

N°/SNV/2021

قسم بيولوجيا العضوية

أطروحة

من إعداد

هاشمي مسعود

قدمت للحصول على شهادة

دكتوراه العلوم

تخصص فيزيولوجيا حيوان

العنوان

تأثير مستخلص العكبر على الإجهاد التأكسدي والموت
الخلوي الكبدي والكلوي الناتج عن المعادن الثقيلة

تاريخ المناقشة: 2021\05\20

أعضاء لجنة المناقشة

الرئيس	سيناطور عبد الرحمان	أستاذ التعليم العالي	جامعة باتنة 2
المشرف	لحول مصباح	أستاذ التعليم العالي	جامعة جيجل
المتحنون	شافعة اسماعيل	أستاذ التعليم العالي	جامعة باتنة 2
	سي بشير عبد الكريم	أستاذ التعليم العالي	جامعة باتنة 2
	زعمة جميلة	أستاذة التعليم العالي	جامعة قسنطينة 1
	نوادري الطاهر	أستاذ محاضر أ	جامعة قسنطينة 1

شكر وتقدير

أحمد الله سبحانه وتعالى، وأشكره جزيل الشكر؛ إذ بعونه وتوفيقه أتممت بحثي هذا.

أتقدم بأسمى عبارات الامتنان و العرفان لأستاذي الفاضل مصباح لحول الأستاذ بجامعة جيجل

والذي تحمّل عبء الإشراف.

كما أشكر الأستاذ مولود يحي (رحمه الله) على كلّ ما قدّمه لي من مساعدة ونصح.

الشكر للأساتذة أعضاء لجنة المناقشة على قبولهم مناقشة الأطروحة، وكذلك على تشجيعهم لي

لإنهاء هذا العمل، الأستاذان: إسماعيل شافعة و عبد الرحمان سيناطور من جامعة باتنة 2،

والأستاذان: جميلة زعمة و الطاهر نوادري من جامعة منتوري بقسنطينة.

وأشكر للمرّة الثّانية الأستاذ عبد الرحمان سيناطور الذي أسهم بشكل كبير في إجراء جانب من الأعمال

المخبريّة بمخبر الكيمياء الحيويّة التطبيقية بكلية علوم الطبيعة والحياة جامعة فرحات عباس سطيف.

وأشكر الدكتور دواوي حمان مدير مخبر ابن سينا للتحاليل الطبيّة بقسنطينة الذي تطوّع لإجراء

معظم التحاليل البيوكيميائيّة.

كما أتقدم بالشكر لأساتذة معهد العلوم البيطريّة والفلاحيّة بجامعة باتنة 1، وعلى رأسهم الأساتذة: محمّد

مليزي و عمر بنون و عمر العياشي... على مساعداتهم الجمّة في إجراء التّجارب بالمعهد.

والشكر موصول للأستاذين الكريمين: عبد العالي بوسيف و هشام مزيتي على ما قدّماه لإجراء جانب من

التحاليل المخبريّة. والشكر للأستاذ محمّد كبيش الذي شجّعني من أجل إنهاء هذا العمل.

كما أتقدم بالشكر إلى محمّد أيمن ميهوبي الذي لم يبخل عليّ في تقديم مساعداته بمخبر البحث بكلية

علوم الطبيعة والحياة جامعة باتنة 2.

كما أشكر زوجتي على تصحيحاتها اللّغوية، وعلى تشجيعها لي لإتمام هذا العمل.

وأشكر كلّ من قدّم لي يد المساعدة من قريب أو من بعيد.

الإهداء

أهدي هذا العمل الى أقرب النَّاسِ إلى قلبي:

إلى روح والديا رحمهما الله

إلى زوجتي

إلى أبنائي عبد الله وخديجة ورحمة

إلى إخوتي وأخواتي و أصدقائي

تأثير مستخلص العكبر على الإجهاد التأكسدي والموت الخلوي الكبدى والكلوى

النتائج عن المعادن الثقيلة

المخلص

يعتبر الكاديوم Cd والرصاص Pb من أهم المعادن الثقيلة الملوثة للبيئة، وذلك لآثارها السمية، ويعد الكبد والكلوى من الأعضاء المستهدفة لدورها في توزيعهما وتكديسهما في العضوية، وهذا ما يؤدي إلى إصابتها بالإجهاد التأكسدي. تهدف هذه الدراسة إلى اختبار إمكانية التأثير الوقائي للعكبر ضد الإجهاد التأكسدي الناتج عن Cd و Pb على ذكور الجرذان (Albinos- Wistar). تم تجريب نصف العدد من الحيوانات بـ 25 ملغ من العكبر كل مدة 5 أيام، مرر لجميع الحيوانات وعن طريق ماء الشرب ولمدة 12 أسبوع محاليل $CdCl_2$ 0.3 غ/ل و $Pb-acetate$ 3 غ/ل. قيست المعايير البيوكيميائية في الدم والبول، كما تم قياس GSH و MDA النسيجية. أدى $CdCl_2$ بمفرده أو مع Pb-ac إلى فقدان معتبر في وزن الحيوانات ($p \leq 0.001$) ولم يظهر أي أثر وقائي للعكبر على ذلك. سجل ارتفاع معتبر ($p \leq 0.001$) في الأوزان النسبية للكبد تحت تأثير خليط ملحي المعدنين. أدى Cd إلى ارتفاع معتبر ($p \leq 0.001$) في الأوزان النسبية للكلوى. لوحظ ارتفاع معتبر ($p \leq 0.001$) في نشاط إنزيمات الكبد تحت تأثير Pb. سجل أثر معتبر للعكبر على التأثير السمي للرصاص على النشاط الكبدى ($p \leq 0.001$). أدى Cd إلى تسرب الدم وكميات كبيرة من البروتينات مع البول، وأدى العكبر إلى وقاية جزئية من هذه الآثار. أدى Cd إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في تراكيز MDA وارتفاع معتبر ($p \leq 0.001$) في تراكيز GSH الكبدية. أما Pb فأدى إلى نتائج معاكسة مقارنة بتأثير الكاديوم عند ($p \leq 0.001$). سبب خليط المعدنين ظهور حالة الإجهاد التأكسدي بصورة معتبرة ($p \leq 0.001$) وذلك بارتفاع تراكيز MDA وانخفاض تراكيز GSH الكبدية. لم يسجل تأثير وقائي للعكبر على آثار الإجهاد التأكسدي الكبدى للرصاص. أدى Cd إلى ارتفاع معتبر ($p \leq 0.01$) في تراكيز MDA الكلوية أما Pb في صورته المنفردة أو مع Cd فأدى إلى ارتفاع معتبر ($p \leq 0.001$) في تراكيز MDA وانخفاض تركيز GSH الكلوية في جميع المجاميع المعاملة بـ Cd و Pb.

الكلمات المفتاحية: Cd، Pb، العكبر، الكبد، الكلوى، الإجهاد التأكسدي

Effect of propolis extract on hepatic and renal oxidative stress and apoptosis produced by heavy metals

Abstract

Cadmium and lead are important heavy metals polluting the environment, due to their high toxic effects. Liver and kidneys are a target for cadmium and lead toxicity. Cadmium and lead include free radicals, leading to oxidative stress. Propolis is an external antioxidant, which protects the hive from all pests and contains antioxidants that address the free radicals. Our study aimed to test the possibility of protective effect of the propolis against the oxidative effects resulting from cadmium and lead in their single or mixed form on the liver and kidneys of *Albinos Wistar* rats. The study was divided into two stages 48 male rats were divided into two equal groups. The first group is given by gavage (25 mg / kg body weight) of propolis for five days, while the other group takes the vehicle solution. After treatment with the propolis, eight groups were formed, four of which were not pre-treated with the propolis. Animals not supplied with minerals gave them bid distilled water, and those exposed to cadmium and lead gave those solutions of cadmium chloride salts (0.3 g / L) and lead acetate (3 g / L) in drinking water for 12 weeks. After the experimental period, plasma and urine biochemical parameters were measured to determine hepatic and renal activity also hepatic and renal oxidative stress parameters were tested. Our results showed: cadmium alone or with lead led to loss significantly ($p \leq 0.001$) the body weight and no protective effect for the propolis. A significant increase ($p \leq 0.001$) was recorded in relative liver weights under the effect of mineral salts. Cadmium alone showed a significant increase ($p \leq 0.001$) in relative kidney weights. There was a significant increase ($p \leq 0.001$) in hepatic enzymes activity under the influence of leads and was not recorded in the case of the mineral mixture. A significant effect was recorded on the toxic effect of lead on hepatic activity ($p \leq 0.001$). High urinary protein and blood flow with urine were recorded in cadmium-treated rats. The propolis has partially protects against these effects. The oxidative stress parameters showed that cadmium significantly reduced ($p \leq 0.001$) in the MDA values and significantly increased ($p \leq 0.001$) in the GSH values. But the lead led to opposite results at ($p \leq 0.001$). The mineral mixture showed significant oxidative stress ($p \leq 0.001$) with increased MDA values and decreased GSH values. No significant effect was observed on the levels of MDA and GSH caused by lead poisoning. Cadmium showed a significant increase ($p \leq 0.01$) in the concentration of renal MDA. Lead in its single or combined form with cadmium increased significantly ($p \leq 0.001$) the MDA values and the decreased GSH values in all cadmium and lead groups.

Keywords: cadmium, lead, propolis, liver, kidney, oxidative stress.

Effet d'un extrait de propolis sur le stress oxydatif et l'apoptose hépatiques et rénale produite par des métaux lourds

Résumé

Le cadmium et le plomb sont des métaux lourds importants qui polluent l'environnement, en raison de leurs effets toxiques élevés. Le foie et les reins sont une cible pour la toxicité de ces métaux. La propolis est un antioxydant externe, qui protège la ruche de tous les parasites et contient des antioxydants qui s'attaquent aux radicaux libres. Notre étude a pour objectif de tester la possibilité de l'effet protecteur de la propolis contre le stress oxydatif résultant du chlorure de cadmium et de l'acétate de plomb dans leur forme simple ou mélangée sur le foie et les reins des rats Albinos Wistar. Cette étude a été divisée en deux étapes; 48 rats mâles ont été divisés en deux groupes égaux. Le premier groupe reçoit par gavage (25 mg / kg de poids corporel) de la propolis pendant cinq jours, tandis que l'autre groupe prend la solution véhicule. Après le traitement avec la propolis, huit groupes ont été formés, dont quatre n'ont pas été prétraités. Les animaux non alimentés en minéraux ont reçu de l'eau distillée, et ceux exposés au cadmium et au plomb ont reçu de l'eau potable qui contient des solutions de sels de chlorure de cadmium (0,3 g/l) et d'acétate de plomb (3 g/l) pour une durée de 12 semaines. Après la période expérimentale, les paramètres biochimiques du plasma et des urines ont été mesurés pour déterminer l'activité hépatique et rénale; les paramètres du stress oxydatif hépatique et rénal ont été également testés. Nos résultats ont montré : le chlorure de cadmium seul ou avec l'acétate de plomb a entraîné une perte significative ($p \leq 0,001$) du poids corporel et aucun effet protecteur pour la propolis. Une augmentation significative ($p \leq 0,001$) a été enregistrée dans le poids relatif du foie sous l'effet des sels minéraux. Le cadmium seul a montré une augmentation significative ($p \leq 0,001$) du poids relatif des reins. Une augmentation significative ($p \leq 0,001$) de l'activité des enzymes hépatiques a été enregistrée sous l'influence des sels minéraux et n'a pas été enregistrée dans le cas du mélange minéral. Un effet significatif a été enregistré sur l'effet toxique du plomb sur l'activité hépatique ($p \leq 0,001$). Des taux élevés de protéines urinaires et de flux sanguin avec l'urine ont été enregistrés chez les rats traités avec le cadmium. La propolis a partiellement protégé contre ces effets. Les paramètres du stress oxydatif ont montré que le cadmium a réduit significativement ($p \leq 0,001$) le taux de MDA et augmenté significativement ($p \leq 0,001$) le taux de GSH. Mais le plomb a conduit à des résultats opposés à ($p \leq 0,001$). Le mélange minéral a montré un stress oxydatif significatif ($p \leq 0,001$) avec une augmentation des taux de MDA et une diminution des taux de GSH. Aucun effet significatif n'a été observé sur les niveaux de MDA et de GSH causés par l'empoisonnement au plomb. Le cadmium a montré une augmentation significative ($p \leq 0,01$) de la concentration de MDA rénale. Le plomb sous sa forme simple ou combinée avec le cadmium a augmenté significativement ($p \leq 0,001$) le taux de MDA. Le GSH a enregistré une diminution dans tous les groupes cadmium et plomb.

Mots-clés : cadmium, plomb, propolis, foie, rein, stress oxydatif.

Abbreviations

ALAD:	δ - aminolevulinic acid dehydratase
ALP:	Alkaline phosphatase
ALT:	Alanine aminotransferase
AMP:	2-amino-2-methyl-1-propanol
AOE:	Antioxidants enzyymes
AP-1:	Activator protein 1
AST:	Aspartate aminotransferase
ATSDR:	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
Bax:	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
BBB:	Blood-brain barrier
Bcl-2:	B-cell lymphoma 2
CAPE:	Caffeic acid phenethyl ester
CAT:	Catalase
G6PD :	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GABA:	Gamma- aminobutyrique acid
GGT:	γ -glutamyltransferase
GPx:	Glutathione Peroxidase
GR:	Glutathione reductase
GSH:	Glutathion
GSSG:	Glutathione disulfide
GST:	<u>Glutathione s transferase</u>

L:	Alkyl
LDH:	Lactate dehydrogenase
LOO:	Peroxyl
LOOH:	Peroxyd
MAPK:	Mitogen-activated protein kinases
MDA:	Malondialdehyde
MDH:	Malate dehydrogenase
MT:	Metallothionein
NF-κB:	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> -
NO:	Nitric Oxide
Nrf2:	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
O₂⁻:	Superoxide anion
OH:	Hydroxyl radical
8-oxoG:	8-oxo-7, 8-dihydroguanine
ROS:	Reactive Oxygen Species
SO:	Sarcosine oxidase
SOD:	Super oxide dismutase
TBA:	Thiobarbituric acid
TBARS:	Thiobarbituric acid reactive substances
TSH:	Total sulf hydryl groups
ZIP:	Zinc iron proteins

