of a, m and p class glutathione S-transferases in human tissues, Cancer 67 1608–1613.

Carins, D.(2012).Essentials of Pharmaceutical Chemistry. Pharmaceutical Press , UK.p.112

Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., and Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13(4), 377-399.

Cavanaugh, C., and Perazella, M.A. (2019). Urine sediment examination in the diagnosis and management kidney disease: Core curriculum 2019. Am J Kidney Dis., 73: 258-272.

Cegiełka, A. (2020) Clean Label as One of the Leading Trends in the Meat Industry in the World and in Poland—A Review. Rocz. Panstw. Zakl. Hig, 71, 43–55.

CFR—Code of Federal Regulations Title 21. Available online:https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=184.1733 (accessed on 14 November 2021).

Chalasani, N., Aljadhey, H., Kesterson, J., Murray, M. D. And Hall, S. D. (2004) . Patients with elevated liver enzymes are not act high risk for statin hepatotoxicity. Gastroentero.,126:1287–92.

Chatterjee, A. and Gupta, S. (2018). The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. Cancer Lett;433:33–42.

Chatterjee, S. (2016). Chapter Two—Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In Oxidative Stress and Biomaterials; Dziubla, T., Butterfield, D.A., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA; pp. 35–58.

Chaudhary, K., and Chaurasia, S. (2017). Neutraceutical properties of *Moringa oleifera*: a review. European Journal of Pharmaceutical and Medical Research, 4(4)646-655.

Chen, Y.; Ma, Y. and Ma, W. (2009).Pharmacokinetics and Bioavailability of Cinnamic Acid after Oral Administration of Ramulus Cinnamomi in Rats. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet, 34, 51–56.

Christie, W.W. and Han, X. (2012). Lipids: their structures and occurrence. Chapter 1. In: Lipid Analysis, Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis. 4th ed. A volume in Oily Press Lipid Library Series, pp: 3-9.

Cotran, R. S.; Kumar, V. and Collins, T. (1999). Robbins Pathology Basis of Disease. 6th ed., W. B. Saunders Co., pp: 1 – 30.

Coz-Bolanos, X., Campos_vega, R., Reynoso- Camacho, R., Ramos-Gomez, M., Loarca-PinaA, G.F., and Guzman –Maldonado, S.H. (2018). Moringa infusion (Moringa oleifera) rich in phenolic compounds and high antioxidant capacity attenuate nitric oxide pro-inflammatory mediator in vitro. Ind Crop Prod 118: 95-101.

Craft, B. D. ; Kerrihard, A. L. ; Amarowicz, R. and Pegg, R. B.(2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. Comprehen. Rev. Food Sci. Food Saf. 11(2): 148–173.

Crawford, J.M. (2007). Hati dan Saluran Empedu. In: Robbins S. L., Vinay K., Ramzy S. C.. Robbins Buku Ajar Patologi. Volume 2. Edisi 7. Alih Bahasa: Pendit B. U. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

Cuellar-Nuñez , M. L., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gallegos-Corona, M.A., De Mejía, E. G., and Loarca-Piña, G. (2018). Physicochemical and nutraceutical properties of *moringa (Moringa oleifera*) leaves and their effects in an in vivo AOM/DSS- induced colorectal carcinogenesis model. Food Research International, 105: 159-168.

Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 110, 5812–5817.

Daenen, K.; Andries, A.; Mekahli, D.; Van Schepdael, A.; Jouret, F. and Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. Pediatr. Nephrol, 34, 975–991.

Danielson, P (2002) ،"The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans" ،Curr Drug Metab ،3 (6): 561–97.

David, O.M.; Ogunmoroti, O.; Ajayi, O.O.; Eleyode, V.; Ogunniran, A.; Adegbuyi, T.A. and Famurewa, O. (2017). A Review of biological and therapeutic activities of *Moringa Oleifera*. J. of Modern Drug Discovery and Drug Delivery Research, 4(3): 1-13.

Davidson, P.M.; Sofos, J. N. and Branen, A. I. (2005). Antimicrobials in Food. 3rd ed., Taylor and Francis group, USA.p.12

Davidson, P.M.; Taylor, T.M. and David, J.R.D.(2021). Antimicrobials in Food, 4th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA ; ISBN 978-0-367- 17878-9.

DelRio, D. ; Stewart, A. J. and Pellegrine, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr. Metab. Cardiovasc Dis., 15(4): 316 – 328

Deponte M. (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochim. Biophys. Acta.1830:3217–3266.

Dewangan, D. (2009). Studies on toxico pathology of Sodium benzoate in rats. M. V. Sc. Thesis, Indira Gandhi Agricultural University.

Dibnath, D. and Mandal, T.K. (2000). Study of Quinalphos (An Environmental estrogenic insecticide) formulation induced change of testicular tissue and

antioxidant defense system in Sprague-Dewley Albino rats. J. of Applied. Toxicol.; 20:197- 204.

Dilawar, S.; Shah, A.; Hussain, S.; Sajjad, M. & Khan, S. (2017). Healing effect of *Moringa oleifera* lam against UV-B Induced Psoriasis form changes in Rats. Biochemistry and Pharmacology, 6(1): 1-6.

Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M. and Rodriguez, H.(2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic. Biol. Med., 32(11): 1102–1115.

Dodson, M., Castro-Portuguez, R., and Zhang, D.D. (2019). NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. Redox Biol., 23, 101107.

Dollah, S., Abdulkarim, S.M., Ahmad, S.H., Khoramnia, A. and Mohd Ghazali, H., (2016). Physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil enzymatically interesterified with palm stearin and palm kernel oil and its potential application in food J. Sci. Food Agric., 96 (10), 3321-3333

Dong, W.,(1998). Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. Toxicology and Applied Pharmacology, 151 (2), 359–366.

Eaton, D.L and Bammler, T.K. (1999) ،"Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology", Toxicol. Sci., 49 (2): 156–64.

Egar, E., Koblin, D., Bowland, T., Ionescu, P., Laster, M., Fang, Z., Gong, D., Sonner, J. and Weiskopf R., (1997) . Nephrotoxicity of sevoflurane veruses desflurane anesthesia in volunteers, Anesth. Analg., 84 160–168.

El Sohaimy, S.A., Hamad, G.M., Mohamed, S.E., Amar, M.H. and Al-Hindi, R.R. (2015). Biochemical and functional properties of Moringa oleifera leaves and their potential as a functional food. Global Adv Res J Agric Sci 4(4): 188-199.

El-bakry, K., El-shahat., T, Serag, M and Aboser, M. (2016). Hepatoprotective Effect of *Moringa oleifera* Leaves Extract Against CarbonTetrachloride- Induced Liver Damage In Rats. World Journal Of Pharmacy And Pharma ceutical Sciences, 5 (5), 76-89

El-Desouki, N. I., Basyony, M. A., Hegazi, M. M., and El-Aama, M. S. (2015). *Moringa oleifera* leaf extract ameliorates glucose, insulin and pancreatic beta cells disorder in alloxan-induced diabetic rats. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences, 6(3):642-653.

El-Hadary, A.E. and Ramadan, M.F. (2019). Antioxidant traits and protective impact of *Moringa oleifera* leaf extract against diclofenac sodium-induced liver toxicity in rats. J Food Biochem. 43(2):e12704

Elsa, N. and Miljøstyrelsen, D.(2000). Toxicological Evaluation and Limit Values for Nonylphenol, Nonylphenol Ethoxylates, Tricresyl Phosphates, and Benzoic Acid . Danish Environmental Protection Agency EPA,Copenhagen, Denmark.

El-shamy, K. I.; Khadr, M. E.; Morsy, F. A. and Hassanin, M. M. (1999): Toxic effect of some food additives on vital activities of albino rats: green colour (tartrazine and brilliant blue).

El-Shennawy, L.; Kamel, M.A.E.; Khalaf, A.H.Y.; Yousef, M.I. (2020).Dose-Dependent Reproductive Toxicity of Sodium Benzoate in Male Rats: Inflammation, Oxidative Stress and Apoptosis. Reprod. Toxicol., 98, 92–98.

El-Sohaimy, S. A.; Hamad, G.M.; Mohamed, S.E.; Amar, M. H. and Al-Hind, R.R. (2015). Biochemical and functional properties of Moringa oleifera leaves and their potential as a functional food. Global Advanced Research Journal of Agricultural Science, 4(4):188-199.