قائمة الأشكال

- شكل 1. بنى الأنواع الأكسجينية التفاعلية المنتجة في النظم البيولوجية 5
- شكل 2. تحرير المركبات التفاعلية الأكسجينية في الميتاكوندري 5
- شكل 3. الإنزيمات المشاركة في إزالة المركبات التفاعلية الأكسجينية والنتروجينية 6
- شكل 4. التفاعلات المؤدية لتكوين وإزالة مركبات التفاعل الأكسجينية 7
- شكل 5. آلية أكسدة الدهون 9
- شكل 6. أقسام مضادات الأكسدة 12
- شكل 7. تفاعل Ellman 37
- شكل 8. تكوين معقد المألون ثنائي الألدheid (MDA) مع حمض الثيوباربيتريك 38
- شكل 9. فرق وزن الحيوانات المكتسب أو المفقود 42
- شكل 10. الوزن النسبي للكبد 43
- شكل 11. الوزن النسبي للكلى 44
- شكل 12. تركيز إنزيم ناقل أمين الأسبارتات (AST) البلاسمي 45
- شكل 13. تركيز إنزيم ناقل أمين الألانين (ALT) البلاسمي 46
- شكل 14. تركيز إنزيم الفوسفاتاز القاعدي (ALP) البلاسمي 48
- شكل 15. تركيز اليوريا البلاسمية 49
- شكل 16. تركيز الكرياتينين البلاسمي 50
- شكل 17. تركيز إنزيم ناقل البيبتيد جاما جلوتاميل (GGT) البلاسمي 53
- شكل 18. إنزيم ناقل البيبتيد جاما جلوتاميل (GGT) البولي 54
- شكل 19. تركيز الجلوتاثيون المرجع (GSH) الكبدية 55

- شكل 20. تركيز المألون ثنائي الألدهيد (MDA) الكبدية..... 56
- شكل 21. تركيز الجلوتاثيون المرجع (GSH) الكلوي..... 57
- شكل 22. تركيز المألون ثنائي الألدهيد (MDA) الكلوي..... 58

قائمة الجداول

- جدول.1. المكونات الكيميائية الأساسية لعكبر جيجل الجزائر 29
- جدول.2. تركيبة 1 لتر من المحلول المنظم PBS 38
- جدول.3. نتائج المعايرة البولية..... 52

فهرس المحتويات

1المقدمة
	الدراسة النظرية
41. الإجهاد التأكسدي
41.1. الأنواع الأكسجينية التفاعلية ومصادرها
72.1. أضرار الإجهاد التأكسدي
103.1. مضادات الأكسدة
142. الرصاص والكاديوم
141.2. الرصاص
182.2. الكاديوم
233.2. الآثار التأكسدية للكاديوم والرصاص على الكبد والكلى
253. العكبر
251.3. مكونات العكبر
262.3. نشاط العكبر المضاد للأكسدة
	الوسائل والطرق
301. الوسائل المستخدمة
301.1. الحيوانات
302.1. المستخلص الفيولي للعكبر

31 الطرق المستخدمة.....
31 إنشاء المجموعات.....1.2
32 حساب التغير في وزن الحيوانات.....2.2
32 عينات البول.....3.2
32 عينات الدم.....4.2
33 تشريح الحيوانات.....5.2
33 معايرة المقاييس البيوكيميائية.....6.2
33 قياس نشاط AST.....1.6.2
34 قياس نشاط ALT.....2.6.2
34 قياس نشاط ALP.....3.6.2
35 قياس نشاط GGT.....4.6.2
35 معايرة الكرياتينين.....5.6.2
36 معايرة اليوريا.....6.6.2
36 قياس الإجهاد التأكسدي.....7.2
36 إعداد جناسة الأنسجة.....1.7.2
36 تقدير تركيز الجلوتاثيون المرجع.....2.7.2
39 تقدير تركيز MDA.....3.7.2
40 الدراسة الإحصائية.....8.2

النتائج والمناقشة

41 النتائج.....1
----	---------------------

41 1.1. أوزان الحيوانات
42 2.1. الوزن النسبي للكبد
44 3.1. الوزن النسبي للكلى
45 4.1. معايير النشاط الكبدي
45 1.4.1. إنزيم AST
46 2.4.1. إنزيم ALT
47 3.4.1. إنزيم ALP
48 5.1. معايير النشاط الكلوي
48 1.5.1. اليوريا البلاسمية
49 2.5.1. الكرياتينين البلاسمية
50 3.5.1. الدم في البول
51 4.5.1. البروتينات البولية
51 5.5.1. الأجسام الكيتونية
52 6.1. معايير الإجهاد التأكسدي
52 1.6.1. إنزيم ناقل البيبتيد جاما جلوتاميل (GGT) البلاسمي
53 2.6.1. إنزيم ناقل البيبتيد جاما جلوتاميل (GGT) البولي
54 3.6.1. الجلوتاثيون المرجع (GSH) الكبدي
55 4.6.1. المألون ثنائي الأدهيد (MDA) الكبدي
56 5.6.1. الجلوتاثيون المرجع (GSH) الكلوي
57 6.6.1. المألون ثنائي الأدهيد (MDA) الكلوي

59 مناقشة النتائج.....2
591.2. تغير الأوزان.....
612.2. تأثير الكادميوم والرصاص على المعايير الكيميائية الحيوية.....
633.2. تأثيرات الكادميوم والرصاص على النشاط الكلوي.....
644.2. تأثيرات الكادميوم والرصاص على الإجهاد التأكسدي.....
695.2. التأثير الوقائي للعكبر على الإجهاد التأكسدي.....
71الخاتمة والآفاق.....

أدى التطور التكنولوجي إلى تحسين مستويات الحياة، لكن ذلك أثار تحدياً جديداً وهو مدى سلامة البيئة من مخلفات التصنيع. فالدول النامية تعتمد على التنمية الصناعية والزراعية دون مراعاة ضوابط حماية البيئة من التلوث، ومن الملوثات الأساسية والخطيرة المعادن الثقيلة التي يؤدي ارتباطها بالمواد الغذائية إلى أضرار على الحيوان والإنسان (D'Souza and Peretiatko, 2002). تسبب المعادن الثقيلة خلافاً في النشاط الخلوي؛ وذلك بإزاحة المعادن الحيوية الأساسية من مواقعها، وإنتاج الجذور الحرة المؤدية للإجهاد التأكسدي، وقد ترتبط بالجزيئات البيولوجية مما يؤدي إلى إتلافها (Jan et al, 2015).

يعد الكاديوم والرصاص من المعادن الثقيلة غير القابلة للتحلل، وقد أدت التطور الصناعي إلى زيادة انتشارهما في كل مكان وفي معظم المواد الاستهلاكية. ويعتبر الصهر والتعدين وتصنيع البطاريات والأصباغ والسيراميك بواعث معروفة للمعدنين. والطرق الرئيسية للتعرض لهما هي الابتلاع والاستنشاق بسبب وجودهما في أوراق التبغ والغذاء والهواء (Andjelkovic et al, 2019). نشرت منظمة الصحة العالمية قائمة من عشر مواد كيميائية مضرّة بصحة الإنسان، منها الكاديوم والرصاص (WHO, 2010). كما رتبت الوكالة الأمريكية لسجلّ المواد السامة والأمراض في قائمة المواد الخطرة حسب خطورتها، حيث يأتي الرصاص في المرتبة الثانية والكاديوم في المرتبة السابعة (ATSDR, 2018).

أجريت العديد من الدراسات على الجسم الحيّ لتحديد الآليات الدقيقة لسمية الكاديوم والرصاص. ومن نتائج التعرض للمعادن الثقيلة بصفة عامّة والكاديوم والرصاص بصفة خاصّة: الإجهاد التأكسدي. فبالرغم من أنّ هذين المعدنين لا يشاركان في تفاعلات فنتون، إلا أنّهما يرتبطان بالأكسجين والنتروجين والكبريت؛ وهذا ما يؤدي إلى التأثير على العديد من الإنزيمات والبروتينات وكذلك التفاعل مع العناصر المعدنية الحيوية، وكذلك تثبيط عملية الموت الخلوي المبرمج، وتغيّرات في الأحماض النووية وتثبيط إصلاح التالف منها؛ مما يؤدي إلى التعبير الجيني الشاذ (Andjelkovic et al, 2019). يوزع كلّ

من الكادميوم و الرصاص بعد الامتصاص عن طريق خلايا الدم الحمراء أو البروتينات بحيث يرتبط جزء كبير من الكادميوم في خلايا الدم الحمراء بالبروتينات عالية الوزن الجزيئي، في حين ترتبط كمية قليلة منه بالهيموغلوبين (Swiergosz-Kowalewska, 2001). أما الرصاص فعند نفاذه للخلية الحمراء فيرتبط معظمه بالهيموغلوبين (Abadin et al, 2007). يتم نقل الكادميوم و الرصاص إلى الكبد، أين يمكن أن يحدث خللا وظيفيا وبنويًا. ويكشف عن ذلك زيادة في نشاط بعض الإنزيمات أو انخفاض نسبة بعض البروتينات (Yuan et al, 2014). كما يسبب المعدن آثارا سامة على الكلى؛ وذلك بإحداث تغييرات بنويّة ووظيفية بها (Abdou and Hassan, 2014). وتأثير هذين العنصرين على الكائن الحيّ بصورة منفردة قد يختلف وهما مجتمعان، وذلك لاحتمال تداخلها سواء عن طريق التضادّ أو التآزر. وقد يكمن التضادّ مثلا في إعاقة امتصاصها لبعضها البعض، سواء بالارتباط بناقل بعضها البعض، أو منع امتصاصها بتكوين مركبات أخرى لا يستطيع الجسم امتصاصها.

تقوم مضادات الأكسدة بصفة عامّة ومضادات الأكسدة الخارجية؛ التي تعدّ من ضمن مكونات بعض النباتات الطبيّة ومنتجات النحل، بمنع إنتاج الأنواع الأكسجينية التفاعلية ROS (Reactive Oxygen Species) أو إزالتها بتنظيم الدفاعات المضادة للأكسدة (Halliwell, 2007).

يعتبر العكبر أحد منتجات النحل المضادة للأكسدة، وقد حدّد أكثر من 300 مكونا للعكبر في عينات مختلفة (Anjum et al, 2018). وتختلف هذه المكونات باختلاف مكان وفترة الإقنتاء ونوع النباتات المنتشرة. ويختلف النشاط البيولوجي للعكبر باختلاف مكوناته. فالمركبات الرئيسية الأساسية المسؤولة عن الأنشطة البيولوجية للعكبر هي البوليفينولات والأحماض العطرية والأحماض التربينية الثنائية، ويرتبط تكوين العكبر أيضا بطريقة الاستخلاص ومعالجات المواد الخام (Wagh, 2013). لقد انتشرت في الآونة الأخيرة - وبشكل واسع- تربية النحل في الجزائر التي تعدّ من الدول ذات الواسع في التضاريس الأخيرة. وتعتبر ولاية جيجل من المناطق المهمة في هذا المجال؛ بحكم تضاريسها الجبلية والغطاء النباتي

المناسب لتربية النحل. وهذا ما شجّع العديد من الباحثين لاختبار فعالية عكبر هذه المنطقة على مختلف الأنشطة البيولوجية، وعلى رأسها نشاط العكبر المضادّ للأكسدة. ومن هذه الدراسات على سبيل المثال لا الحصر Benguedouar وآخرون (2008) و Segueni وآخرون (2016) و Brihoum وآخرون (2018).

لقد أجريت القليل من الدراسات على التأثير المزمن للعكبر على الإجهاد التأكسدي الناتج عن التسمّم بالمعادن الثقيلة وخاصة الكاديوم والرصاص، اللذان يتعرّض لهما الإنسان في صورتها المنفردة أو معا (Andjelkovic et al, 2019).

تمحورت دراستنا حول تأثير المستخلص الفينولي للعكبر على الإجهاد التأكسدي الناتج عن الكاديوم والرصاص في كبد وكلّى الجرذان.

إنّ الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو البحث عن إمكانية التأثير الوقائي للعكبر ضدّ الإجهاد التأكسدي الكبدي والكلوي للجرذان من نوع *Albinos Wistar* والناتج من تناول عن طريق ماء الشرب لكلوريد الكاديوم وخلات الرصاص عند تراكيز سامة.

ومن أهداف هذا البحث أيضا، دراسة مدى التأثير التداخلي على الإجهاد التأكسدي بين عنصري

الكاديوم والرصاص في حالة تمرير ملحيهما معا لمدة ثلاثة أشهر على حيوانات الدراسة.

الدراسة النظرية

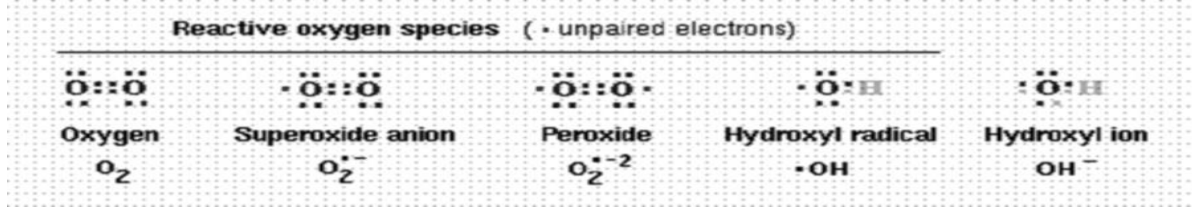
1. الإجهاد التأكسدي

الإجهاد التأكسدي (Oxidative Stress) هو اختلال التوازن بين آليات إنتاج الجذور الحرة (المؤكسدات) وآليات التخلص منها بواسطة مضادات الأكسدة (Sies, 1997). والجذور الحرة عبارة عن ذرات أو جزيئات تحمل على مدارها الخارجي إلكترونًا حرًا أو أكثر، ويمكن أن تتشكل عند تفاعل الأوكسجين مع بعض الجزيئات، وهذا بفقدان أو اكتساب إلكترون أو أكثر لتسلك سلوك مؤكسدات أو مرجعات (Chandrasekaran *et al*, 2017).

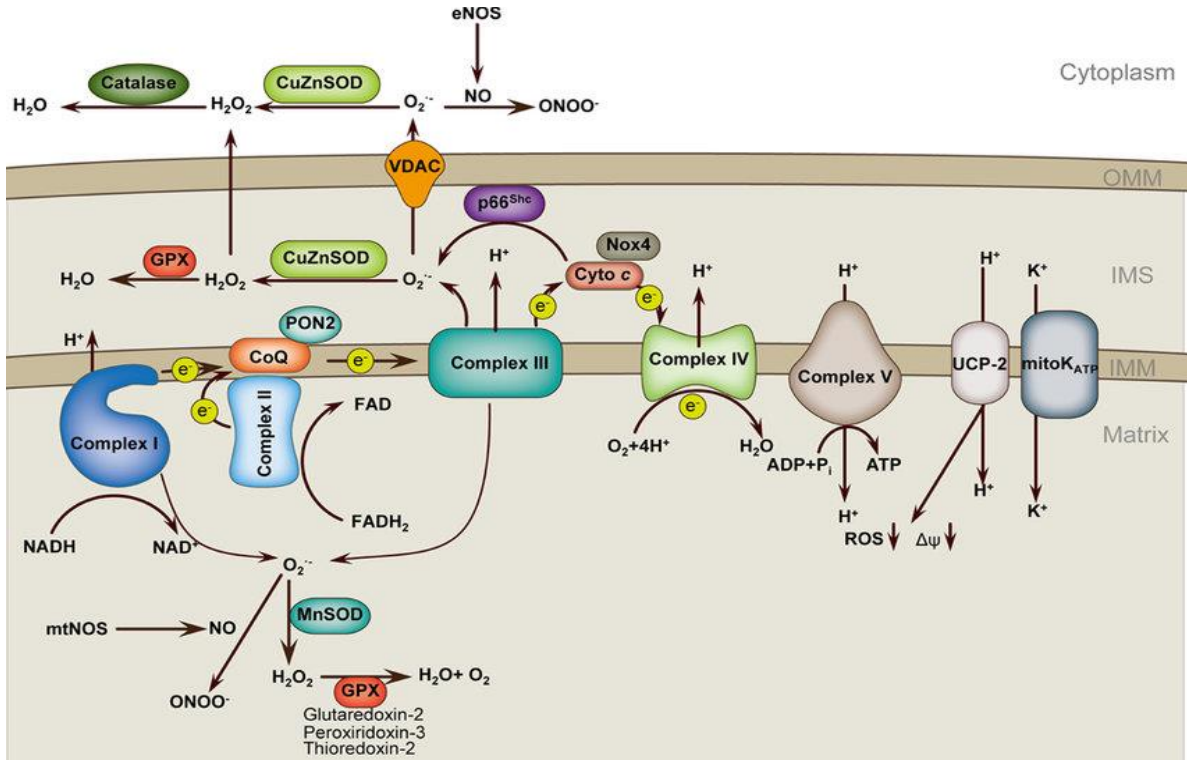
1.1. الأنواع الأوكسجينية التفاعلية ومصادرها

يعتبر الأوكسجين الجزيئي المستقبل النهائي للإلكترونات في كثير من التفاعلات داخل الخلية مما ينتج عنه الأنواع الأوكسجينية التفاعلية الجذرية وغير الجذرية (شكل 1). وتنتج هذه الأنواع الأوكسجينية، والأنواع التفاعلية الأخرى بتركيز منخفضة لاستخدامها من طرف الخلية في المسارات الأيضية، ويراقب هذا الإنتاج بواسطة نظام مضاد للأكسدة (Ursu and Clarkson, 2003).

تنقسم الأنواع الأوكسجينية التفاعلية إلى أولية وثانوية، فالأولية تتكوّن طبيعيًا في العضوية في بعض العضيات الخلوية مثل peroxisomes خلال عمليات البلعمة والانقسام الخلوي والأكسدة الذاتية للعديد من الجزيئات الخلوية، ومنها جذر أنيون فوق الأوكسيد (O_2^- superoxide anion) وجذر الهيدروكسيل (Hydroxyl radical) $\cdot OH$. وعند اكتساب أو فقدان هذه الجذور لإلكترونها الأعزب تتكوّن من الجهة المقابلة الأنواع الأوكسجينية التفاعلية الثانوية مثل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) (Curtin *et al*, 2002). تعتبر المرافقات الإنزيمية المرجعة الناتجة في حلقة كريبس ($FADH_2$ ، $NADH$ ، و $NADPH$) مركّبات عالية الطاقة، وهي مصدر لإلكترونات السلسلة التنفسية، فحوالي 95% من الأوكسجين الميتاكوندري يتحوّل إلى ماء، والباقي يتحوّل إلى O_2^- (شكل 2) (Lee *et al*, 2004).



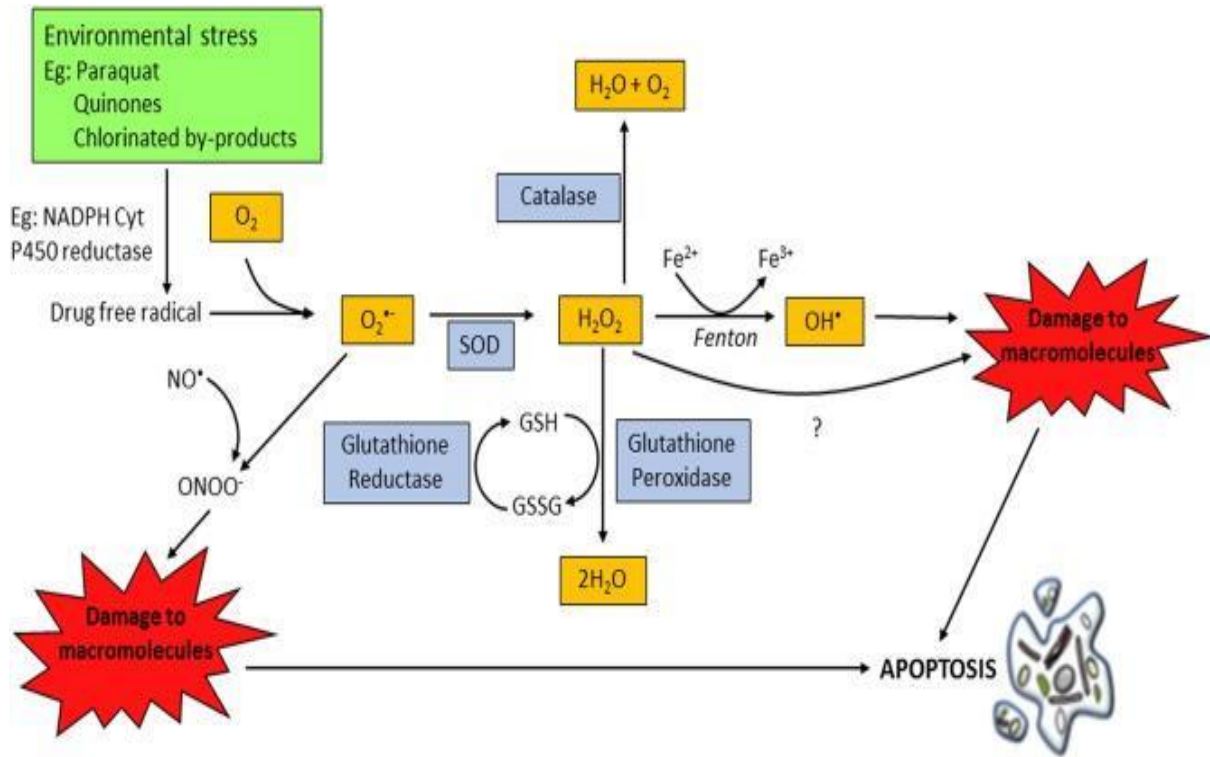
شكل 1. بنى الأنواع الأكسجينية التفاعلية المنتجة في النظم البيولوجية (Bhattacharya, 2015)



شكل 2. تحرير المركبات التفاعلية الأكسجينية في الميتاكوندري (Tang et al, 2014)

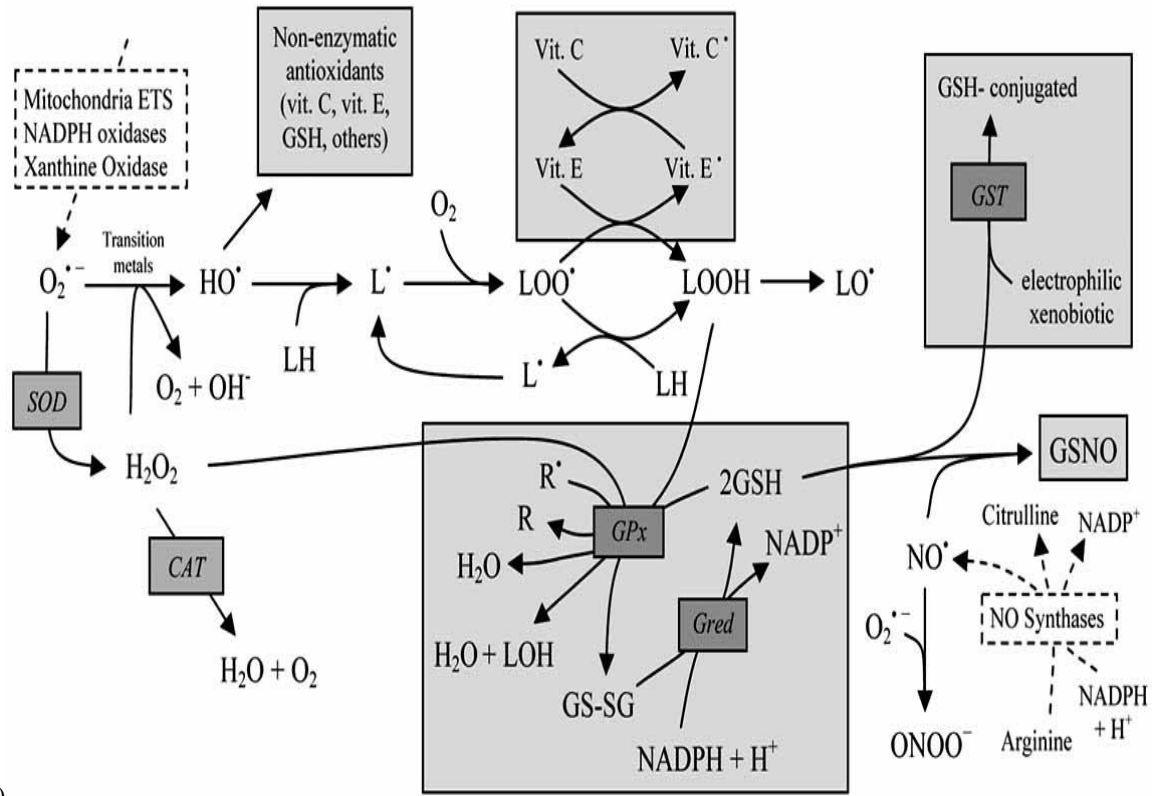
يعدّ جذر فوق الأكسيد في طبيعة العملية التأكسدية داخل الخلية؛ إذ يمكنه أن يتحوّل إلى أنواع أكسجينية أخرى، فهو ينتج عن إرجاع جزيئة الأكسجين باكتساب إلكترون بواسطة إنزيمات NADPH-Oxidase و Cytochrome Oxidase و Xanthine Oxydase و CytP450 (Dalton et al, 1999). ينتشر $\text{O}_2^{\cdot-}$ بسهولة

في الجسم ويتفاعل مع أيون الهيدروجين لينتج عنهما بيروكسيد الهيدروجين. كما يمكن لهذا الأخير أن يتحوّل إلى أيون الهيدروكسيل (OH^-) وجذر الهيدروكسيل ($\text{OH}\cdot$)، وهذا بتفاعله مع أيونات ينشر O_2^- بسهولة في الجسم ويتفاعل مع أيون الهيدروجين لينتج عنهما بيروكسيد الهيدروجين. كما يمكن لهذا الأخير أن يتحوّل إلى أيون الهيدروكسيل (OH^-) وجذر الهيدروكسيل ($\text{OH}\cdot$)، وهذا بتفاعله مع أيونات الحديدوز (Fe^{+2}) أو مع O_2^- . يعتبر جذر الهيدروكسيل من أكثر ROS نشاطا وأقلها استقرارا، ويتفاعل مع العديد من الجزيئات حيث يعمل على إزالة أو إضافة الهيدروجين للروابط غير المشبعة للأحماض الدهنية (شكل 3. و (4) (Birben *et al*, 2012). قد تنتج ROS بفعل عوامل خارجية، وعلى رأسها المعادن الثقيلة خاصة الرصاص والكاديميوم، والتي تؤدي لأكسدة الدهون والتفاعل مع البروتينات والأحماض النووية (Birben *et al*, 2012).



شكل 3. الإنزيمات المشاركة في إزالة المركبات التفاعلية الأوكسجينية والنتروجينية

(Dutordoir, and Averill-Bates, 2016)



شكل 4. التفاعلات المؤدية لتكوين وإزالة مركبات التفاعل الأكسجينية (ROS) (Ferreira et al, 2009).

2.1. أضرار الإجهاد التأكسدي

يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى أضرار بالغة للجزيئات العضوية والتي تضم الأحماض النووية والبروتينات والدهون والسكريات.

1.2.1. أكسدة الأحماض النووية

تمثل الميتاكوندري المصدر الرئيسي لأنواع الأكسجينية التفاعلية ROS؛ فمكوناتها أكثر عرضة للأكسدة، وخاصة حمضها النووي (Silva et al, 2008). وتعتبر أكسدة الحمض النووي مع تحلله وميثلته مؤشرا رئيسيا في عدم استقرار وانحلال الجينوم (Storz et al, 1987). ويعتبر الجوانين من بين القواعد الأزوتية للحمض النووي الريبسي المنقوص الأكسجين، وهو الأكثر عرضة للأضرار التأكسدية. فالنتائج الرئيسية لطفرة الجوانين هو (8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxoG)، والذي يرتبط مع الأدينين، وليس مع السيتوزين، وبالتالي يولد

طفرات تغيير الموقع (Freudenthal *et al*, 2015). وقد يؤدي الإجهاد التأكسدي إلى قطع الرابطة الموجودة بين القاعدة الأزوتية، والسكر الزببي مشكلاً مواقع غير قاعدية (Chiu *et al*, 2011). يخضع الحمض النووي الزببي للأكسدة، فمثلاً التغيرات التأكسدية لـ microRNA-184 تمكّنه من استهداف حمض النووي الرسول الخاص ببروتينات الخلايا للمفاوية من نوع B (Bcl-XI and Bcl-w)، و منع ترجمتها، ممّا يؤدي إلى الموت الخلوي المبرمج (Wang *et al*, 2015).