Elwi, M. A.; Saleh, A. S.; and Kamel, A. I. (1973): Textbook of pathology. 6th edn., Necrosis, El-NASER MODERN BOOKSHOP, Cairo, Egypt. Chem. (4) PP. 31-46.

Erfan, H., Yousef, S. M., El-Sayed, K. A. R. I. M. A., & Mohamed, A. Z. (2021). Assessment of the Effect of Concomitant Use of Sodium Benzoate and Fructose on the Liver Structure and Function in Young Albino Rats. The Medical Journal of Cairo University, 89(6), 761-767.

Estrela, J.M., Ortega, A. and Obrador E. (2006). Glutathione in cancer biology and therapy. Crit. Rev. Clin. Lab Sci., 43:143–181.

Etchu, A. K.; Ghomsi, M.O.S. and Enow, J.T.; (2017). Effect of Moringa Oleifera Leaf Meal (Molm) on the Growth, Carcass,Heamatology and Biochemical Parameters of Rabbits. SOJ Vet Sci 3(3):1-5.

Falzone, L.; Marconi, A.; Loreto, C.; Franco, S.; Spandidos, D.A.; Libra, M (2016) . Occupational exposure to carcinogens: Benzene, pesticides and fibers (review). Mol. Med. Rep.,14, 4467– 4474.

Farid, A.S. and Hegazy, A.M. (2019). Ameliorative effects of *Moringa oleifera* leaf extract on levofloxacin-induced hepatic toxicity in rats. Drug Chem. Toxicol., 43(6): 616-622.

Feillet, F. and Leonard, J.V. (1998) . Alternative pathway therapy for urea cycle disorders. Journal of Inherited Metabolic Disease, 21 (1), 101–111.

Femi F.O. (2019). Spectroscopic Investigation of the Mixture of Ascorbic Acid and Sodium Benzoate. Science Journal of Chemistry. 7(3): 62-66.

Fernandes, Â. E.T. AL. (2021). Nutritional and phytochemical profiles and biological activities of *Moringa oleifera* Lam. edible parts from Guinea-Bissau (West Africa). Food Chem., 341 -350 .

Fink, R. C., and Scandalios, J. G. (2002). Molecular evolution and structure–function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. Arch. Biochem. Biophys., 399, 19–36.

Finkel T., (2011).Signal transduction by reactive oxygen species J. Cell Biol., 194 (1), pp.7-15

Flendrig, L.M., Chamuleau, R.A., Maas, M.A., Daalhuisen, J., Hasset, B., Kilty, C.G. and Doyle, S. (1999). Evaluation of a novel bioartificial liver in rats with complete liver ischemia: treatment efficacy and species-specific alpha-GST detection to monitor hepatocyte viability. J Hepatol., 30(2):311–320.

Flora, S. J. S. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and mettaloid exposure. Oxid. Med. Cell. Longev., 2(4): 191–206.

Fombang, E.N. & Saa, R. W. (2016). Antihyperglycemic activity of *Moringa oleifera* Lam. leaf functional tea in Rat models and Human subjects. Food and Nutrition Sciences, 7: 1021-1032.

Fujitani T. (1993). Short-term effect of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F1 mice. Toxicol Lett., 69:171-9.

Gabriele, P., Natasha, I., Mariapaola, C., Giovanni, P., Federica, M., Vincenzo, A., Francesco, S., Domenica, **A.** and Alessandra, B. (2017) Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health.Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Gate, L. and Tew, K.D. (2001) .Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. Expert. Opin. Ther. Targets.,5:477–489.

Gebregiorgis, F.; Negesse, T. and Nurfeta, A.; (2012). Feed intake and utilization in sheep fed graded levels of dried Moringa (Moringa stenopetala) leaf as a supplement to Rhodes grass hay. Trop. Anim. Health Prod., 44, 511–517.

Ghouri, N.; Preiss, D. and Sattar, N. (2010). Liver enzymes, nonalcoholic fatty liver disease, and incident cardiovascular disease: a narrative review and clinical perspective of prospective data. Hepatology,52(3): 1156–1161.

Giffen, P.S., Pick, C.R., Price, M.A., Williams, A. and York, MJ. (2002). Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. Toxicol Pathol;30:365–72.

Godman, M. ; Bostick, R. M. ; Kucuk, O. and Jones, D.P.(2011). Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present and future. Free Radic. Biol. Med. J, 51(5): 1068–1084.

Gonzalo-Orden, M., Millán, L., Alvarez, M., Sánchez-Campos, S., Jiménez, R.,González-Gallego, J. and Tuñón, M. J. (2003). Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magnetic resonance findings. Parasitol. Res, 90: 359–364.

Gopalakrishnan, L.; Doriya, K. and Kumar, D.S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. Food Science and Human Wellness, 5: 49–56.

Gregus, Z.; Fekete, T.; Halaszi, E. ; Gyurasics, G. and Klaassen, D.(1998). Effects of fibrates on the glycine conjugation of benzoic acid in rats. Drug Metab. Dispos. 26(11): 1082-1088.

Grignon, D., Abdel-Malak, M., Mertens, W., Sakr, W. and Shepherd, R. (1994). Glutathione S-transferase expression in renal cell carcinoma: a new marker of differentiation, Modern Pathol. 7 ,186–189.

Guneidy, R.A., Meguid, N.A., Abdel-Ghany, S.S., Saleh, N.S.M., Zaki, E.R. and Hamed, R.R. (2017). Inter-individual variation of normal and Down syndrome glutathione transferase in response to different phenolic compounds, Res. J. Pharm.Biol. Chem. Sci., 8(4), 184-201.

Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2018). utritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam. Review of current status and future possibilities. Journal of Herbal Medicine, 11:1-11.

Guyton, A. C. and Hall, J. F. (2011). Textbook of Medical Physiology.12th ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia. pp. 355– 839.

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of biological Chemistry. 11, 25;249(22):7130-7139.

Hadwan, M.H. and kadhum, A.S. (2018). New spectrophotometric assay for assessments of catalase activity in biological samples. Analytical biochemistry. 2, 1;542:29-33.

Haidara, M.A., Yassin, H.Z., Rateb, M., Ammar, H. and Zorkani, M.A. (2006). Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. Curr Vasc Pharmacol; 4(3): 215-227.

Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1 (5), 358–364.

Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: less paradoxical now. British Journal of Clinical Pharmacology, 75 (3), 637–644.

Halliwell, B.(2007). Biochemistry of oxidative stress. Biochem. Soc. Trans., 35(5): 1147–1150.

Hamed, R.R., Ali, O.S., Guneidy, R.A. and Zaki, E.R. (2014), Inhibition of glutathione S-transferases by some Malvaceae flowers, Int. J. Curr. Adv. Res., 2(12), 174-187.

Hassan, M.M., Abdelgadir, M.I.A. (Elrrigieg), Sabahelkhier, M.K. and Idris, O.F . (2016). Impacts of the food additive benzoic acid on liver function of Wistar rats. Int. J. Adv. Res., 4(8): 568-575.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U. and Jowsey, I.R. (2005) ،"Glutathione transferases" ، Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 45: 51–88.

Hazar, Y., Nayira, A., Abdel, B., Attia, H.A., and Faddah L.M. (2008). Hepatoprotective effect of N-acetyl cysteine and/or β-carotene on monosodium glutamate-induced toxicity in rats. Research Journal of Medicine and Medical Sciences.,3(2):206–215

Heidari, R., Jamshidzadeh, A., Niknahad, H., Mardani, E., Ommati, M.M. and Azarpira, N. (2016). Effect of taurine on chronic and acute liver injury: Focus on blood and brain ammonia. Toxicol Rep., 3:870-9.

Helal, E.G.E., Barayan, A.W., Abdelaziz, M.A. and EL-Shenawe N.S.A. (2019). Adverse effects of mono sodium glutamate, sodium benzoate and chlorophyllins on some physiological parameters in male albino rats. The Egyptian Journal of Hospital Medicine.,74(8) 1857-1864.

Helaly, G.F. and Mahmoud, M.M. (2003). Diagnostic value of alpha-glutathione S-transferase as a sensitive marker of increased risk for hepatocellular damage in hepatitis C virus (HCV) infection: relation to HCV viraemia. J Egypt Public Health Assoc.,78(3-4):209–223.

Hennigan, S.L., Driskell, J.D., Ferguson-Noel, N., Dluhy, R.A., Zhao, Y. and Tripp, R.A. (2012). Detection and differentiation of avian mycoplasmas by surface-enhanced Raman spectroscopy based on a silver nanorod array. Appl. Environ. Microbiol.,78:1930-1935.

Heshmati, A.; Ghadimi, S.; Mousavi Khaneghah, A.; Barba, F.J.; Lorenzo, J.M.; Nazemi, F. and Fakhri, Y. (2018). Risk Assessment of Benzene in Food Samples of Iran's Market. Food Chem. Toxicol., 114, 278–284.

Hisam, E.E.A, ET., AT. (2018). Combined extract of *Moringa oleifera* and *Centella asiatica* modulates oxidative stress and senescence in hydrogen peroxide-induced human dermal fibroblasts. Turk. J .Biol., 42(1):33-44.

Holifa, A., Latif, A. Z. A., Simbak, N. B., and Atif, A. B. (2017). Alpha-Tocopherol administration in Diabetics as preventive and therapeutic agents in

oxidative stress. Current Trends in Biomedical Engineering and Biosciences, 5(5), 1-2.

Hollman, P. C., Bijsman, M. N., van Gameren, Y., Cnossen, E. P., deVries, J. H. and Katan, M. B. (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Radic. Res., 31: 569–573

Holm, G.; Norrgren, L.; Andresson, T. and Thuren, A.(1993): Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, Gasterosteus aculeatus. Aquat. Toxicol., 27:33-50.

Huang, G. J. ; Deng, J. S. ; Huang, S. S. ; Shao, Y. Y. ; Chen, C. C. and Kuo, Y. H. (2012). Protective effect of antrosterol from Antrodia camphorata submerged whole broth against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Food Chemistry, 132(2): 709–716.

Huang, W., Cai, Y. and Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention, Nutrition and Cancer, 62(1), 1-20.

Hutt, A. J. and Caldwell, J.(1990). Amino Acid Conjugation. In:Mulder, G. J. (ed.), Conjugation Reactions in Drug Metabolism: An Integral Approach. Taylor & Francis Ltd, London.p.273.

Hwang, I.; Uddin, M.J.; Lee, G.; Jiang, S.; Pak, E.S. and Ha, H. (2019). Peroxiredoxin 3 deficiency accelerates chronic kidney injury in mice through interactions between macrophages and tubular epithelial cells. Free Radic. Biol. Med., 131, 162–172.

Ibekwe, E.S.; Uwakwe, A.A. and Monanu, O.M. (2007). In Vivo Effects of Sodium Benzoate on Plasma Aspartate Amino Transferase and Alkaline Phosphatase of Wistar Albino Rats. Sci. Res. Essays, 2, 10–12.

Ibrahim, N.M. (2012). Effect of lead acetate toxicity on experimental male albino rat. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2 (1), 41–46.

Igarashi, T., Kohara, A., Shikata, Y., Sagami, F., Sonoda, J., Horie, T. and Satoh T. (1991) . The unique feature of dog liver cytosolic glutathione S-transferases. An enzyme not retained on the affinity column has the highest activty towards 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, J. Biol. Chem., 266 (32) 21709-21717.

Jamshidzadeh, A,, Heidari, R., Abasvali, M., Zarei, M., Ommati, M.M. and Abdoli N. (2017). Taurine treatment preserves brain and liver mitochondrial function in a rat model of fulminant hepatic failure and hyperammonemia. Biomed Pharmacother;86:514-20.

Jauhari, N; Prasad, G.M.; Sharma, N. and Bharadvaja, N. (2017). Anticancer property of green material through computational approach. Advanced Materials Proceedings, 2(6), 378-383

JECFA(The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). (1996). Toxicological evaluation of certain food additives. Forty-sixth meeting of the joint (FAO/WHO) committee on food additives.pp. 31-79.

Jiang, H. W., Liu, M. J., Chen, I. C., Huang, C. H., Chao, L. Y., and Hsieh, H. L. (2010). A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of Arabidopsis seedling development. Plant Physiol., 154, 1646–1658.

Johnson, W., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.h.J., Snyder, P.W. and Andersen, F.A. (2017). Safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid and its salts, and benzyl benzoate. Internat. J of Toxicol., 36(Supplement 3) 5-30.

Johnson, W., Wilson-Delfosse, A. L. and Mieyal, J. J. (2012). Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. Nutrients, 4, 1399–1440 ..

Josephy, P.D. (2010) ‹"Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology" ‹Hum Genomics Proteomics ‹2010: 876940

Kaboğlu, A. and Aktaç, T.A. (2002). Study of the effects of the sodium benzoate on the mouse liver. Biol. Brat., 57(3): 373-80.

Kakkar, P. ; Musavi, S. and Mehrotra, S. (2000). Mitochondrial Responses under Chemical Stress. Polish Journal of Environmental Studies, 9(4): 285-290.

Kale, M. K. (2015).Thyroid Gland in Free Radical-induced Oxidative Stress. In: Rani, V. and Yadav, U. C. S.(eds.), Free Radicals in Human Health and Disease. Springer, India. pp.159-167.

Karthika, S., Ravishankar, M., Mariajancyrani, J., and Chandramohan, G. (2013). Study on phytoconstituents from *Moringa oleifera* leaves. Asian journal of plant science and research,3(4), 63-69.

Kehinde, O.S., Christianah, O.I. and Oyetunji., O.A. (2018).Ascorbic Acid and Sodium Benzoate Synergistically Aggravates Testicular Dysfunction in Adult Wistar Rats. Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol., 10, 39–46.

Kelly, F. (2003). Oxidative stress: Its role in air pollution and adverse health effects. Occup. Environ. Med.,60:612-6.

Kennedy, L., Sandhu, J.K., Harper, M.E. and Cuperlovic-Culf, M. (2020). Role of glutathione in cancer: from mechanisms to therapies. Biomolecules,10(10):1429.

Khalafalla, M. M., Abdellatef, E., Dafalla, H. M., Nassrallah, A. A., Aboul-Enein, K. M., Lightfoot, D. A., and El-Shemy, H. A. (2010). Active principle from *Moringa oleifera* Lam leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. African Journal of Biotechnology, 9(49): 8467-8471.

Khalil, S.R., Abdel-Motal, S.M., Abd-Elsalam, M., Abd El-Hameed, N.E. and Awad A., (2020). Restoring strategy of ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves against Tilmicosin-induced cardiac injury in rats: targeting cell apoptosis-mediated pathways Gene, 730, p. 144272

Khalil, S.R., El Bohi, K.M., Khater, S., Abd El-fattah, A.H., Mahmoud, F.A. and Farag, M.R., (2020). *Moringa oleifera* leaves ethanolic extract influences DNA damage signaling pathways to protect liver tissue from cobalt-triggered apoptosis in rats Ecotoxicol. Environ. Saf., 200 , Article 110716

Khan, I.S.; Dar, K.B.; Ganie, S.A. and Ali, M.N. (2020). Toxicological Impact of Sodium Benzoate on Inflammatory Cytokines, Oxidative Stress and Biochemical Markers in Male Wistar Rats. Drug Chem. Toxicol, 1–10.

Khansari, N.; Shakiba, Y. and Mahmoudi, M. (2009).Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age-Related Diseases and Cancer. Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov., 3, 73–80.

Khidr, B.M., Makhlouf, M.M.M., and Ahmed, S.M.M., (2012). Histological and ultrastructural study on the effect of sodium benzoate on the liver of adult male albino rats. Assiut Univ. J. Zoo., 41(1): 11-39.

Khodaei, F., Kholghipour, H., Hosseinzadeh, M., and Rashedinia, M. (2019). Effect of sodium benzoate on liver and kidney lipid peroxidation and antioxidant enzymes in mice. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, 8(2), 217.

Khoshnoud, M.J., Siavashpour, A., Bakhshizadeh, M. and Rashedinia, M. (2018). Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice. J. Biochem. Mol., Toxicol .,32:e22022.

Khudaer, N. B., Hassn, Z. Y. M., AL-Sammarrae, K. W., and Ibrahim, N. K. (2016). Purification and Identification of Total Flavonoids Extracted from *Moringa oleifera* Leaves in Iraq. J. Biotech. Res Cen., 10(2), 73-80.

Kind, P. R. N. and King, E. J. (1954). Estimation of plasma Phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-anti-antipyrine, J. Clin. Path., 7: 322-326

Kirkpatrick, L. A. (2015). A Simple Guide to IBM SPSS Statistics-Version 23.0. Cengage Learning.