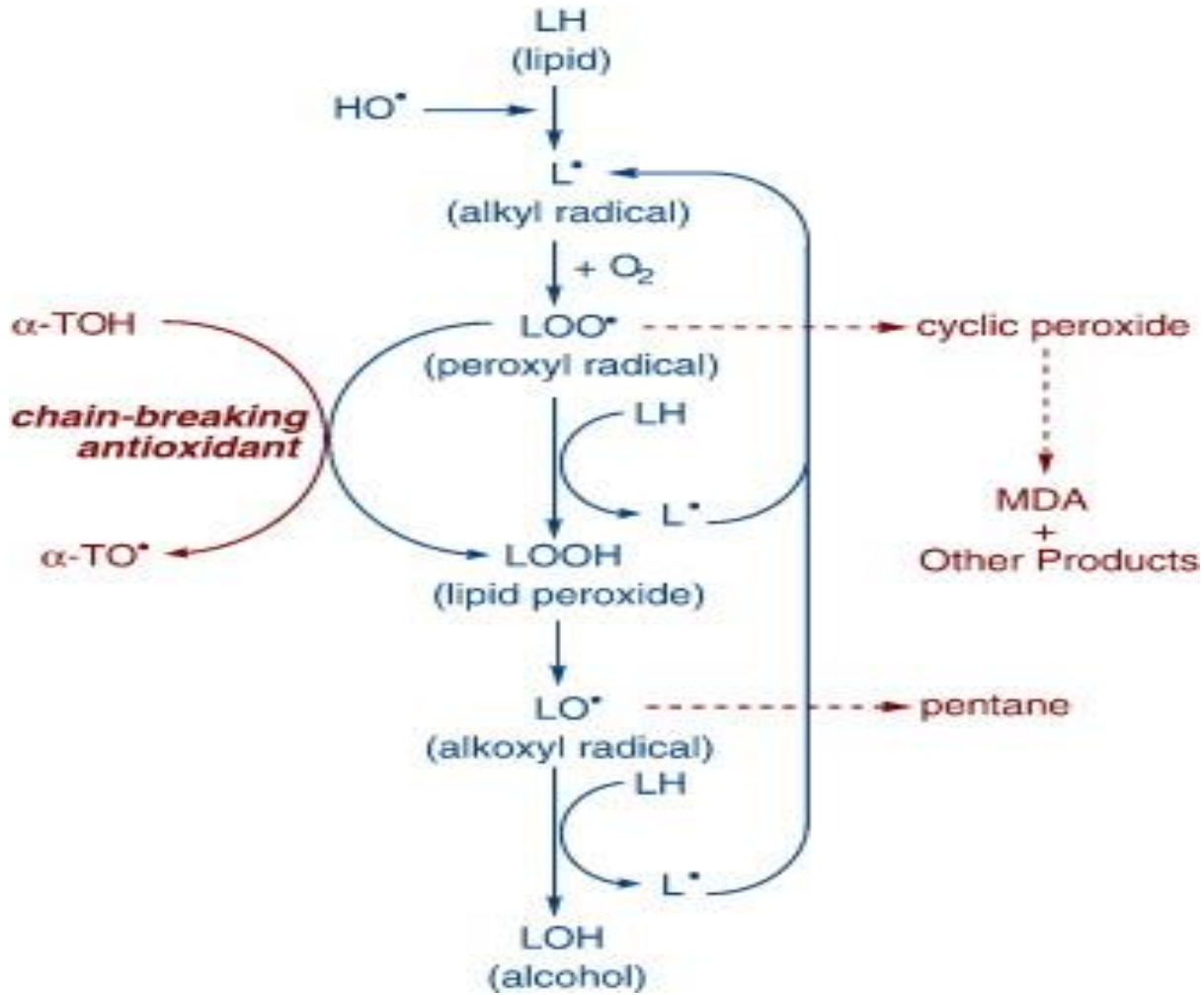
2.2.1. أكسدة البروتينات

تعتبر البروتينات من المكونات السائدة في الخلية؛ لذا فهي هدف من أهداف الجذور الحرّة، إذ تطرأ على الجزيئات البروتينية تغييرات جوهريّة من خلال تفاعلات الأكسدة التي تستهدف الأحماض الأمينية (Negre-Salvayre *et al*, 2008). ترتبط حساسية البروتينات تجاه الجذور الحرّة بطبيعة الأحماض الأمينية المكوّنة لها، حيث إنّ الأحماض الحاملة لوظيفه الثيول (thiol, -SH) أكثر عرضة للأكسدة؛ ممّا يؤدي إلى تشكيل جسور الكبريت الثنائية، كما تؤدي التغيرات التأكسدية في الأحماض الأمينية العطرية إلى قطع سلاسل عديدات الببتيد (Ghezzi *et al*, 2005). تؤدي أكسدة البروتينات إلى حجب مجموعة الأمين المؤيّنّة أو إظهار المناطق الكارهة للماء المركزية، وهذا يؤدي إلى تشكل كتل بروتينية ليبيدية مميزة للأنسجة المسنة (Hutter *et al*, 2007)، فالبروتينات المتغيرة تفقد نشاطها، وخصائصها البيولوجية، وتصبح أكثر عرضة للتحلّل بالإنزيمات (Szweda *et al*, 2002).

3.2.1. فوق أكسدة الدهون

تحتوي الأغشية الخلوية على كميات كبيرة من البروتينات الدهنية، وفوسفوليبيد الأحماض الدهنية غير المشبعة، والتي تكون عرضة للجذور الحرّة مؤدية إلى فوق أكسدة الدهون (Pratt *et al*, 2011)، والتي تتمّ على ثلاثة مراحل (شكل 5) (Sachdev and Davies, 2008).

Mechanism and Products of Lipid Peroxidation



شكل 5. آلية أكسدة الدّهون (Sachdev and Davies, 2008)

المرحلة الأبتدائية: يتشكّل جذر الألكيل (L•, alkyl)، وذلك بفعل جذر $\cdot\text{OH}$ الذي يهاجم الأحماض الدّهنية

غير المشبّعة (LH)، وتنتزع ذرّة الهيدروجين المرتبطة بإحدى ذرتي كربون الرّابطة الثنائية.

مرحلة الانتشار: وهي فوق أكسدة الدّهون، إذ يتأكسد الجذر (L•) في وجود الأكسجين إلى

جذر البيروكسيل (LOO•, peroxy)، وتتبعها تفاعلات متسلسلة، ليتشكل البيروكسيد (LOOH, peroxyd)

والذي عند تفاعله بحمض دهني آخر يتشكل جذر الألكيل من جديد.

المرحلة النهائية: تتوقّف تفاعلات أكسدة الدّهون إمّا بتدخل مركّب مضادّ للأكسدة مثل فيتامين E

لتوقيف

سلسلة فوق الأكسدة، أو بتشكّل جزيئات غير جذريّة بسبب اتّحاد الجذور الحرّة. فينتج عن جذرالبيروكسيل أيضا وعبر سلسلة من التفاعلات مجموعة من الأليدهيدات الدهنيّة النّشطة التي يمكن أن تسهم في عمليّة كرينة البروتين (Hank and Bernlohr, 2016). يمكن للبروتينات الدهنيّة الدمويّة، والفوسفوليبيدات الغشائيّة أن تتعرّض للهجوم التأكسدي لتتحول إلى بروتينات دهنيّة مؤكسدة من نوع LDL، والتي تقتنص من طرف البالعات مشكّلة ترسّبات دهنيّة (Sugamura and Keaney, 2011). كما تسبب فوق أكسدة الدّهون تغيير في ميوعة ونفاذية الأغشية الخلويّة، وبالتالي تغيير وظائف العديد منتسبب فوق أكسدة الدّهون تغيير في ميوعة ونفاذية الأغشية الخلويّة، وبالتالي تغيير وظائف العديد من المستقبلات والنّواقل ونقل الإشارات الخلويّة (Cazzola et al, 2004).

4.2.1. أكسدة الكربوهيدرات

علاقة الكربوهيدرات بالإجهاد التأكسدي متعدّدة، فالأضرار الناتجة عن أكسدة سكرّ الأحماض النوويّة يسبب تكسّر في الخيط النووي. ينتج عن أكسدة الكربوهيدرات الحرّة موادّ مؤكسدة مثل الكريونيل التفاعلي (Robertson, 2004)، وتمثّل عمليّة إضافة السكريّات غير الإنزيميّة المرحلة الأولى من تفاعل مايلار والذي ينتج عنه سكريّات مؤكسدة تتراكم في الأنسجة مع التقدّم في السنّ (Monnier and Ceram, 1981)

3.1. مضادات الأكسدة

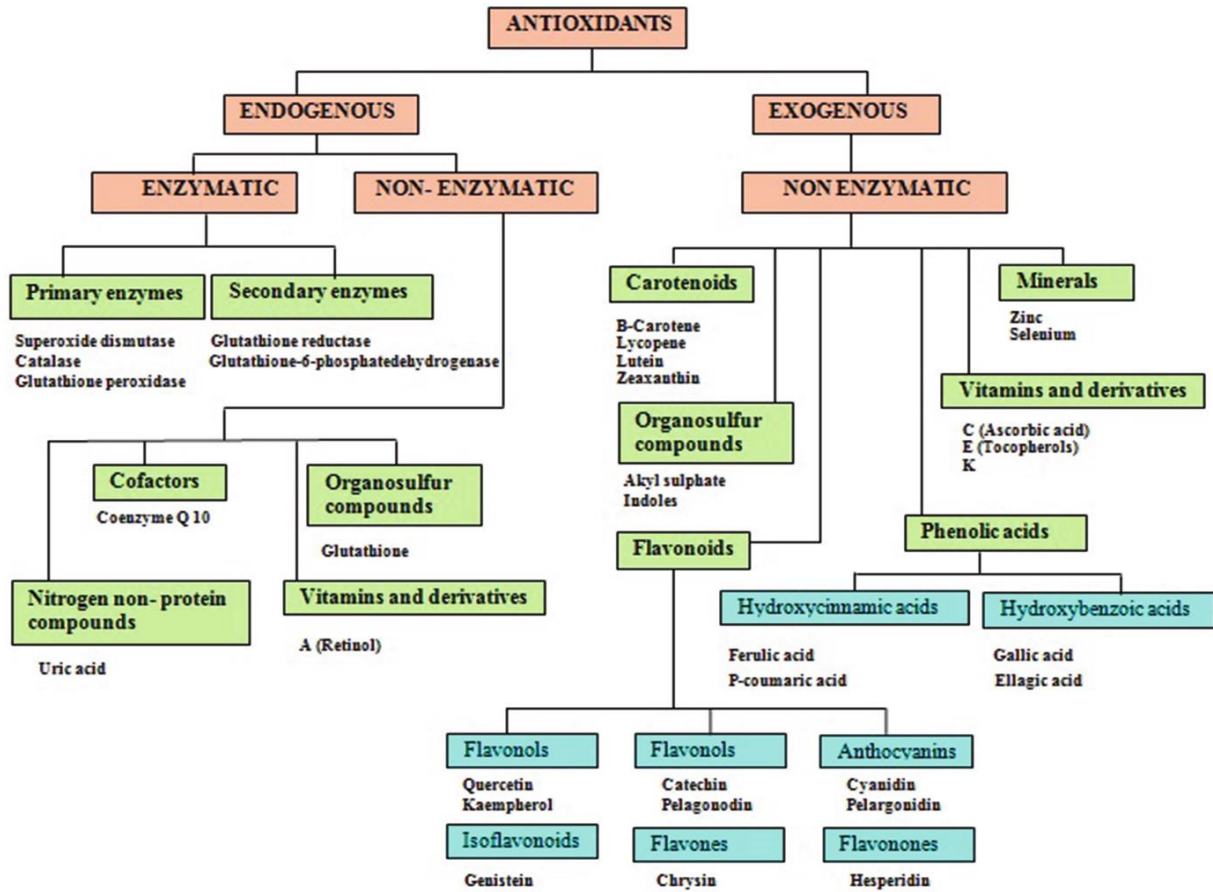
يصنّف النّظام المضادّ للأكسدة إلى مجموعتين رئيسيّتين هما: مضادّات الأكسدة الخارجيّة، ومضادّات الأكسدة الداخليّة التي تصنّف إلى إنزيميّة وغير إنزيميّة (شكل 6) (Kaur et al, 2018).

1.3.1. الجلوتاثيون

هو بروتين ثلاثي الببتيد يحمي الخلايا من الجذور الحرّة، إمّا عن طريق منح ذرّة هيدروجين أو إلكترون. الجلوتاثيون مهمّ جدّا في عمليّة إعادة تجديد مضادّات الأكسدة مثل حمض الأسكوربيك (Henegouwen and Steenvoorden, 1997). يقاوم الجلوتاثيون التخلّل المائي بواسطة معظم الإنزيمات المحلّلة للبروتين باستثناء إنزيم ناقل الببتيد جاما جلوتاميل (γ-glutamyltransferase, GGT)، والإنزيمات من عائلة ChaC. الجلوتاثيون مهمّ جدّا في عمليّة إعادة تجديد مضادّات الأكسدة مثل حمض الأسكوربيك (Henegouwen and Steenvoorden, 1997). يقاوم الجلوتاثيون التخلّل المائي بواسطة معظم الإنزيمات المحلّلة للبروتين باستثناء إنزيم ناقل الببتيد جاما جلوتاميل (γ-glutamyltransferase, GGT)، والإنزيمات من عائلة ChaC. يتواجد إنزيم GGT على الوجه الخارجي للغشاء البلازمي، وهو ينزع γ-glutamyl من الجلوتاثيون وتحرير dipeptide cysteinylglycine (Ohkama-Ohtsu *et al*, 2007). يراقب هدم الجلوتاثيون بواسطة GGT، ويتمّ تحليل cysteinylglycine بـ dipeptidase، ممّا يؤدي إلى دخول الأحماض الأمينيّة الحرّة إلى الخليّة للسماح بإنتاج GSH من جديد (Gauche *et al*, 2018). في الحالة الطبيعيّة تبلغ النسبة بين شكلي الجلوتاثيون المرجع والمؤكسد (GSH / GSSG) 98% وهي مؤشر يستدلّ به على درجة الإجهاد التأكسدي. يقوم الجلوتاثيون المرجع GSH بدور مضادّ للأكسدة، وذلك بقنص الإلكترونات و ROS و RNS سواء بطريقة مباشرة أو عن طريق التنشيط الإنزيمي، فالجلوتاثيون المرجع يقتنص جذور الهيدروكسيل الحرّة المتفاعلة والجذور الحرّة الأكسجينيّة الأخرى والجذور المرتبطة بالحمض النووي، وكذلك على جزيئات حيويّة أخرى، كما يقوم GSH بدور مساعد مادّة التفاعل لإنزيم glutathione peroxidase، ممّا يسمح بخفض البيروكسيدات وإنتاج GSSG. في المقابل، يتمّ اختزال GSSG إلى جزيئتين من الجلوتاثيون المرجع GSH، وذلك في وجود كل من NADPH، وإنزيم glutathione disulfide reductase (Gauche *et al*, 2018). تهدف عمليّة توازن الأكسدة/الإرجاع الخلوية بشكل عامّ إلى الحفاظ على الأكسجين التفاعلي

وأنواع النيتروجين الضارة و GSSG عند مستويات منخفضة جدًا و GSH على مستوى عالٍ. ويمكن للجوتاثيون أن يقوم بدور مولد الأكسدة وهذا عند انخفاض مستواه إلى حدٍ أدنى، ويحدث ذلك خلال هدم

GSH بفعل التحفيز بواسطة إنزيم GGT (Dominici et al, 2005 ؛ Paolicchi et al, 2002).



شكل 6. أقسام مضادات الأكسدة (Kaur et al, 2018)

2.3.1. الفلافونويدات والأحماض الفينولية

الفلافونويدات هي مجموعة مضادة للأكسدة، تشترك في تركيبها الهيكلي (البروبان ثنائي الفينيل). تكتسب قدرتها المضادة للأكسدة من مجموعات الهيدروكسيل الفينولية، و تعمل كعوامل مرجعة واهبة للهيدوجين ومزيلة للأكسجين الأحادي وجذور الأكاسيد، و كمخربات للمعادن، وتعمل الإنزيمات المضادة للأكسدة وإرجاع جذور التوكوفيرول وتثبط الإنزيمات المؤكسدة وتخفيف الإجهاد بـ RNS وزيادة مستويات

حمض

اليوريك والجزئيّات المنخفضة الوزن الجزيئي (Prochazkova *et al*, 2011). تشمل الأحماض الفينولية أحماض hydroxycinnamic و hydroxybenzoic. لها نشاط مضادّ للأكسدة، فهي تعمل كمخلب للمعادن ومزيله للجذور الحرّة، وخاصّة فعاليّتها العالية ضدّ أنواع عديدة من الجذور الحرّة (Krimmel *et al*, 2010؛ Terpinc *et al*, 2011).

2. الرصاص والكاديوم

تعد الآثار الصحية الضارة الناتجة عن التعرض للمعادن الثقيلة السامة، مسألة خطيرة ومقلقة. ويعدّ الرصاص والكاديوم من أكثر المعادن سميّة، ووفرة في البيئة، والتعرض لهما يؤدي إلى سميّة خلوية تآزرية وقد تكون في بعض الأحيان متضادة، لأنّ التعرض إلى خليط عالي من هذين المعدنين قد يعزّز آليات الدفاع الخلوية (Bae et al, 2001 ؛ Phillips et al, 2003)، كتحريض تصنيع الميتالوثيونين (MT) عند التعرض للكاديوم. فالمصادر المشتركة للمعدنين متنوّعة في الطبيعة، وتشمل العمليات الطبيعية، والبشرية (Phillips et al, 2003 ؛ Patra et al, 2005 ؛ Swarup et al, 2005 ؛ Patra et al, 2007).

1.2. الرصاص

ينتقل الرصاص بعد الامتصاص إلى الدم ثم يتراكم في كريات الدم الحمراء، بينما تقل نسبته في البلازما (أقل من 1%)، ويمكن تفسير هذه النسبة العالية من الرصاص في كريات الدم الحمراء بألفته العالية لانزيم ALAD (δ- aminolevulinic acid dehydratase) (Kelada et al, 2001). حيث إنّ شراهة الرصاص لهذا البروتين تفوق شراهة الزنك له بـ 20 مرّة، وبالتالي يمكن للرصاص أن ينوب عن الزنك في مواقع ارتباطه، ومن ثمّ التأثير على وظائف هذا الإنزيم. على الرغم من ارتباط ALAD بحوالي 80% من رصاص كرات الدم الحمراء، إلا أنّ كمياته محدودة، وإذا استمرت مستويات الرصاص في كريات الدم الحمراء في الزيادة، فإنّ الرصاص يرتبط بـ pyrimidine 5'-nucleotidase، وهو مركّب آخر ذو شراهة للرصاص. على عكس غالبية العوامل السامة، فكريات الدم الحمراء تعتبر وسيلة نقل للرصاص وهدف لسميته (Bergdahl et al, 1998).

1.1.2. الرّصاص والإجهاد التأكسدي

الآلية الجوهريّة الكامنة وراء الأضرار التأكسديّة على الأغشية الخلويّة الناتجة عن الرّصاص ترتبط بتغيير في تركيب وطول سلسلة الأحماض الدهنيّة. وعدم تشبّع الأحماض الدهنيّة هو المحدّد لقابليّة الغشاء للأكسدة، فالرّصاص يؤدّي إلى استطالة حمض الأراشيدونيك الذي يمكن أن يكون السبب في الغشاء للأكسدة، فالرّصاص يؤدّي إلى استطالة حمض الأراشيدونيك الذي يمكن أن يكون السبب في تنشيط عملية فوق الأكسدة للدّهون الغشائية (Patra et al, 2011).

يؤدّي ارتباط (δ-aminolevulinic acid, ALA) بالرّصاص إلى تحفيز توليد ROS (Bechara, 1996). فأكسدة ALA ينتج عنها حمض 4,5-dioxovaleric، وهو عامل أكلة لشوارد quinine في كلّ من النيكلوزيد والحمض النّوي (Douki et al, 1998). التأثير على أنظمة الدفاع المضادّة للأكسدة للخلايا هي الآلية الثّانية للإجهاد التأكسدي بالرّصاص. يقوم الرّصاص بتغيير الأنشطة المضادة للأكسدة عن طريق تثبيط المجاميع الوظيفية (-SH) في العديد من الإنزيمات مثل ALAD و SOD و CAT و GPx و G6PD (Patra et al, 2011).

تعتمد معظم الإنزيمات المضادّة للأكسدة على العناصر المعدنيّة النّادرة الأساسيّة لبنيتها الجزيئيّة ولنشاطها (Patra et al, 2011). فيؤدّي الرّصاص إلى خفض امتصاص السيلينيوم وذلك بارتباطه بـ GPx (Schrauzer, 1987). فتناول السيلينيوم قبل التعرّض للرّصاص يؤدّي إلى وقاية معتبرة ضدّ الإجهاد التأكسدي النّاتج عن الرّصاص، وذلك عن طريق زيادة كلّ من نشاط إنزيمي SOD و GR وتركيز GSH (Othman and El Missiry, 1998). كما يمكن للرّصاص أن يثبّت الزنك في موقعه في الإنزيمات المضادّة للأكسدة، وبالتالي تثبيطها (Flora et al, 2007). وتعود سميّة الرّصاص أيضا إلى قدرته على أخذ مكان الكاتيونات الأحادية والثنائيّة مثل أيونات الصوديوم والكالسيوم، وبالتالي تأثيره على الوظائف البيولوجيّة المهمّة في العضوية (Lidsky and Schneider, 2003). وقدرة الرّصاص على المرور من خلال الحاجز دموي الدماغي، يرجع

أساسا إلى قدرته على استبدال أيونات الكالسيوم، فعلى المستوى الجزيئي، وبعد استبدال أيونات الكالسيوم، يسهم الرّصاص في العجز العصبي، ويصبح قادرا على عبور هذا الحاجز ، و نراكمه في الخلايا النّجمية الدبقية مانعا تشكيل غمد المايلين (Carocci *et al*, 2016).

2.1.2. الآثار التأكسدية للرصاص على الكبد

السمية الكبدية بالرصاص تؤدي إلى ارتفاع في مستويات إنزيمات (aspartate aminotransfer, AST) ، (Omobowale *et al*, 2014) (alkaline phosphatase, ALP؛ alanine aminotransferase, ALT) واضطراب في استقلاب الكوليسترول الكبدية (Abdou and Hassan, 2014). يعتبر الكبد من الأعضاء الرئيسية المستهدفة بالإجهاد التأكسدي الناتج عن الرصاص. و يؤدي الرصاص إلى انخفاض في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة في مستوى GSH (Abdou and Hassan, 2014).

تعتبر فوق أكسدة الدهون من أهم آثار الإجهاد التأكسدي الناتج عن الرصاص (Omobowale *et al*, 2014)، ويؤدي ذلك إلى تغيير في بنية الأحماض الدهنية ومن ثم إلى خلل في تماسك الغشاء الخلوي (Lawton and Donaldson, 1991)، ويرافق ذلك زيادة مستوى MDA في الكبد (Liu *et al*, 2012). هناك أدلة على أنّ الإجهاد التأكسدي الناتج عن الرصاص قد يؤدي إلى تلف في الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين وموت خلوي مبرمج؛ وذلك بسبب التعبير المرتفع لـ p53 واختلال التوازن النسبي بين Bax و Bcl-2 (Xu *et al*, 2008).

إنّ إنتاج ROS في الميتاكوندري ومهاجمتها للفسفوليبيدات الغشائية يؤدي إلى خلل في نفاذية الغشاء الميتاكوندري ومن ثمّ تنشيط بروتين الكاسباز 3 (caspase 3) وهذا ما يؤدي إلى تنشيط آلية الموت الخلوي المبرمج (Wang *et al*, 2007).

3.1.2. الآثار التأكسدية للرصاص على الكلى

يمكن تصنيف الخلل الكلوي الناجم عن الرصاص على أنه اعتلال كلوي حادّ ومزمن، ويحدث في الغالب عند التعرّض لمستويات عالية من الرصاص. يتميز اعتلال الكلية الناجم عن الرصاص الحادّ وظيفيًا من خلال عجز عام لآليات النقل الأنبويّة (متلازمة فانكوني Fanconi)، وشكليًا من خلال ظهور تغيرات تنكسية في الظهارة الأنبويّة، وتشكل جسيمات نوويّة تحتوي على معقدات البروتين والرصاص (Matović *et al*, 2015). وقد تمّ الكشف عن الإجهاد التأكسدي الناجم عن الرصاص في الكلى، ليس فقط في التجارب المخبرية والتجارب على الحيوانات، ولكن أيضًا في العديد من الدراسات على العمال الذين تعرّضوا للرصاص في مواقع عملهم (Ahamed and Siddiqui, 2007؛ Gurer-Orhan *et al*, 2004) والتي تبين الإجهاد التأكسدي الكلوي الذي يسببه التسمم الحاد بالرصاص عند الحيوانات، وقد سجّل Sharma و Singh (2014) أنّ التعرّض لخلات الرصاص يسبب زيادة في محتوى المواد الكلويّة المتفاعلة مع حمض الثيوباربيتوريك (Thiobarbituric acid, TBA) كمؤشر على فوق أكسدة الدّهون، وكذلك زيادة في نشاط SOD و CAT في كلى الفئران. يؤدّي التعرّض لفترة طويلة للرصاص إلى توليد الجذور الحرّة، ومن ثمّ فوق أكسدة الدّهون في الكلى ثمّ إلحاق الضّرر بالأغشية البلاسميّة لخلايا الأنبيبات الكلويّة (Aziz *et al*, 2012؛ Sharma and Singh, 2014).

يمكن أن تؤدّي المستويات المرتفعة من ROS الناتجة عن التعرّض للرصاص إلى خلل في النظام المضادّ للأكسدة. وقد أظهرت العديد من الدراسات أنّ الرصاص يغيّر نشاط الإنزيمات المضادّة للأكسدة وفي مستوى GSH (Matović *et al*, 2015). التعرّض للرصاص يؤدّي إلى انخفاض كبير في نشاط الإنزيمات المضادّة للأكسدة في الأنسجة الكلويّة (Abdel Moniem *et al*, 2011؛ Farmand *et al*, 2005؛ Lakshmi *et al*, 2013؛ Sharman *et al*, 2010؛ Wang *et al*, 2012). يمكن أن تكون آليات تأثيرات الرصاص على هذه الإنزيمات معقدة؛ لأنّ الرصاص يمكن أن يمنع بشكل تنافسي امتصاص المعادن الحيويّة، و تحلّ

محلّها في المواقع النّشطة للإنزيمات أو ترتبط بمجموعات SH-البروتينات (Wang ؛ Lakshmi *et al*, 2013) ،
 مع الأخذ بعين الاعتبار العلاقات بين GST، وGSH في نظام الأكسدة/الاختزال، فإنّ
 الانخفاض المتزامن الملحوظ في كلّ من نشاط GST، وتركيز GSH قد يشير إلى أنّ الانخفاض في
 تركيز GSH الكلي يمكن أن يكون على الأقلّ جزئياً، نتيجة لانخفاض في نشاط GST (Matović *et al*,
 2015). فالتعرّض لفترة طويلة للرّصاص يمكن أن يسبّب زيادة كبيرة في نشاط SOD، و CAT في كلى
 الحيوانات التجريبية (Farmand *et al*, 2005؛ Vaziri *et al*, 2003)، فقد تمثل الزيادات المسجّلة في
 أنشطة CuZn-SOD، و CAT عند الجرذان المعرّضة للرّصاص استجابة تعويضية للإجهاد التأكسدي،
 فالتعرّض للرّصاص لفترة طويلة يؤثّر على التعبير الجيني (Femand *et al*, 2005).
 بالإضافة إلى الإجهاد التأكسدي كآلية لسمية الرّصاص في الكلى، أظهرت الدراسات التجريبية أنّ
 التعرّض للرّصاص يؤدّي إلى زيادة في موت الخلايا المبرمج ليس فقط في الكبد، ولكن في الكلى أيضاً.
 فقد بيّن Sujatha وآخرون (2011) أنّ تعريض الجرذان لخلاّات الرّصاص لمدة 12 أسبوعاً زاد بشكل
 كبير من عدد أجسام التّموت المبرمج (apoptotic bodies) في الأنبيبات القريبة، و بهذا يفترض أنّ
 التسمّم بالرّصاص يؤثّر على التعبير الجيني للبروتينات المشاركة في عملية الموت الخلوي المبرمج ()
 (Matović *et al*, 2015).

2.2. الكادميوم

بعد الامتصاص ينتقل الكادميوم إلى الدّم، ويرتبط بأغشية الكريات الحمراء والألبومين والميتالوثيونين،
 ويوزّع إلى جميع أنحاء الجسم. ويمكن أن يرتبط أيضاً بالبروتينات المحتوية على مجاميع SH- مثل
 الجلوتاثيون والسيستئين (Zalups and Ahmad, 2003). ينتقل الكادميوم بعد التسمم الحاد إلى الكبد. أمّا
 أثناء التعرّض له لفترة طويلة فإنّه يحقّز إنتاج الميتالوثيونين في العديد من الأنسجة، ويرتبط الكادميوم
 بهذه البروتينات الصغيرة، وينتقل إلى الكلى حيث يتمّ ترشيحها من خلال الغشاء الكبيبي، ثمّ يعاد

امتصاصه في خلايا الأنبيبات القريبة، ويترسّب في الكليتين، ومن ثمّ فإنّ التعرّض لفترة طويلة للكاديوم يؤدّي بالكلية إلى الحالة الحرجة (Nordberg and Nordberg, 2000).

1.2.2. الكاديوم والإجهاد التأكسدي

يسبّب الكاديوم في الجسم الحي إنتاج أنيونات O_2^- و H_2O_2 و $OH\cdot$ ، والتي غالباً ما تكون مرافقة بتفعيل نسخ العوامل الحساسة للأكسدة/الإرجاع (مثل NF- κ B و AP-1 و Nrf2)، مما يؤدي إلى خلل في التعبير الجيني بسبب ارتباط ROS بالجينات، ومع ذلك فالدليل المباشر على الإجهاد التأكسدي خلال فترة طويلة غامض وعند الظروف البيئية أين يكون تركيز الكاديوم منخفض. فالأذى الذي يلحق التعبير الجيني المرتبط بالجذور الحرّة خلال التعرّض المزمن بالكاديوم أقلّ معتبرا في حالة التسمّم الحادّ بالكاديوم، وهذا ربما يرجع لتحفيز آليات التكيف مثل الإفراط في التعبير من الميتالوثيونين والجلوتاثيون بعد التعرّض المزمن للكاديوم، وهذا ما يؤدّي إلى تخفيض أثر الكاديوم لتوليد الإجهاد التأكسدي. ففي التعرّض الخلوي المزمن للكاديوم لوحظت إشارات منخفضة لـ ROS بواسطة اختبارات الفلورة، والمقاومة ضدّ الموت الخلوي المبرمج، وتكاثر الخلايا بالرغم من الأضرار الكامنة في الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين، ويرجع ذلك إلى نشوء أو تكوّن الأورام، فعناصر ROS الناتجة عن التسمّم الحاد بكميّات عالية من الكاديوم تلعب دورا كبيرا في إتلاف الأنسجة. أمّا التكيف أثناء التعرّض المزمن للكاديوم فيقلّل من إنتاج ROS، ولكن التحمّل المكتسب تجاه الكاديوم مع التعبير الجيني الشاذ يلعبان دورا في التسمّم المزمن بالكاديوم وفي التسرطن (Patra et al, 2011).

إنّ الآليات الأساسية للتسرطن بالكاديوم تشمل تنظيم جيني للجينات المسببة للسرطان (Hanahan and Weinberg, 2000) والإجهاد التأكسدي (Stohs et al, 2000) وتحلّل أو تفكك الكاديرين وتثبيط إصلاح DNA وعرقلة الموت الخلوي المبرمج (Shih et al, 2004).