Knapen, M.F., Peters, W.H., Mulder, T.P. and Steegers, E.A. (2000). A marker for hepatocellular damage. Lancet., 355: 1463 – 1464.

Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G.,Langer, T., Darroudi, F. and Natarajan, A. T. (1998). Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mut. Res., 402: 185–202

Kou, X., Li, B., Olayanju, J. B., Drake, J. M., and Chen, N. (2018). Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. Nutrients, 10(3): 343-355.

Kregiel, D. (2015). Health safety of soft drinks: Contents, containers, and microorganisms. BioMed Res Int:128697

Kubota, K. and Ishizaki, T. (1991). Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans. Eur. J. Clin. Pharmacol, 41(4): 363-368.

Kubota, K. ; Horai, Y. ; Kushida, K. and Ishizaki, T. (1988). Determination of benzoic acid and hippuric acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. J. Chromatog.B.Biomed.Appl., 425(2): 67-75.

Kumar, S. and Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. The Scientific World Journal, 2013:1-16.

Kural, C., Kocdogan, A.K., Şimşek, G.G., Oguztuzun, S., Kaygın, P., Yılmaz, I., Bayram, T. and Izci Y. (2018). Glutathione S-transferases and cytochrome P450 enzyme expression in patients with intracranial tumors: Preliminary report of 55 patients. Med. Princ. Pr;28:56‑62.

Lambole, V. and Kumar, U. (2012). Effect of *Moringa oleifera* Lam. on normal and dexamethasone suppressed wound healing. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 2(Suppl 1): 219-223.

Lawrence, T. (2001). Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. Nature Medicine, 7 (12), 1291–1297.

Lennerz, B.S., Vafai, S.B., Delaney, N.F., Clish, C.B., Deik, A.A. and Pierce, K.A. (2015). Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on

glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. Mol .Genet. Metab.,114:73-9.

Li, S. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. International Journal of Molecular Sciences, 16 (11), 26087–26124.

Li, Y.S., Hung, S.C., Wei, Y.H. and Tarng, D.C. (2009). GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. J. Am. Soc. Nephrol., 20:405–415.

Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F. and Bonaduce, D. (2018). Oxidative Stress, Aging, and Diseases. Clin. Interv. Aging, 13, 757–772.

Lin, M., Zhang, J., and Chen, X. (2018). Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. Journal of functional foods, 47, 469-479

Ling, X.C. and Kuo, K.-L. (2018). Oxidative stress in chronic kidney disease. Renal. Replace. Ther.4, 53.

Linke, B. G., Casagrande, T. A., and Cardoso, L. I. A. (2018). Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. African Journal of Biotechnology, 17(10), 306-310.

Litwack, G., Ketterer, B., and Arias, I.M. (1971). Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. Nature, 234 (5330), 466–467.

Lobo, V. ; Phatak, A. and Chandra, N. (2010). Free radicals and functional foods: impact on human health. Pharmacogn. Rev., 4, 118–126.

Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M., and Frohnmeyer, H. (2000). Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. Plant Cell, 12, 1939–1950.

Lu, J. ; Lin, P.H. ; Yao, Q. and Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. J. Cell Mod. Med.14(1): 840–860.

Lucchesi, A.N., de Freitas, N.T., Cassettar, L.L., Marques, S.F.G. and Spadella, C.T. (2013). Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats:a mechanism for diabetic chronic liver disease. Acta Cirúrgica Brasileira, 28 (7), 502-508.

Lugrin, N., Rosenblatt-Velin, R. and Parapanov Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes Biol. Chem., 395 ,pp. 203-230

Luque, Y., Louis, K., Jouanneau, C., Placier, S., Esteve, E., Bazin, D., Rondeau, E., Letavernier, E., Wolfromm, A., Gosset, C., Boueilh, A., Burbach, M., Frere, P., Verpont, M.C., Vandermeersch, S., Langui, D., Daudon, M., Frochot, V. and Mesnard, L. (2017). Vancomycin-associated cast nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology.28:1723–1728.

Ma, J.-Q. (2014). Ursolic acid protects mouse liver against CCl4- induced oxidative stress and inflammation by the MAPK/NF-jB pathway. Environmental Toxicology and Pharmacology, 37 (3), 975–983.

Mabry, T. J., Thomas, M. B., Markham, K. R. (1970). The systematic dentification of flavonoids, Springer-Verlag. Berlin, 13.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M. and Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem ., 100(4): 1409-1418.

Mallya, R., Chatterjee, P.K., Vinodini, N.A., Chatterjee, P. and Mithra, P. (2017). *Moringa oleifera* Leaf Extract: Beneficial Effects on Cadmium Induced Toxicities-A Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 11(4), 1-4

Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47: 469-474.

Martins, P. F., de Melo, M. M. R., and Silva, C. M. (2016). Techno- economic optimization of the subcritical fluid extraction of oil from *Moringa oleifera*, seeds and subsequent production of a purified sterols fraction. Journal of Supercritical Fluids, 107, 682–689.

Matkovics, A. (2003). An over view of free radical research. Acta. Bio.J., 47(1): 93-97.

Mazin, Sh.; Alwan, N.A. and Al-Masoudi, E.A. (2018). A study of toxic effect of sodium benzoate, Vit.C alone and their combination on reproductive functions of adult male rabbits. Basrah J. of Veteri. Res., 17(3): 533-543.

Mazur, W., Gonciarz, M., Kajdy, M., Mazurek, U., Jurzak, M., Wilczok, T. and Gonciarz, Z. (2003). Blood serum glutathione alpha s-transferase (alpha GST) activity during antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. Med. Sci. Monit.,(Suppl 3):44–48.

Mcllwain, C.C., Townsend, D.M. and Tew, K.D. (2006). Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incindence and therapy, Oncogene, 25(11), 1639-1648.

McPherson, R.A. and Pincus, M.R. (2017). Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 23rd ed. St. Louis, MO; Elsvier. pp. 464.

Mehrotra, S. ; Kakkar, P. and Viswanathan, P. N. (1991). Mitochondrial damage by active oxygen species in vitro. Free Radic. Biol. Med., 10(5): 277.

Ministry of Health, (2007), Pharmaceutical Care for Liver Disease, Jakarta: Indonesian Ministry of Health

Mister, S., and Hathcock, J. (2012). Under the law, FDA must grant different standards for new dietary ingredients and food additives. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 62(3), 456-458.

Mittler R. (2017). ROS are good. Trends Plant Sci., 22:11-9.

Mochizuki, M. ; Yamazaki, S. ; Kano, K. and Ikeda, T. (2002). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catehins. Biochim. Biophys. Acta., 1569(1-3): 35-44.

Modi, K.K.; Rangasamy, S.B.; Dasarathi, S.; Roy, A. and Pahan, K. (2016). Cinnamon Converts Poor Learning Mice to Good Learners: Implications for Memory Improvement. J. Neuroimmune Pharmacol. 11, 693–707.

Mohamed, M., Metwally, S., Khalil, G. A., and Salem, H. A. (2019). *Moringa oleifera* extract attenuates the CoCl2 induced hypoxia of rat's brain: expression pattern of HIF-1α, NF-κB, MAO and EPO Biomed. Pharmacother., 109, pp. 1688-1697,

Mohamed, N.B., Mohamed, A.H., Abu-Aita, N.A., Nasr, S.M., Nassar, S.A. and Ahmed K.A. (2020). Prophylactic role of *Moringa oleifera* leaves' extract against lead toxicity in rabbits. Adv. Anim. Vet. Sci. 8(11): 1129-1141.

Mohammed, M. and S. (2018). Nephroprotective Effect of Zingerone against CCl4-Induced Renal Toxicity in Swiss Albino Mice: Molecular Mechanism. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2018, Article ID 2474831, 7 pages.

Monera, T. G., and Maponga, C. C. (2012). Prevalence and patterns of Moringa oleifera use among HIV positive patients in Zimbabwe: a cross-sectional survey. Journal of public Health in Africa, 3(1):6-8.

Moon, Y. J., Wang, X. and Morris, M. E. (2006). Dietary flavonoids: effect on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol In Vitro, 20:187–210.

Morel F, Aninat C. (2011). The glutathione transferase kappa family. Drug. Metab. Rev., 43:281–291.

Moser R. , Oberley T. , Daggett D., Friedman A., Johnson J. and Siegel F. (1995). Effects of lead administration on deveolping rat kidney. I. Glutathione S-transferase enzymes, Toxicol. Appl. Pharm., 131 ,85–93.

Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., and Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. African Journal of Biotechnology, 10(60), 12925-12933.

Muhammad, H. I., Asmawi, M. Z., & Khan, N. A. K. (2016). A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. in tropical and sub-tropical regions. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(10):896- 902.

Mutiara, T., Titi, E. S., and Estiasih, W. (2013). Effect lactagogue moringa leaves (*Moringa oleifera* Lam) powder in rats. Journal of basic and applied scientific Research, 3(4), 430-434.

Nair, B. (2001). Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. International Journal of Toxicology, 20, 23-50.

Nalamwar, R.R., Raut, S.D., Khan, N.D.; Khan, Z.H. and Mular, S.M. (2017). Nutritional assessment of *Moringa oleifera* leaves. International Journal of Applied Research, 3(3): 411-413.

National kidney Foundation.(2002). K /DOQI Clinical practice Guidelines for chronic kidney Disease :Evalution ; Classification ,and Stratification.American Journal of kidney Diseases,39(2) 1 :1-266.

Niemann, B., Rohrbach, S., Miller, M.R., Newby, D.E., Fuster, V. and Kovacic, J.C. (2017). Oxidative stress and cardiovascular risk: obesity, diabetes, smoking, and pollution: Part 3 of a 3-Part Series. J. Am. Coll. Cardiol., 70, 230–251.

Niu, B., Liao, K., Zhou, Y., Wen, T., Quan, G., Pan, X. and Wu, C. (2021). Application of glutathione depletion in cancer therapy: enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. Biomaterials.277: 121110

Noorafshan, A., Erfanizadeh, M., and Karbalay-Doust, S. (2014). Stereological studies of the effects of sodium benzoate or ascorbic acid on rats' cerebellum. Saudi medical journal, 35(12), 1494.

Nyman, P.J., Wamer, W.G., Begley, T.H., Diachenko, G.W. and Perfetti, G.A. (2010). Evaluation of Accelerated UV and Thermal Testing for Benzene Formation in Beverages Containing Benzoate and Ascorbic Acid. J. Food Sci. 75, C263–C267.

Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. Drug. Metab. Rev. 43:138–151.

Oberley, T., Friedman, A., Moser, R. and Siegel, F. (1995). Effects of lead administration on deveolping rat kidney. II. Functional, morphologic and immunohistochemical studies, Toxicol. Appl. Pharm. 131 ,94–107.

Oe, O. (2004). The hepatotoxic effect of halofantrine in guinea pigs. Indian J. Pharmacol.,12.,1;36(5):30**Ojo** O.O.; Kabuta F.R.; Bello M. and Babayo V. (2006). Inhibition of paracetamol-induced oxidative stress in rats of extracts of lemongrass (Cymbrogeon citratesl and free tea (Camellia sincnsis) in rats. Afr. J. of Biotech. 5:1227-1232.

Oladeji, O.A.; Taiwo, K.A.; Gbadamosi, S.O.; Oladeji, B.S. and Ishola, M.M. (2017). Studies on Chemical Constituents and Nutrients Bioavailability in Moringa oleifera Leaf and Seed. Journal of Scientific Research and Reports, 14(1): 1-12.

Oladele, J.O., Oladele, O.T., Ademiluyi, A.O. (2020) . Chaya (Jatropha tanjorensis) leafs protect against sodium benzoate mediated renal dysfunction and hepatic damage in rats. Clin Phytosci 6, 13 .

Oliveira, M.A.L.; Porto, B.L.S.; Faria, I.D.L.; Oliveira, P.L.; Barra, P.M.C.; Castro, R.J.C. and Sato, R.T. (2014). 20 Years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis. Molecules, 19: 14094-14113.

Olofinnade, A.T.; Onaolapo, A.Y.; Onaolapo, O.J. and Olowe, O.A. (2021). The Potential Toxicity of Food-Added Sodium Benzoate in Mice Is Concentration-Dependent. Toxicol. Res. 10, 561–569.

Omodanisi, E.I., Aboua, Y.G., Chegou, N.N. and Oguntibeju, O.O. (2017). Hepatoprotective, Antihyperlipidemic, and Anti-inflammatory Activity of Moringa oleifera in Diabetic-induced Damage in Male Wistar Rats . Pharmacognosy Res., 9 (2), 182-187.

Otomoso, R., Abiodun, A.A., Ijomone, O.M. and Adewole, S.O. (2015). Lead-Induced Damage on Hepatocytes and Hepatic Reticular Fibres in Rats; Protective Role of Aqueous Extract of Moringa

Oyewole, O.I. And Oladele, J.O., (2017) . Changes in activities of tissues enzymes in rats administered Ficus exasperata leaf extract. Int J Biol Chem Sci.,11:378-86

Oyewole, O.I.; Dere, F.A. and Okoro, O.E. (2012). Sodium Benzoate Mediated Hepatorenal Toxicity in Wistar Rat: Modulatory Effects of Azadirachta Indica (Neem) Leaf. Eur. J. Med. Plants. 2, 11–18.

Oyeyinka, A. T. and Oyeyinka, S. A. (2018). Moringa oleifera as a food fortificant: Recent trends and prospects. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 17(2), 127-136.

Ozbek, E. (2012). Induction of oxidative stress in kidney. Int. J .Nephrol:465897.

Padayachee, B. and Baijnath, H. (2020). An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. S Afr J Bot 129: 304-316.

Padmavathy, J. and Devarajan, S. (2017). Natural product as a source of prodrug. Bangladesh Journal of Pharmacology, (2),p: 5-12.

Pakade, V., Cukrowska, E., and Chimuka, L. (2013). Comparison of antioxidant activity of Moringa oleifera and selected vegetables in South Africa. South African journal of science, 109(3-4), 01-05.

Parthasarathy, V.A., Chempakam, B. and Zachariah, T.J., (2008). Chemistry of Spices. 71.

Paunel-Gorgulu, A. (2012). Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. Molecular Medicine (Cambridge, Mass.), 18 (3), 325–335.

Pawaskar, S.M. and Sasangan, K.C. (2017). Biochemical and nutritional analysis of the leaf extract of *Moringa*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research,, 9(4):305-309.

Perucca, E. (2002). Pharmacological and therapeutic properties of valproate. CNS Drugs, 16(10), 695-714.

Pham-Huy, L. A. ; He, H. and Pham-Huy, C.(2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J. Biomed. Sci. 4(2): 89-99.

Piper, J.D. and Piper, P.W. (2017). Benzoate and Sorbate Salts: A Systematic Review of the Potential Hazards of These Invaluable Preservatives and the Expanding Spectrum of Clinical Uses for Sodium Benzoate. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 16, 868–880

Piper, P.W .(1999). Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro- oxidant action of weak organic acid food preservatives. Free Radic. Biol. Med. J. 27 (11-12): 1219–1227.

Pole, A.; Dimri, M. and Dimri, G. (2016). Oxidative Stress, Cellular Senescence and Ageing. AIMS Mol. Sci. 3, 300–324.

Pongsavee, M. (2015). Effect of Sodium Benzoate Preservative on Micronucleus Induction, Chromosome Break, and Ala40Thr Superoxide Dismutase Gene Mutation in Lymphocytes. Bio.Med. Res., 103512.

Prabhu, K., Murugan, K., Nareshkumar, A., Ramasubramanian, N. and Bragadeeswaran, S. (2011). Larvicidal and repellent potential of Moringa oleifera against malarial vector, Anopheles stephensi Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). Asian Pac J Trop Biomed. 1(2): 124-129.

Prasad, T.N.V.K.V. and Elumalai, E.K. (2013). Biofabrication of Ag nanoparticles using Moringa oleifera leaf extract and their antimicrobial activity. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 1(6): 439-442.

Puglia, C. D. and Powell, S. R. (1984). Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. Environ. Health Persp. 57: 307–311.

Pundir, C. S. and Rawal, R. (2013). Determination of sulfite with emphasis on biosensing methods: a review. Analytical and bioanalytical chemistry, 405(10), 3049-3062.

Qamar, H., Rehman, S. and Chauhan, D.K., (2019). Current status and future perspective for research on medicinal plants with anticancerous activity and minimum cytotoxic value Curr. Drug Targets, 20 (12), pp. 1227-1243

Qureshi, S. and Solanki, H. (2015). 7. Moringa oleifera lam. _ a wonder plant curing multiple ailments_ its phytochemistry and its pharmacological applications by shirin qureshi and hitesh solanki. International research journal of chemistry, 11, 64-to.