إنّ التعرّض الحادّ أو المزمن للكاديوم يسبّبان ارتفاع فوق أكسدة الدّهون في الرئة والدماغ والكلية والكبد وكریات الدم الحمراء والخصيتين. فإنتاج وتراكم ROS تثبّط سلسلة النقل الإلكتروني في الميتوكوندري. وبصفة عامّة فإنّ ROS المتراكمة تشمل H_2O_2 و OH^- و $O_2^{\cdot-}$ و الهيدروبيروكسيدات الدهنية، فالإفراط في إنتاج ROS يخلّ بالتوازن بين ROS والمواد المضادة للأكسدة في الخلايا (Patra *et al*, 2011).

2.2.2. الآثار التأكسدية للكاديوم على الكبد

إنّ آلية السميّة الكبدية الحادة بواسطة الكاديوم محلّ تركيز الدّراسات التجريبيّة على سميّة الكاديوم، وعلى الرّغم من عدم اليقين يمكن افتراض أنّ السميّة الكبدية الحادة تكون على مسارين. تتضمن آليات الإصابة الأولى لخلايا الكبد، وذلك بارتباط الكاديوم بمجاميع -SH، ممّا يؤدي إلى تغيّر في نفاذية الميتوكوندري وخلل في وظيفتها، من خلال الإجهاد التأكسدي الناتج عن التسمّم الحادّ بالكاديوم، ومن ناحية أخرى، فإنّ الإصابة الثانوية الناجمة عن التعرّض الشديد للكاديوم هي نتيجة لعملية التهابية بواسطة تنشيط خلايا Kupffer الكبدية مع إطلاق السيتوكينات والكيموكينات. كما أنّ المستويات الكبدية من الميتالوثيونين والجلوتاثيون تؤثر على الإصابة الأولى وحدّتها أثناء السميّة الكبدية الحادة بالكاديوم

(Rikans and Yamano, 2000). يؤدي الكاديوم إلى زيادة معتبرة في مستوى MDA الكبدية، وانخفاض

في مكونات النظام الانزيمي والبروتيني المضاد للأكسدة (GSH-Px و CuZn-SOD و Mn-SOD و CAT و

GSH) (Liu *et al*, 2011؛ Casalino *et al*, 2002). يمكن أن تعزى فوق أكسدة الدّهون ليس فقط إلى

اضطرابات في حالة مضادات الأكسدة، ولكن أيضا للتغيرات في محتوى الحديد في الكبد، حيث تمّ إظهار

الارتباط الإيجابي بين مستويات MDA، ومحتوى الحديد في الكبد. فقد يحلّ الكاديوم محلّ الحديد المرتبط

بالبروتينات السيتوبلازمية والغشائية، وبالتالي يعزّز تركيز هذا المعدن تحرير مفرط لـ ROS، ويلعب

طريق تمرير الكادميوم دورا في شدة وفترة ظهور علامات الإجهاد التأكسدي (Matović *et al*, 2012). بالإضافة إلى دور ROS في الحثّ على الإجهاد التأكسدي فإنّ لـ RNS دورا في ذلك أيضا بحيث يتمّ إنتاج NO في حالة الإجهاد التأكسدي الناتج عن الكادميوم (Dkhil *et al*, 2014). دور ROS في الحثّ على الإجهاد التأكسدي فإنّ لـ RNS دورا في ذلك أيضا بحيث يتمّ إنتاج NO في حالة الإجهاد التأكسدي الناتج عن الكادميوم (Dkhil *et al*, 2014). يؤدّي التعرّض المزمن للكادميوم إلى تراكمه في الكبد، وتسببه في الإصابة الكبدية ومن أسباب ذلك حدوث تفاعلات مباشرة للكادميوم مع عناصر معدنية حيوية مهمّة لوظائف الإنزيمات المضادّة للأكسدة، وكذلك من خلال قلّة توافر هذه العناصر الحيوية نتيجة لشل حركتها عن طريق ارتباطها ببروتين الميتالوثيونين الذي ينتج بشكل مفرط في وجود الكادميوم (Jihen *et al*, 2011). قد يؤدّي التسمّم بالكادميوم بتراكيز عالية ولفترة طويلة إلى عودة بعض معايير الإجهاد التأكسدي إلى طبيعتها، وقد يعود ذلك إلى تحريض الجينات الخاصة بجزيئات المضادة للأكسدة (Wu *et al*, 2012). يمكن أن تؤدّي ROS إلى الموت الخلوي المبرمج، فعناصر ROS الناجمة عن الكادميوم قد تكون السبب في موت الخلايا المبرمج من خلال تحريض أكسدة دهون غشاء الميتوكوندري أو عن طريق تغييرات في التعبير عن البروتينات الميتاكوندرية المضادة للموت الخلوي المبرمج (Wang *et al*, 2014). ومن الآليات المقترحة لتنشيط الكادميوم للموت الخلوي المبرمج هو تنشيطه لعملية إعادة ترتيب أو إصلاح الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين (Liu *et al*, 2012).

3.2.2. الآثار التأكسدية للكادميوم على الكلى

يسبّب الكادميوم سمية كلوية مرفقة بأضرار على مستوى الأنبيبات القريبة والجزء الكبيبي، يتبعها تسرّب البروتينات منخفضة الوزن الجزيئي والأحماض الأمينية والبيكربونات والجلوكوز والفوسفات مع البول (Nordberg *et al*, 2009).

يؤدي التسمم الحاد بالكاديوم عموماً إلى تثبيط نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة SOD و CAT و GPx. فقد لوحظ في دراسات على الجرذان والفئران انخفاض في نشاط الإنزيمات الكلوية CuZn-SOD و SOD الكلية و CAT، ويمكن أن يحدث انخفاض في نشاط CuZn-SOD، و Mn-SOD الكلوية كنتيجة للمنافسة بين الكاديوم والمعادن الحيوية كالتحاس والزنك للارتباط ببروتينات النقل.

الكلية هي العضو المستهدف من التعرض لفترات طويلة للكاديوم، كما أنّ العديد من الملاحظات التجريبية تثبت وجود خلل وظيفي في الكلى بعد التعرض تحت الحاد والمزمن للكاديوم. فقد أكدت الدراسات التجريبية وجود مستويات متزايدة من (TBARS / MDA) في كلى الحيوانات المعرضة للكاديوم بواسطة طرق مختلفة، وفترات زمنية مختلفة (Dkhil *et al*, 2014؛ Jurczuk *et al*, 2004؛ Matović *et al*, 2013؛ Renugadevi and Prabu, 2009, 2010؛ Morales *et al*, 2006؛ Matović *et al*, 2015). تشير هذه الدراسات إلى أنّ فوق أكسدة الدهون في كلى الحيوانات المعرضة للكاديوم يحدث متأخراً ((Matović *et al*, 2015)، ويعود ذلك إلى أنّ تحرير الكاديوم في الكلى لا يتمّ إلاّ بعد تحلل معقد الميتالوثيونين والكاديوم. وقد اقترح ((Klaassen *et al* 2009)، استناداً إلى النتائج التجريبية، أنّ السمية الكلوية بالكاديوم سببها تراكم الكاديوم غير العضوي وليس الكاديوم المرتبط بالميتالوثيونين. يعتبر ضعف نظام الدفاع المضادّ للأكسدة أيضاً من الأسباب المهمّة في السمية الكلوية بالكاديوم فسجلت العديد من الدراسات انخفاض مستويات مضادات الأكسدة الإنزيمية في كلى الحيوانات المعرضة للتسمم بالكاديوم لفترات طويلة (Casalino *et al*, 2002)، وذلك بارتباط الكاديوم بمجاميع -SH، وإزاحته للعناصر المعدنية الحيوية من المواقع النشطة للإنزيمات (Renugadev and Prabu, 2009). لقد أظهرت العديد من الدراسات أنّ التعرض لفترة طويلة للكاديوم يؤدي إلى زيادة في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة، وخاصّة في الكلى (Djukić –Ćosić, 2011)، وانخفاض ملحوظ في مستويات مضادات الأكسدة غير الإنزيمية GSH، و TSH (Renugadevi and Prabu, 2009؛ Dkhil *et al*, 2014)، ويمكن أن يترافق هذا مع تضؤل

توافر NADPH المطلوب لتحويل الشكل المؤكسد للجلوتاثيون إلى الشكل المرجع (Deneke, 2000). تسبب الزيادة في تراكم ROS الناتجة عن السمم بالكاديوم الموت الخلوي المبرمج والنخر الخلوي (et al, 2015) (Matović).

3.2. الآثار التأكسدية للكاديوم والرصاص على الكبد والكلية

تشير دراسات مختلفة على أنّ التأثير التأكسدي لمعدني الكاديوم والرصاص يختلف باختلاف تركيز المعدنين ونسبة كلّ عنصر، فاختلّت نتائج الدراسات باختلاف معطياتها، فمنها ما سجّلت تضاداً بين التأثير التأكسدي للمعدنين، ومنها ما أشارت إلى تآزر المعدنين في إلحاق الضرر التأكسدي (Pandya et al, 2010؛ Pillai and Gupta, 2005). ممّا يدلّ على أنّ الآليات المختلفة خلال الامتصاص والتوزيع تكمن وراء هذه التداخلات مع الدور المهمّ للجزيئات الناقلة. ففي دراسة (Dai et al (2013) على الجرذان المعاملة بمزيج المعدنين، وبفحص تعبيرات الجين MT-1 و MT-2 في الكبد والقشرة الكلوية أظهرت زيادة معتبرة في تعبيرها. ففسّر تنشيط الأنظمة الدفاعية من خلال التأثير المضادّ للأكسدة للميتالوثيونين الذي يحتوي على السيستئين لانتاج الجلوتاثيون وعن طريق نسخ MT mRNA، وهذا استجابة لتأثيرات ROS.

وفي دراسة Wang وآخرون (2010) سجّلت زيادة ملحوظة في مستوى MDA في كلّ من الجرذان التي تعرّضت لمزيج المعدنين بالمقارنة مع تأثيرات التعرّض لمعدن واحد على وجود تأثير تآزري بين المعدنين في الكليتين، وقد تأكّدت هذه الملاحظات من خلال تحاليل البنية التركيبية الفائقة التي تشير إلى حدوث أضرار شديدة، وبدرجة أعلى في الميتوكوندري الكلوية أثناء ترافق المعدنين مقارنة بتأثيرات المعدنين في صورتها المنفردة (Wang et al, 2010). إنّ التعرّض لكلا المعدنين يؤدي إلى تنشيط أكسدة البروتينات بإنتاج كمية زائدة من الكربونيلات مقارنة بكميّتها في حالة التعرّض لكلّ معدن على حدى (Fowler et al, 2004). لقد أكّدت الدراسات على أنّ الكاديوم والرصاص يسببان الإجهاد التأكسدي في الكبد والكليتين، إلّا أنّ تأثيرات التعرّض للعنصرين معا في الكلية تسلك سلوك التآزر، وسلوك التضاد في الكبد. ويمكن

تفسير هذه الاختلافات، على الأقل جزئياً من خلال دور الميتالوثيونين الذي يوجد في الأنسجة المختلفة في عديد من الأشكال، فهو يلعب دوراً كبيراً في تنظيم التداخلات الكلوية السامة لخليط المعادن في الكلية أثناء التعرّض المزمن لهذه المعادن. ويمكن أن يؤدي تحريض الميتالوثيونين بواسطة الكاديوم إلى تغيير في حركيّة وديناميكية الرّصاص السميّة (Matović *et al*, 2015).

تشير نتائج الأبحاث أنّ معدني الرّصاص والكاديوم كلّ على حدى أو معا يؤديان إلى الموت الخلوي المبرمج، ففي دراسة سميّة تحت مزمنة لمدة 90 يوم، أدت التركيزات المنخفضة نسبياً، والواقعية بيئياً من الرّصاص والكاديوم إلى الموت الخلوي المبرمج في الكبد والكلية، والذي أدى إلى إضعاف وظيفتها (Yuan *et al*, 2014). فالموت الخلوي المبرمج سببه تلف في الميتوكوندريا وتغيّرات في مستويات البروتينات الجينية المسؤولة عن الموت الخلوي المبرمج، مثل بروتينات Bcl-2 و Bax، التي تنشّط caspase3 ممّا يؤدّي إلى تنشيط عمليات الموت الخلوي المبرمج (Matović *et al*, 2015).

3. العكبر

العكبر هو خليط راتنجي طبيعي تنتجه نحل العسل من المواد التي تمّ جمعها من أجزاء النباتات وإفرازاتها. يستخدم النحل العكبر في بناء وإصلاح خلاياه من أجل سدّ الفتحات والشقوق وتلطيف الجدران الداخلية وكحاجز وقائي. ويجمع النحل العكبر من نباتات مختلفة، وفي مناطق مناخية متنوعة (Wagh, 2013). لقد تمّ استخدام العكبر منذ العصور القديمة على نطاق واسع، وخاصة في الطب الشعبي لعلاج العديد من الأمراض. وقد تمّ نشر أول عمل علمي على العكبر في عام 1908، كما تمّ جرد خصائصه الكيميائية والتركيبيّة وفهرستها في المجرّد الكيميائي (Helfenberg et al, 1983).

يعدّ العكبر مادّة علاجية طبيعية متوقّرة في العديد من مخازن الأغذية الصحيّة في أشكال مختلفة للاستخدام الموضعي. كما أنّه يستخدم في مستحضرات التجميل أو الطب الشعبي البديل لعلاج الأمراض المختلفة، وتشمل المستحضرات الحالية للعكبر مركبات لمتلازمة البرد، بالإضافة إلى مستحضرات جلدية مفيدة في التئام الجروح، وعلاج الحروق وحب الشباب والقوباء البسيط الذي يصيب الأعضاء التناسلية.

1.3. مكونات العكبر

يتكوّن العكبر الخامّ من حوالي 50% راتجات و30% شموع و10% زيوت أساسية و5% حبوب لقاح و5% من مختلف المركبات العضوية (Wagh, 2013). ويحتوي العكبر على أكثر من 300 مركب تمّ تحديدها في عينات مختلفة (Anjum et al, 2018). إنّ نسب مركّبات العكبر تعتمد على مكانها ووقت جمعها، فلقد تمّ استخدام العديد من الطرق التحليلية للفصل والتعرف على مكونات العكبر. والمركبات التي تمّ تحديدها في العكبر تنتمي إلى مجموعات عديدة الفينول وأحماض البنزويك ومشتقاته وكحول cinnamic، وحمض السيناميك ومشتقاته و sesquiterpene وكحولاتها و triterpene hydrocarbons ومشتقات benzaldehyde وأحماض أخرى مع مشتقاتها والكحولات والكيثونات وكحولات التريان و الهيدروكربونات الأليفاتية والمعادن والستيرويدات والستيرويدات الهيدروكربونية والسكريات والأحماض الأمينية (Walker and

(Crane, 1987). يحتوي العكبر على كميات قليلة من المركبات العطرية (DeCastro, 2001). ويعتقد أنّ السكريات التي يحتويها العكبر مصدرها العسل، وذلك يحدث أثناء جمع العكبر، وملامسة العسل. وتختلف مكونات العكبر باختلاف مصدره، فبعضها موجود في العديد من العينات من أماكن مختلفة، وبعضها موجود في العينة من أصل نباتي محدد. إنّ اختلاف النشاط البيولوجي لأنواع العكبر ذات المنشأ الجغرافي المختلف سببه الظروف المناخية المختلفة، فالمركبات الأساسية المسؤولة عن الأنشطة البيولوجية للعكبر هي الفينولات العديدة، والأحماض العطرية، والأحماض ثنائية التربينات، ولكن عدد قليل من أنواع العكبر مختلفة في تكوينها من المركبات البيولوجية النشطة عن أنواع العكبر الأخرى. كما يختلف تركيب العكبر حسب نوع أزهار المنطقة، والمعاملات الخاصة على المادة الخام. ففي دراسة على العكبر في منطقة جيجل بالجزائر وجد أنّه يحتوي على مركبات فينولية عديدة تنتمي إلى الفلافونويدات و chalcones والأحماض الفينولية (جدول 1) (Boutabet et al, 2011).