Rabiu, S., Abubakar, M. G., Sahabi, D. M., Makusidi, M. A., Dandare, A. and Bello, J. H. (2021). Benzoic Acid Based Beverages: Health Implications. Asian Food Science Journal, 93-105.

Racusen, L.C., Fivush, B.A., Li, Y.L., Slatnick, I. and Solez, K. (1991). Dissociation of tubular cell detachment and tubular cell death in clinical and experimental "acute tubular necrosis". Lab Invest. 64(4):546- 456.

Radwan, E. H., Elghazaly, M. M., Hussein, H. K., Aziz, K., and Barakat, A. I. (2020). The possible effects of sodium nitite and sodium benzoate as food additives on the liver in male rats. Journal of advances in biology, (13), 14-30.

Ramakrishnan, B.S. and Venkataraman, R. (2011). Screening of antioxidant activity, total phenolics and gas chromatography mass- Spectrophotometer (GC-MS) study of ethanolic extract of Aporosa lindleyana. Afr J Biochem Res. 5(14): 360-364.

Ranawat L., Bhatt J. and Patel J. (2010). Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of Zanthoxylum armatum DC in CCl4 induced hepatic damage in rats. Journal of Ethnopharmacology.127(3):777–780.

Rapa, S.F.; Di Iorio, B.R.; Campiglia, P.; Heidland, A. and Marzocco, S. (2019). Inflammation and oxidative stress in chronic kidney disease-potential therapeutic role of minerals, vitamins and plant-derived metabolites. Int. J. Mol. Sci. 21, 263.

Raposa, B., et al., (2016). Food additives: sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine, and tartrazine modify the expression of NFjB, GADD45a, and MAPK8 genes. Physiology International, 103 (3), 334–343.

Ratliff, B.B., Abdulmahdi, W., Pawar, R. and Wolin, M.S. (2016). Oxidant mechanisms in renal injury and disease. Antioxid. Redox Signal., 25, pp. 119-146,

Ratnam, D. V. ; Ankola, D. D. ; Bhardwaj, V. ; Sahana, D. K. and Kumar, N.M.V.R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. J. Control Release, 113(3): 189–207.

Reczek, C.R., Birsoy, K., Kong, H., Martinez-Reyes, I., Wang, T., Gao, P., Sabatini, D.M., and Chandel, N.S. (2017). A CRISPR screen identifies a pathway required for paraquat-induced cell death. Nat. Chem. Biol. 13, 1274–1279.

Redza-Dutordoir, M., and Averill-Bates, D.A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. Biochim. Biophys. Acta 1863, 2977–2992.

Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. American journal of clinical pathology, 28(1), 56–63.

Ren, L., Meng, M., Wang, P., Xu, Z., Eremin, S. A., Zhao, J., and Xi, R. (2014). Determination of sodium benzoate in food products by fluorescence polarization immunoassay. Talanta, 121, 136-143.

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. and Zhang, L.(2003). Flavonoids: promising anticancer agents, Med. Res. Rev., 23(4), 519-534.

Ritesh, K.R., Suganya, A., Dileepkumar, H.V., Rajashekar, Y. and Shivanandappa, T. (2015) . A single acute hepatotoxic dose of CCl4 causes oxidative stress in the rat brain, Toxicol. Rep. 2 ,891–895.

Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. (2013). Comparative characterization of phenolic and other polar compounds in Spanish melon cultivars by using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry. Food Res. Int. 54, 1519–1527

Romero, R., Vizoso, J., Emamian, M., Duffy, T., Riely, C. and Halford T . (1988). Clinical significance of liver dysfunction in pregnancy-induced hypertension. Am J Perinatol . 5: 146 – 151.

Roxas, V. P., Lodhi, S. A., Garrett, D. K., Mahan, J. R., and Allen, R. D. (2000). Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. Plant Cell Physiol. 41, 1229–1234.

Saad, B., . (2005). Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. A, 1073 (1–2), 393-397.

Saatci, C., Erdem, Y., Bayramov, R., Akalin, H., Tascioglu, N. and Ozkul Y. (2016). Effect of sodium benzoate on DNA breakage, micronucleus formation and mitotic index in peripheral blood of pregnant rats and their newborns. Biotechnology and Biotechnological Equipment. 1-5.

Sabour, A. and Ibrahim, I.R. (2019). Effect of Sodium Benzoate on Corticosterone Hormone Level, Oxidative Stress Indicators and Electrolytes in Immature Male Rats. Sci. J. Med. Res. 3, 101–106.

Sadzuka, Y., Shimizu, Y. and Takino, Y. (1994) . Role of glutathione S-transferases in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, Toxicol. Lett. 70 ,211–222.

Safrida,S., Noviasyah, N. and Khairil, K. (2020). Effects of Moringa oleifera Leaves Powder in Fish Feed Toward Growth Rate and Health of Colossoma macropomum. Biosaintifika 12 (2), 186-191

Saha, S.K., Lee, S.B., Won, J., Choi, H.Y., Kim, K., Yang, G.M., Dayem, A.A. and Cho, S.G. (2017). Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. Int J Mol Sci., 18.

Saini, R.K. , Sivanesan, I. and Keum, Y. (2016). Phytochemicals of Moringa oleifera: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. J. Biotech., 6(203): 1-14.

Sakihama, Y. ; Cohen, M. F. ; Grace, S. C. and Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology ,177(1): 67-80.

Saleh, A. (2018) Evaluation of hepatorenal protective activity of Moringa oleifera on histological and biochemical parameters in cadmium intoxicated rats. Toxin Rev.

Saleh, N. S., Allam, T. S., El-Rabeai, R. M. and El-Sabbagh, H. S. (2018). Protective Effect of Some Egyptian Medicinal Plants Against Oxidative Stress in Rats. Alexandria Journal for Veterinary Sciences, 58(1):1-14.

Sanjay, P., and Dwivedi, K. N. (2015). Shingru (*Moringa oleifera* Lam.): A critical review. International Journal of Ayurveda and Pharmaceutical Chemistry, 3(1), 217-227.

Sardesai, V.(2011). Introduction to Clinical Nutrition. 3rd ed. Taylor & Francis group,USA. pp. 557-558

Sau, A., Pellizzari Tregno, F., Valentino, F., Federici, G. and Caccuri, AM. (2010). Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. Arch. Biochem. Biophys. 500:116–122.

Saucedo-Pompa, S.; Torres-Castillo, J. A.; Castro-López, C.; Rojas, R.; Sánchez-Alejo, E. J.; Ngangyo-Heya, M. and Martínez-Ávila, G.C.G.(2018). Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. Food Research International, 111, 438-450.

Settipane, G.A. (1983). Aspirin and Allergic Diseases: A Review. Am. J. Med. 74, 102–109.

Shahmohammadi, M.; Javadi, M. and Nassiri-Asl, M. (2016). An Overview on the Effects of Sodium Benzoate as a Preservative in Food Products. Biotechnol. Health Sci. 3, 7–11.

Sharayu, R. and Asmita, M. (2017). Beneficial effect of Moringa oleifera on Lead induced Oxidative stress. Int. J. of Life Sciences, 5 (1): 63-72.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. and Dowd, C.A. (2001) ‹"Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily" ‹Biochem. J. ‹360 (Pt 1): 1–16.

Shiriki, D., Igyor, M.A. and Gernah, D.I. (2015). Nutritional evaluation of complementary food formulations from maize, soybean and peanut fortified with Moringa oleifera leaf powder. Food Nutr Sci 6(5): 494-500.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biol. 4, 180–183.

Simiae, A. (2007). Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics. Molecules. 12: 2327-2340.

Singh, D., Kaur, R., Chander, V. and Chopra K. (2006). Antioxidants in the prevention of renal disease. J Med Food. 9(4):443–450

Singh, P.P. ; Chandra, A. ; Mahdi, F. ; Ray, A. and Sharma, P.(2010). Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease. Ind. J. Clin. Biochem. 25(3): 225–243.

Sinha, R. and D'Souza, D. (2006). Effects of sodium benzoate on haematological and biochemical parameters in Swiss albino mice, Mus musculus. Bulletin of Pure & Applied Sciences-Zoology. 25A(1): 31-37.

Sinha, R. and D'Souza, D. (2010): Liver cell damage caused due to sodium benzoate toxicity in mice. International Journal of Biotechnology and Biochemistry. ISSN 0973- 2691 Volume 6, pp. 549-554.