2.3. نشاط العكبر المضاد للأكسدة

في دراسات على العكبر من مناطق جغرافية ونباتية مختلفة، وجد أنّ نشاط العكبر المضادّ للأكسدة مرتبط بتركيز الفينولات العديدة (Kumazawa et al, 2004؛ Miguel et al, 2010). ففلافونويدات العكبر هي واحدة من أهمّ المركبات، وهي مسؤولة عن العديد من الأنشطة البيولوجية والدوائية بما في ذلك أنّها مضادّة للسرطان وللإلتهابات وللميكروبات وللأكسدة والجذور الحرة النشطة وعوامل أخرى مسؤولة عن الشيخوخة الخلوية وأمراض القلب والأوعية الدموية والسكري والتهاب المفاصل والإجهاد الحراري والتلوث البيئي. و يبدو أنّ الفلافونويدات والفينولات المختلفة في العكبر قادرة على إزالة الجذور الحرة وتثبيط آليات فوق أكسدة الدهون معتبرا في البلازما والكبد والرئتين والدماغ عند الفئران. والتأثير يعتمد على التركيز ونوع النسيج (Bogdanov, 2017). وقد ثبت أنّ الفلافونويدات تثبّط كلّ من أكسدة الدهون وتراكم الصفائح الدموية وقد توفّر نفاذية الشعيرات الدموية، وهشاشتها، ونشاط بعض النظم الإنزيمية (Havsteen, 2002).

يعتبر Chyrisin من أحد مركبات العكبر، والذي لديه نشاط حماية الكبد ومضاد للأكسدة عند الجرذان (Sathiavelu *et al*, 2009). وتعتبر مشتقات حمض البنزويك من مضادات الأكسدة، وخاصة ضد فوق أكسدة الدهون. وتمتلك أحماض caffeic وcaffeoquinin والسناميك نشاطا ضد O_2^- (Christov *et al*, 2006) ؛ (Nakajima *et al*, 2007). كما لوحظ أنّ العكبر له خاصية مضادة للأكسدة بسبب مكوناته من galangin و pinocembrin. مكونات العكبر مثل الفانيلين وأحماض الفينول لديها القدرة على النفاذ خلال البشرة ثمّ الأدمة وحمايتها من الجذور الحرّة المنتجة بسبب الإشعاعات أو قبل نضوج الخلايا الجلدية المسنّة. قدرة العكبر المضادّة للأكسدة ترجع إلى المركبات الفينولية التي تتخلى عن أيونات الهيدروجين لصالح الجذور الحرّة لحماية الخليّة من تفاعلات الأكسدة (Anjum *et al*, 2018). يمكن للعكبر أن يقلّل من المستويات الخلوية من بيروكسيد الهيدروجين وأكسيد النيتروجين، والذي قد يرجع إلى قدرته المضادّة للإلتهاب (Tan-No *et al*, 2006)، وقد ثبت أنّ المكونات المتنوعة للعكبر هي مثبطات قوية للإجهاد التأكسدي.

من مكونات العكبر CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)، والذي يمنع إنتاج ROS في العديد من الأنظمة (Hosnuter *et al*, 2004). كما تمّ إثبات أنّ CAPE مضادّ للسرطان. ففي المختبر وجد أنّ العكبر يثبّط فوق أكسدة البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة، وندرتة البروتينات. ففي الجسم الحي يمكن للعكبر أن يزيد من القدرة المضادة للأكسدة عند الحيوانات (Zhao *et al*, 2009)، وعند الإنسان (et al, 2007) (Jasprica)، ممّا يؤدي إلى انخفاض فوق أكسدة الدهون (Kart *et al*, 2009). أوضح Krol وآخرون (1990) بناء على تجاربهم على الفئران التي بيّنوا فيها أنّ القدرة المضادّة للأكسدة التي يمتلكها العكبر تعود إلى قدرته على إزالة الجذور الحرّة. وقدرة العكبر المضادّة للأكسدة تعود أساسا إلى محتواه العالي من الفلافونيدات. وبيّنت دراسة أخرى على عيّات من العكبر خالية من CAPE وأخرى تحتوي عليه أنّ العكبر الذي يحتوي CAPE ذو كفاءة معتبرة عالية مقارنة مع عيّات العكبر الخالية منه على إزالة الجذور الحرّة،

وتثبيط نشاط إنزيم xanthine oxidase وفوق أكسدة الدهون. يقوم CAPE العكبر بدور كبير في النشاط المضادّ للأكسدة (Russo et al, 2002).

من مركّبات العكبر النّشطة المضادّة للأكسدة مركب tectochrysin، فقد وجد أنّه يخفض من نشاط الإنزيمات الناقلة للأمين، والتي ارتفع نشاطها بفعل المعاملة برابع كلوريد الكربون الذي سبب تلف في الخلايا الكبدية عند الجرذان، بالإضافة إلى ذلك فالتيكيتوكريسين زاد في نشاط الإنزيمات المضادّة للأكسدة في الهيولة الكبدية مثل SOD و CAT و GPx. كما أدّى إلى تخفيض إنتاج MDA عند الجرذان المعاملة برابع كلوريد الكربون (Lee et al, 2003).

جدول 1. المكونات الكيميائية الأساسية لعكبر جيجل. الجزائر. (Boutabet *et al*, 2011).

Compounds	%
Aliphatic acids	
9,12- Octadecadienoic acid (Z/Z)	1.89
2- Propenoic acid, 3- (4-hydroxyphenyl)	0.77
4- (Methylamino)butyric acid	0.92
Aromatic acids	
Benzene acetic acid, alpha- (hydroxymethyl)-, (+/-).	2.39
p-Hydroxycinnamic acid	5.02
5-O-Methyl-d-gluconic acid dimethylamide	0.03
Esters	
p-Hydroxycinnamic acid, ethyl ester	0.91
Hexanoic acid, 2-phenyl ester	0.62
Hexadecanoic acid, 15-methyl-,methylester	0.90
6-Octadecanoic acid, methyl ester	0.70
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	0.41
4-Fluoro-1-methyl-5-carboxylic acid, ethyl ester	0.07
Chloromethyl 2-chlorododecanoate	0.15
Flavonoids	
Pinostrobin chalcone	0.67
Pinocembrin	0.33
Tectochrysin	1.00
Sesquiterpenes	
1,4-Methanoazulen-7 (1H)-one, octahydro-4,8,8,9-tetramethyl	1.00
Alcohols	0.94
6-Phenyl-n-hexanol	0.83
1,4-Benzenediol,2,5-bis (1,1-dimethylethyl)	2.52
1-Octadecanol	0.14
Cyclohexanol, 2,3,dimethyl	
Others	2.05
Cyclopropane,1,1,2-trimethyl-3- (2-methyl-1-propenyl)	1.28
Benzene, 3-cyclohexan-1-yl	1.20
3 (2H)-Furanone, dihydro-2,2-dimethyl-5-phenyl	1.07
3 (2H)-Furanone, dihydro-2,2-dimethyl-5-phenyl	0.35
Benzene, 1,1'- (1,2-cyclobutanediyl)bis-,cis	2.68
1H-1,2,3-Triazole-1,5-diamine,3-nitro	0.29
3-[4-Cyano-1,2,3,4-tetrahydronaphthyl)	0.16
propanenitrile	2.20
Chathine	0.13
2-Chloropropionamide	
Cyclopentadecanone, 2-hydroxy	
5-Iodohistidine	
Acetamide, 2-cyano	0.13

1. الوسائل المستخدمة

1.1. الحيوانات

تمّ جلب الجرذان من نوع *Albinos Wistar* من معهد باستور بالجزائر العاصمة، وتمّ إيوؤها في مستودع تربية الحيوانات بمعهد البيطرة بجامعة باتنة 1، وذلك في أقفاص جيّدة التهوية، وفي ظل ظروف ملائمة من ضوء (يوم/نهار) ورطوبة (40-70%)، ودرجة حرارة (20-24م°)، وأكل وشرب دائمين. وكان مصدر الغذاء من شركة بوزريعة للأعلاف بالجزائر العاصمة، وقد تمّ إخضاع الحيوانات لفترة ملائمة لمدة أسبوعين تحت هذه الظروف.

2.1. العكبر

تمّ جمع العكبر عن طريق كشط أطر وجدران صناديق خلايا النحل من تعاونية بلدية قاوس لتربية النحل خلال شهري أبريل وماي من عام 2014، ثمّ تمّ تخزينه بعيدا عن الضوء وتحت درجة حرارة 4 درجة مئوية.

تمّ تفتيت العكبر إلى أجزاء صغيرة، ثمّ غسله ونقعه في الإيثانول 95 % ، لمدة أسبوعين مع التحريك من وقت لآخر. ثمّ رشّح المنقوع، و بخرّ باستخدام الضغط المنخفض عند درجة حرارة 60 درجة مئوية باستخدام المبخرالذوّار، وأعيد تبخير المستخلص مرّة أخرى بإضافة الإيثانول، وعومل المستخلص بواسطة قاعدة هايدروكحولية، ثمّ بإيثر البترول لإزالة الشوائب الدهنية، ثمّ بإيثر ثنائي الإثيل لاستخلاص الأجليكونات الفلافونية الحرّة، وأخيرا المعاملة بخلات الإثيل لاستخلاص الأجليكونات العديدة الفينولات ومعظم الفلافونيدات المرتبطة بالسكريات.

وللحصول على مسحوق جاف من العكبر لتسهيل عملية الاستخدام تمّ معاملة المستخلص بتقنية التجفيد

lyophilisation

2. الطرق المتبعة

1.2. إنشاء المجموعات

تمّ توزيع 48 من ذكور الجرذان والتي تتراوح أوزانها بين 200-230 غرام وبصورة عشوائية على ثماني مجموعات بحيث كان متوسط الوزن في المجموعات الثمانية متقارب والمجموعات هي:

1- المجموعة الشاهدة T.

2- مجموعة العكبر Pro

3- مجموعة الكاديوم Cd.

4- مجموعة الكاديوم المعاملة مسبقا بالعكبر ProCd .

5- مجموعة الرصاص Pb.

6- مجموعة الرصاص المعاملة مسبقا بالعكبر ProPb.

7- مجموعة الرصاص و الكاديوم PbCd.

8- مجموعة الرصاص و الكاديوم المعاملة مسبقا بالعكبر ProCdPb.

اذيب مسحوق العكبر في محلول 1% من الصمغ العربي (Acacia senegal) (Shukla, et al 2004). تمّ معاملة جرذان المجموعات Pro و ProCd و ProPb و ProCdPb بمحلول العكبر (25ملغ/كغ من وزن الحيوانات يوميا) ، وتم اعتماد هذا التركيز بعد اختبار فعاليتها بمخبر علم السموم بجامعة جيجل وتم امرار ذلك عن طريق التجريع بحجم 10مل/كغ (OECD, 2008) وذلك لمدة خمسة أيام. أمّا جرذان المجموعات الأخرى فتّم معاملتها بمحلول 1% من الصمغ العربي بنفس الطريقة ولمدة خمسة أيّام أيضا. بعد نهاية الأيّام الخمسة، تمّ تطبيق التسمّم بكلوريد الكاديوم وخلّات الرصاص عن طريق ماء الشرب لمدة ثلاثة أشهر. ماء شرب جرذان المجموعتان الأولى T والثانية Pro هو عبارة عن ماء مضاعف التقطير. أمّا للمجاميع الأخرى فعبارة عن محاليل لمحي المعدنين.

فمحلول كلوريد الكاديوم (0.3 غ/ل) (Sato, et al, 1978) لمجموعتي Cd و ProCd و محلول خلاّت الرصاص (3 غ/ل) (Muselin, et al, 2010) لمجموعتي Pb و ProPb.

أمّا المجموعتين الأخيرتين CdPb و ProCdPb فماء شربهما هو محلول ملحي المعدنين بالتركيز نفسه.

2.2. حساب التغيّر في وزن الحيوانات وكمية الغذاء والماء المستهلكة

حساب الوزن المكتسب أو المفقود للحيوانات تم بحساب فرق الوزن بين الابتدائي و النهائي لكل حيوان، ثمّ إيجاد متوسط فرق الوزن لكل مجموعة.

تمّ حساب كميّة الغذاء والماء المستهلكة من طرف حيوانات كل مجموعة طيلة فترة الدّراسة.

3.2. عيّنات البول

في نهاية فترة التجربة تمّ وضع الجرذان في الأقفاص الأضيّة لمدة 24 ساعة لجمع عيّنات البول وذلك بوضع قطرات (0.1 ملل) من 1% من أزيد الصوديوم NaN_3 لمنع التعفّن (Zhang, et al, 2015)، كما تمّ غمس أنابيب جمع البول في الماء المجمّد لمنع تحلّل أو تغيّر محتويات البول (يتمّ تبديل الماء الذائب بالماء المجمّد)، وتمّ حفظ عيّنات البول في درجة حرارة -80 درجة مئوية إلى أن حان إجراء المعايير البيوكيميائية. كما تمّ إجراء المعايير الكيميائية للبول باستخدام أشرطة الغمس المخبريّة للمعايير الكيميائية للبول عند الإنسان.

4.2. أخذ عيّنات الدم

في اليوم الأخير من الدّراسة تمّ تجويع الجرذان وذلك بمنع الغذاء عنها وترك الماء، وفي اليوم الموالي تمّ وزن الحيوانات ثمّ تخديرها بالكيتامين 40 ملغ/كغ من وزن الحيوان. وأخذت عيّنات الدم من وريد الجيب المداري للعين وذلك بواسطة أنابيب شعريّة زجاجية مستخدمة في قياس الهيماتوكريت والتي تحتوي في جدرانها على آثار الهيبارين المضاد لتجلط الدم. كما تحتوي أنابيب جمع الدم على مادة الهيبارين أيضا.

ريت عملية الطرد المركزي لعينات الدم في جهاز الطرد المركزي من نوع (Hettich EBA20) بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة خمسة دقائق، و تمّ حفظ البلازما المتحصّل عليها في درجة حرارة -80 درجة مئوية لحين إجراء المعايرات البيوكيميائية.

5.2. تشريح الحيوانات

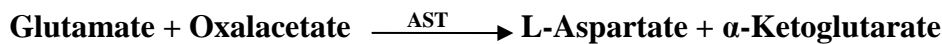
تمّ تشريح الحيوانات المخدّرة ونزع الكبد والكلّى وأخذ أوزانها ثمّ إمرارهما في محلول مبرّد مسبقاً من 0.9 NaCl % ثمّ تجفيفها بورق التجفيف. تمّ حفظ 0.4 غم من الكبد والكلّى عند درجة حرارة - 80 درجة مئوية لاستخدامها في معايرة مقاييس الإجهاد التأكسدي.