Sodamade, A.; Owonikoko, A.D. and Owoyemi, D.S. (2017). Nutrient contents and mineral composition of Moringa oleifera Seed. International Journal of Chemical Studies, 5(2): 205-207.

Solter, P.F. (2005). Clinical pathology approaches to hepatic injury. Toxicol Pathol,33:9–16.

Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. and Lleonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: An overview. Ageing Res. Rev. 12:376–390.

Start, D.A., Silva, F.G., Davis, L.D., D'Agati, V. and Pirani, C.L. (1988). Myeloma cast nephropathy: immunohistochemical and lectin studies. Modern Pathology. 1988;1:336–347.

Steegers, E.A., Mulder, T.P., Bisseling, J.G., Delemarre, F.M. and Peters, W.H. (1995). Glutathione S-transferase alpha as marker for hepatocellular damage in pre- eclampsia and HELLP syndrome. Lancet. 345: 1571 – 1572.

Stockham, S.L. and Scott, M.A. (2008). Liver function. In: Stockham SL, Scott MA, editors.Fundamentals of veterinary clinical pathology. 2nd ed. Iowa: Blackwell Publishing Limited , p. 675–706.

Struzyńska, L. and Sulkowski, G. (2004). Relationships between glutamine, glutamate, and GABA in nerve endings under Pb-toxicity conditions. J . Inorg. Biochem. 98(6): 951-958.

Sudibyo, M. (2000). Inhibition of glutathione S-transferase by curcumin and its derivatives : A molecular mechanism and qualitatives structure activity relationships, Dissertation, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Sutalangka, C., Wattanathorn, J., Muchimapura, S. and Thukham-mee, W. (2013). Moringa oleifera mitigates memory impairment and neurodegeneration in animal model of age-related dementia Oxid. Med. Cell. Longev., p. 695936

Suvarna, K. S., Layton, C., and Bancroft, J. D. (2018). Bancroft's theory and practice of histological techniques E-Book. Elsevier Health Sciences

Taher, M. A., Nyeem, M. A. B., Ahammed, M. M., Hossain, M. M. and Islam, M. N. (2017). *Moringa oleifera* (Shajna): the wonderful indigenous medicinal plant. Asian Journal of Medical and Biological Research, 3(1), 20-30.

Talreja,T. and Goswami, A. (2016). Phytosterols production in *Moringa oleifera* in vitro cultures. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 4(1):66-69.

Tawfek, N.S., Amin, H.M., Abdalla, A.A. and Fargali, S.H.M. (2015). Adverse effects of some food additives in adult male albino rats. Current Science International.04(04):525- 537.

Tew, K.D. and Townsend, D.M. (2011). Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. Drug Metab. Rev. 43:179–193.

Thabrew, M. I. ; Bababunmi, E.A. and French. M.R. (1980). The metabolic fate of 14 [C]benzoic acid in protein-energy deficient rats. Toxicol. Lett. 5(6):363–367..

Tiloke, C., Anand, K., Gengan, R. M. and Chuturgoon, A. A. (2018). Moringa oleifera and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. Biomedicine & Pharmacotherapy, 108: 457-466.

Trakshell, G. and Maines, M. (1988). Characterization of glutathione S-transferases in rat kidney. Alteration of composition by cis-platinum, Biochem. J. 252 ,127–136.

Tremblay, G. C. and Qureshi, I.A.(1993). The biochemistry and toxicology of benzoic acid metabolism and its relationship to the elimination of waste nitrogen. Pharmac. Ther. 60(1):63–90

Uddin, M.J.; Kim, E.H.; Hannan, M.A. and Ha, H. (2021). Pharmacotherapy against oxidative stress in chronic kidney disease: Promising small molecule natural products targeting nrf2-ho-1 signaling. Antioxidants, 10, 258.

United States Department of Agriculture (USDA). (2016). Natural Resources Conservation Service. Plants Database. Taxonomic Serial.

Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. and Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Curr. Neuropharmacol.7:65–74

Valko, M. ; Izakovic, M. ; Mazur, M. ; Rhodes, C. J. and Telser, J.(2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol. Cell. Biochem. 266(1-2): 37–56.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol.;39:44–84.

Van Wagensveld, B.A., Scheepers, J.J.G., van Gulik, T.M., Frederiks, W.M., Bleeker, W.K. and Obertop, H. (1997). Alpha glutathione S-transferase as novel parameter for hepatocellular damage in the isolated perfused rat liver. Transplant Proc; 29: 3449 – 3451.

Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M.M. and Fernandez, M.L. (2017). Bioactive components in Moringa oleifera leaves protect against chronic disease. Antioxidants (Basel). 6(4): 91.

Vibhute, S., Kasture, V., Kasture, S., Kendre, P., Rupnar, S. and Pande, V. (2015). Design and characterization of Moringa oleifera seed oil impregnated anti-inflammatory topical micro-dispersion.Scholars Research Library,7(3):7-6.

Viera, G. H. F., Mourão, J. A., Ângelo, Â. M., Costa, R. A. and Vieira, R. H. S. D. F. (2010). Antibacterial effect (in vitro) of Moringa oleifera and Annona muricata against Gram positive and Gram negative bacteria. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 52(3): 129-132.

Walczak-Nowicka, Ł.J. and Herbet, M. (2022). Sodium Benzoate— Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review. Nutrients, 14(7), 1497.

Wardhani, T.M. (2020). Pemanfaatan Tanaman Kelor (Moringa oleifera, Lam.) sebagai Sumber Terapi Preventif dan Kuratif pada Pasien Perlemakan Hati dengan Sindrom Metabolik. Scientific Medical Journal, 1 (2), 1-11

Wells, P.G., Bhatia, S., Drake, D.M. and Miller-Pinsler L. (2016). Fetal oxidative stress mechanisms of neurodevelopmental deficits and exacerbation by ethanol and methamphetamine. Birth Defects Res C Embryo Today;108:108-30.

Widodo, N.; Widjajanto, E.; Jatmiko, Y. and Rifa'i, M. (2020). Red Moringa oleifera leaf fermentation extract protecting Hepatotoxicity in Balb/C mice injected with Salmonella typhi through Nrf-2, HO-1, and SOD-2 signaling pathways. R. J. Pharm. Technol., 13, 5947–5952

Wiegand, H., Boesch-Saadatmandi, C., Regos, I., Treuter, D., Wolffram, S. and Rimbach, G. (2009). Effects of quercetin and catechin on hepatic glutathione-S-transferase (GST), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and antioxidant enzyme activity levels in rats. Nutr Cancer 61:717–722.

Willcox, J.K., Ash, S.L. and Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 44 (4): 275-295

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langerbartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. (1997) Catalase is a sink for H2O2 and is indispensable for stress defense in C3 plants. EMBO J.16: 4806–4816.

Williams, C. A. and Grayer, R. J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. Nat. Prod. Rep. 21, 539-573.

Williams, R.E. and Lock, E.A., (2005). Sodium benzoate attenuates d-serine induced nephrotoxicity in the rat. Toxicology, 207 (1), 35–48.

Wilson, D.O., Jr. and MacDonald, M.B. (1986). The lipid peroxidation model of seed aging. Seed Sci. Technol.14: 269–300.

Wu, G.; Fang, Y.; Yang, S.; Lupton, J.R. and Turner, N.D. (2004) . Glutathione metabolism and its implications for health, J. Nutr. 134 (3) 489–492.

Xu, C.; Li, C. Y. and Kong, A. N. T. (2005). Induction of phase I, II, and III drug metabolism /transport by xenobiotics. Arch Pharm Res 28:249–268.

Yadav, A.; Kumar, A.; Das, M. and Tripathi, A. (2016). Sodium Benzoate, a Food Preservative, Affects the Functional and Activation Status of Splenocytes at Non Cytotoxic Dose. Food Chem. Toxicol., 88, 40–47.

Yazar, E.; Altunok, V.; Elmas, M.; Traş, B.; Baş, A.L. and Ozdemir, V. (2002). The effect of tilmicosin on cardiac superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health, 49 ,pp. 209-210

Yetuk, G. ; Pandir, D. and Bas, H.(2014). Protective role of catechin and quercetin in sodium benzoate-induced lipid peroxidation and the antioxidant system in human erythrocytes in vitro.The Scientific World Journal , : 1-6.

Zeghib, K. and 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. Iran J. Pharm. Res., 20, 296–306.

Zengin, N.; Yüzba¸sıo ˘glu, D.; Unal, F.; Yılmaz, S. and Aksoy, H. (2011).The Evaluation of the Genotoxicity of Two Food Preservatives: Sodium Benzoate and Potassium Benzoate. Food Chem. Toxicol., 49, 763–769.

Zhang, G., and Ma, Y. (2013). Spectroscopic studies on the interaction of sodium benzoate, a food preservative, with calf thymus DNA. Food chemistry, 141(1), 41-47.

Zhang, H. and Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. Curr Opin Food Sci;8:33-42.

Zhang, J.; Grek, C.L.; Ye, Z.-W.; Manevich, Y.; Tew, K.D. and Townsend D.M. (2014). Pleiotropic Functions of glutathione S-transferase P. Adv. Cancer Res.122:143–175.

Zhao, K.; Chen, Y.; Hong, S.; Yang, Y.; Xu, J.; Yang, H.; Zhu, L.; Liu, M.; Xie, Q. and Tang, X. (2019). Characteristics of β-Oxidative and Reductive Metabolism on the Acyl Side Chain of Cinnamic Acid and Its Analogues in Rats. Acta Pharmacol. Sin., 40, 1106–1118.

Summary

…………………………………..…………………………………

The aim of this study is to determine the histopathological effects of sodium benzoate on the liver and kidneys and the biochemical effects on the level of liver enzymes such as Alkaline phosphatase (ALP), Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT) ,and antioxidant enzymes such as Superoxide dismutase (SOD) , Catalase (CAT) ,Glutathione S-transferase (GST) and protection by Moringa Oleifera leaf extract against oxidative stress by the action of sodium benzoate . as This study was conducted in the animal house of veterinary medicine and for the period from 11/15/2021 to 1/2/2022 , Thirty white rabbits (male) were used, as they were divided randomly into six groups, Each of group includes Five rabbits ,which categorized as the negative control group (C1) where they given a distilled water ; and the positive control group (C2) that dosed with moringa leaf extract (200mg/kg of body weight) ; group T1 that treated with high concentration of sodium benzoate (500mg/kg) ; group T2 which treated with low concentration of sodium benzoate (250mg/kg) ; group T3 that treated with a both moringa extract (200mg/kg) , and a high concentration of sodium benzoate (500mg/kg) and group T4 which treated with both moringa extract (200mg/kg) and a low concentration of sodium benzoate (250mg/kg) . all the groups were administrated orally daily for (30) days.

At the end of the experiment , rabbits were weighted , and blood samples were drawn by heart stab for the purpose of performing the biochemical analyses, then the rabbits were dissected to extract the liver and kidneys for histopathological diagnosis . The body weight changes of rabbits showed that there were no significant differences in their weights before and after dosing, as well as our

results did not record any significant differences in the weights of organs (liver, right kidney and left kidney) among all groups of rabbits.

for the biochemical effects, the results of the activity of liver enzymes (ALP, AST) showed that there were no significant differences between all groups of rabbits. The ALT enzyme recorded significant differences ($p < 0.05$) between the groups, and a significant decrease in the activity of the ALT enzyme was observed in the group of rabbits that were dosed with Moringa extract (200 mg/kg/body weight) compared to the negative control group and compared to the group that was dosed with Moringa extract (200/kg/body weight) and then the low concentration of sodium benzoate (250 mg/kg/body weight) by (4.085 ± 9.486).

A significant decrease ($P<0.05$) was observed in the activity of ALT enzyme in the group of rabbits that were dosed with a high concentration of sodium benzoate (500 mg/kg/body weight) compared to the negative control group and in comparison with the group that was dosed with Moringa extract (200 mg/kg/body weight) and then the low concentration of sodium benzoate (250 mg / kg / body weight) by (11.06 ± 5.92).

A significant decrease ($P<0.05$) was recorded in the activity of the ALT enzyme in the group of rabbits that were dosed with a low concentration of sodium benzoate (250 mg/kg/body weight) compared to the negative control group and in comparison with the group that was dosed with Moringa extract (200 mg/kg/body weight) and then the low concentration of sodium benzoate (250 mg / kg / body weight) by (10.94 ± 8.498).

The results recorded a significant decrease in the activity of ALT enzyme in a group of rabbits that were treated with Moringa oleifera leaf extract (200

mg/kg/body weight) and then treated with a high concentration of sodium benzoate (500 mg/kg/body weight) compared with the negative control group and compared with The group that was dosed with Moringa extract (200 mg/kg/body weight) and then a low concentration of sodium benzoate (250 mg/kg) by (5.422 ± 7.915).

The results of the statistical analysis indicated that there were statistically significant differences ($P<0.05$) in the activity of enzymes antioxidant (SOD and GST) in the treated groups.

Our results recorded a significant decrease in the activity of the SOD enzyme for a group of rabbits that treated with moringa leaf extract (200mg/kg of body weight) followed by a low concentration of sodium benzoate (250 mg/ kg of body weight) (0.053±0.447) compared with the negative control group . and the results recorded no significant differences ($P>0.05$) in the activity of the antioxidant CAT compared with all groups .

The results also recorded a significant increase in the activity of the GST enzyme for the group of rabbits that treated with a high concentration of sodium benzoate (500mg/kg of body weight) by (0.6020±0.1053) compared with the negative control group, and a significant decrease was observed in the activity of the GST enzyme in the group of rabbits that treated with low concentration of sodium benzoate (250mg/kg of body weight) by (0.1870±0.097) compared with the group of rabbits treated with high concentration of sodium benzoate , and in rabbits treated with moringa leaf extract (200mg/kg of body weight) by (0.242±0.084) compared with the groups of rabbits that treated with the high concentration of sodium benzoate and in rabbits groups treated with leaf extract moringa (200mg/kg of body weight) and then the high concentration of sodium benzoate (500mg/kg body weight) with an amount of (0.1850±0.169) compared to

the group of rabbits treated with high concentration , and in the group of rabbits treated with leaf extract Moringa Oleifera (200mg/kg body weight) followed by the low concentration of sodium benzoate (250 mg/ kg body weight) by (0.099±0.209) compared with the group of the rabbits treated with the high concentration .

As a result , a histological changes appeared in the groups treated with sodium benzoate (500 or 250 mg/kg/bw) in the liver tissues represented by bloody congestion in the central vein , the destruction of the radial structure of the hepatocytes arranged around the central vein , and frequent infiltration of kupffer cells , the presence of a number of dead cells , and steatosis represented by the accumulation of fat. While kidney tissue showed shrinkage of the renal glomerulus, increased Bowman's vacuole and inflammatory cell counts , dilatation of the urinary tubules, necrosis in the cells lining the urinary tubules, as well as the accumulation of fat.

While the histological changes of the groups that treated with Moringa Oleifera leaf extract (200mg/kg of body weight) followed by concentrations of sodium benzoate (500 or 250 mg/kg of body weight) in the liver tissues a normal appearances of the liver tissue , lack of Kupffer cells infiltration , and the presence of a small number of oleaginous cells (microsteatosis) , and arrangement of hepatocytes in the form of a granule around the central vein of the liver lobule with an improvement in liver tissue . This could be attributed to the protective effect of Moringa Oleifera leaf extract. While the kidney tissues showed a normal appearance of the renal glomeruli ; a slightly expansion in some urinary tubules with slight infiltration of some inflammatory cells, and necrosis in the cells lining the urinary tubules , with a partial improvement of the kidney tissue , which probably due to the use of moringa leaf extract.

The kidney pulp showed a normal urinary tubules with the presence of some inflammatory cells between the urinary tubules , as well as the presence of hyaline cast , infiltration and accumulation of protein substances in the urinary tubules of some rabbits , and the presence of a small number of fat cells.

We can conclude from the results of our study that the Moringa Oleifera leaf extract reduced the negative effects of sodium benzoate on the level of biochemical parameters in the blood and histopathological structure of the liver and kidneys of rabbits that were treated with sodium benzoate.

University of Kerbala
College of Science
Department of Biology

Histopathological and biochemical study of the protective role of alcoholic extract of Moringa leaves against sodium benzoate - induced oxidative stress in male albino rabbits.

A thesis

Submitted to the council of the

College of Science – University of Kerbala

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

By

Leqaa Abdul Al-Karim Qassem Al-Khalidi

Supervised by

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

1444 A.H **2023 A.D**