6.2. معايرة المقاييس البيوكيميائية

تمّ قياس المعايير البيوكيميائية في البلازما بجهاز الأوتومات (Cobas 6000 analyser, USA) بمخبر ابن سينا بقسنطينة.

1.6.2. قياس نشاط AST

ينشط AST (Aspartate aminotransferase) أو GOT (glutamate oxaloacetate) التحويل العكسي لمجموعة الأمين للحمض الأميني أسبارتات إلى α -جلوترات، مشكلاً جلوتامات والأوكسلات وهذا الأخير يتحوّل إلى المالات بفعل إنزيم MDH (malate dehydrogenase) و NADH

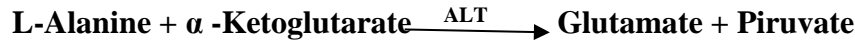


يقاس معدّل الانخفاض في تركيز NADH، بجهاز Cobas 6000 analyser USA، ويتناسب مع

التركيز التحفيزي لانزيم AST الموجود في العيّنة عند 340 نانومتر بواسطة (Murray, 1984_a).

2.6.2. قياس نشاط ALT

إنزيم ALT (Alanine aminotranferase) أو GPT (Glutamate pyruvate transaminase) يحفز التحويل العكسي لمجموعة الأمين للحمض الأميني Alanine إلى α -Ketoglutarate مكونا الجلوتامات والبيروفات وهذا الأخير يرجع إلى اللاكتات بفعل إنزيم lactate dehydrogenase (LDH) و NADH:



يقاس معدّل الانخفاض في تركيز NADH، الذي يتناسب مع التركيز التحفيزي لـ ALT الموجود في العيّنة

عند 340 نانومتر بواسطة Cobas 6000 analyser, USA (Murray, 1984_b).

3.6.2. قياس نشاط ALP

ينشط ALP (Alkalinephosphatase) تحويل مجموعة الفوسفات من النيتروفينيل فوسفات

p-nitrophenylphosphate إلى AMP (2-amino-2-methyl-1-propanol) محرّرا p-nitrophenol .



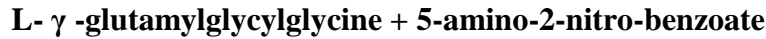
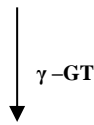
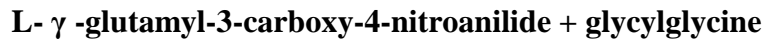
تحسب كميّة p-Nitrophenol المتكوّنة بقياس الأمتصاصية التي تتناسب مع نشاط ALP في العيّنة عند

405 نانومتر بواسطة Cobas 6000 analyser, USA (Wenger *et al*, 1984).

4.6.2. قياس نشاط γ -GT

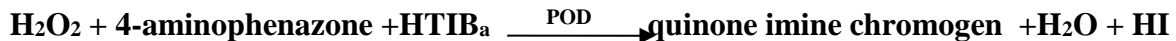
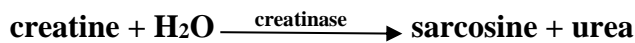
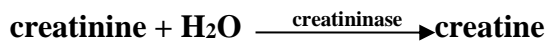
يتحوّل L - γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide وفي وجود glycylglycine تحت تأثير إنزيم-Gamma GT الموجود في العينة إلى 5-amino-2-nitro-benzoate والذي تقاس امتصاصيته عند 405 نانومتر

بواسطة (Szasz, 1974) Cobas 6000 analyser, USA.



5.6.2. معايرة الكرياتينين

يعتمد مبدأ الطريقة الإنزيمية لتقدير كمية الكرياتينين بحساب بيروكسيد الهيدروجين المتكوّن بعد تحوّل الكرياتينين بفعل إنزيمي creatininase و creatinase و sarcosine oxidase، يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين المتحرّر مع 4-aminophenazone و HTIB لتكوين المعقد الملون quinone imine.



_a 3-hydroxy-2,4,6-triiodo-3-hydroxybenzoic acid

تقاس أمتصاصية المعقد الأخير والتي تتناسب مع تركيز الكرياتينين عند 340 نانومتر بواسطة

(Junge *et al*, 2004) Cobas 6000 analyser, USA.

6.6.2. معايرة اليوريا

يقوم إنزيم urease بالتحليل المائي لليوريا لينتج الأمونيوم والكربونات.



يتفاعل 2-oxoglutarate مع الأمونيوم وفي وجود إنزيم GLDH (glutamate dehydrogenase) والمساعد

الإنزيمي NADH لتكوين L-glutamate، وفي هذا التفاعل فإن مولين من NADH تؤكسد إلى NAD⁺

لكل مول من اليوريا المتحللة.



فكمية انخفاض تركيز NADH متناسبة مباشرة مع تركيز اليوريا في العينة وتقاس عند 340 نانومتر

بواسطة (Sampson *et al*, 1980) Cobas 6000 analyser, USA.

7.2. قياس معايير الإجهاد التأكسدي

1.7.2. إعداد جناسة الأنسجة

تم تحضير جناسة الكبد والكلى بإضافة 4 ملل من محلول الفوسفات البوتاسي المنظم pH=7.4 إلى

0.4 غرام من العينات النسيجية المجمدة وذلك في الخلاط الزجاجي اليدوي من نوع Kimble . تم إجراء

عملية الطرد المركزي بسرعة 10000 rpm لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 4⁰ مئوية بواسطة جهاز الطرد

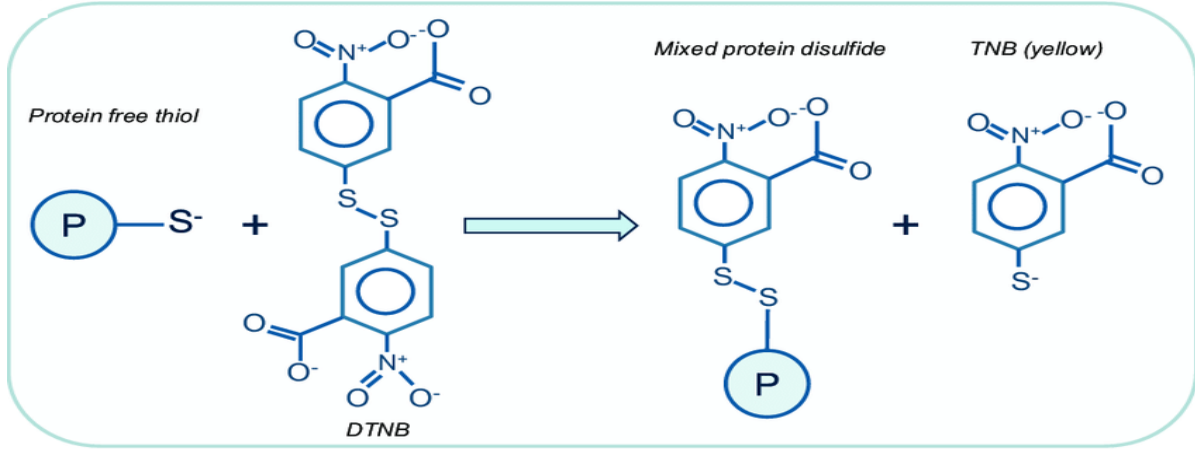
المركزي من نوع Sigma، ثم وُرع السائل الطافي على ثلاثة أنابيب وتم حفظها في -80 درجة مئوية.

2.7.2. تقدير تركيز الجلوتاثيون المرجع

تم تقدير مستوى الجلوتاثيون المرجع وفقاً للطريقة اللونية Ellman (1959).

يعتمد تقدير GSH على أكسدته بواسطة حمض DTNB (5, 5'-Dithiobis 2-nitrobenzoïque) محزراً

بذلك حمض TNB (thionitrobenzoïque) ويقاس عند طول موجة 412 نانومتر (شكل 7.7).



شكل 7. تفاعل Ellman (Rudyk, and Eaton 2014)

❖ يحضر محلول DTNB بتركيز 4% في محلول 1% من سيترات الصوديوم.

❖ تحضير المحلول الفوسفاتي المنظم

تم تحضير 1 لتر من محلول PBS حسب الجدول 2 حيث يتم إضافة المواد المستعملة إلى 800 ملل من الماء المضاعف التقطير ثم يكمل أكمل الحجم 1 لتر وتعديل pH إلى 7.4 بواسطة محلول 0.1N HCl أو محلول 0.1N NaOH.

❖ تحضير محلول التفاعل

يحضر محلول التفاعل بإضافة 105 ملل من محلول DTNB إلى 895 ملل من محلول PBS.

❖ تحضير محلول 20% TCA

يحضر محلول 20% TCA بأخذ 20 غ TCA و 37 ملغ EDTA (1ميلي مول) و كمية كافية لحجم

100 ملل ماء مقطر

جدول 2. تركيبة لتر من المحلول المنظم PBS

Component	Mass	Molarity
NaCl (mw: 58.4 g/mol)	8 g	0.1370 M
KCl (mw: 74.551 g/mol)	200 mg	0.0027 M
Na ₂ HPO ₄ (mw: 141.96 g/mol)	1.44 g	0.0100 M
KH ₂ PO ₄ (mw: 136.086 g/mol)	240 mg	0.0018 M
H ₂ O ₂	qsp 100 ml	

❖ تحضير محلول العينة

نضع 0.5 ملل من جناسة الأنسجة (المحفوظة في درجة -80 درجة مئوية) مع 0.5 ملل من محلول TCA ويترك لمدة 5 دقائق ثم تجرى عملية طرد مركزي (3000 دورة/د) لمدة 10 دقائق.

❖ التفاعل

أخذت 0.2 ملل من السائل الطافي لمحلول العينة وأضيفت إلى 1.8 ملل من محلول التفاعل وتركت لمدة 10 دقائق ثم قيست الأمتصاصية للعينات بجهاز قارئ الصفائح Bio-Tek بمخبر الكيمياء الحيوية التطبيقية بجامعة سطيف عند طول موجة 405 نانومتر، مع طرح قيمة الكثافة الضوئية لمحلول الإذابة من قيم الأمتصاصية للعينات.

❖ قد تمّ حساب تركيز الجلوتاثيون وفقاً لمعادلة Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot \ell \cdot C$

معامل الإمتصاص المولي لمركب TNB = $13.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

طول المسار الضوئي $(l) = 1$ سم

معامل التخفيف = 50

قدرت تراكيز GSH بالميكرومول في الميليغرام من النسيج.

3.7.2. تقدير تركيز MDA

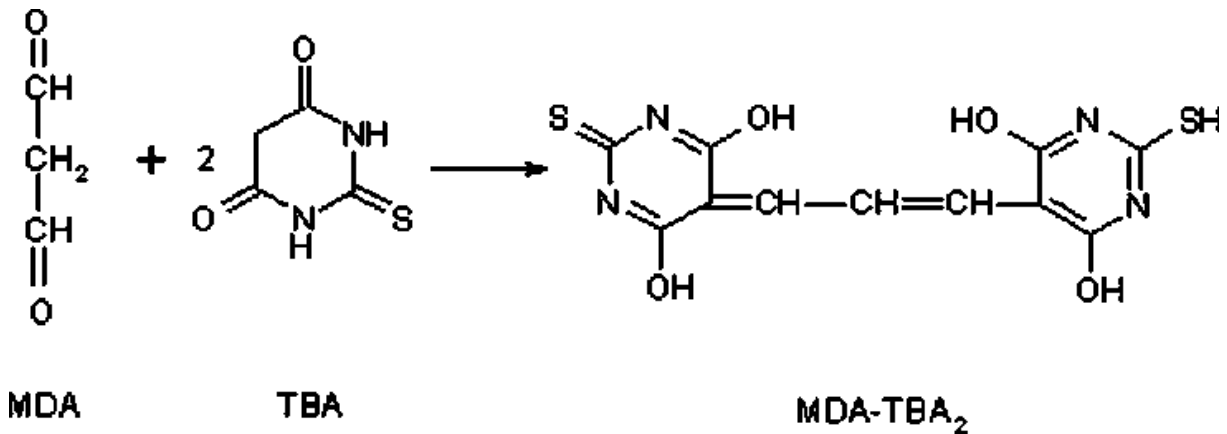
تمت معايرة MDA باستخدام اختبار TBAR (Thiobarbitutic Acid Reaction substrats) وهذا حسب

طريقة Buege و Aust (1978).

يعتمد اختبار (TBARs) على التفاعل اللوني لحمض TBA (Thiobarbitutic Acid) مع MDA الذي

يعتبر من أهم النواتج الثانوية لأكسدة الدهون في وسط حامضي مكونا معقدًا تقاس امتصاصيته عند 532

نانومتر (شكل 8).



شكل 8. تكوين معقد مالون ثنائي الأدهيد مع حمض الثيوباربيريتيك (Grotto *et al*, 2009).

❖ محلول TBA (أ): 0.375% وزن/حجم من TBA في 0.25N HCl

❖ محلول TCA (ب): 15% وزن/حجم من TCA

❖ محلول التفاعل (ج): تأخذ 100 ملل من محلول TBA (أ) و 100 ملل من محلول TCA (ب)

تضاف لها 0.5 ملل من جناسة الأنسحة المحفوظة في درجة حرارة - 80 مئوية إلى 2 ملل من محلول التفاعل (ج) ثم يتم الرج ووضعها في حمام مائي عند درجة حرارة 100 مئوية لمدة نصف ساعة وبعد تبريدها تتم لها عملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة ثم تقاس الأمتصاصية للجزء الطافي عند 532 و 600 نانومتر، وقد تم تصفير الجهاز بعينة محلول الإذابة الخالي من العينة.

تم حساب كمية MDA حسب قانون Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot \ell \cdot C$

معامل الامتصاص المولي = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

طول المسار الضوئي (ℓ) = 1 سم

معامل التخفيف = 50.

وقدريت تراكيز MDA بالنانومول/ملغ من النسيج.

8.2. الدراسة الإحصائية

تم تحليل النتائج إحصائيا باتباع تحليل التباين ANOVA ومقارنة متوسطات المعاملات باستعمال

اختبار Tukey باستخدام برنامج IBM SPSS statistics 20.

النتائج والمناقشة

1. النتائج

سُجّلت النتائج بعد 12 أسبوعاً من الدراسة على جرذان المجموعات الثمانية. القيم معبّر عنها بالمتوسط \pm الانحراف المعياري (mean \pm SD) لستة جرذان في كلّ مجموعة.

تم مقارنة النتائج باستخدام الرموز الإحصائية التالية:

❖ (*) و (**) و (***) تعني الفرق معتبر عند $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.001$ على

التوالي مقارنة بمجموعة T.

❖ (a) و (aa) و (aaa) تعني الفرق معتبر عند $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.001$ على

التوالي مقارنة بمجموعة Cd.

❖ (b) و (bb) و (bbb) تعني الفرق معتبر عند $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.001$ على

على التوالي مقارنة بمجموعة Pb.

❖ (c) و (cc) و (ccc) تعني الفرق معتبر عند $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.01$ و

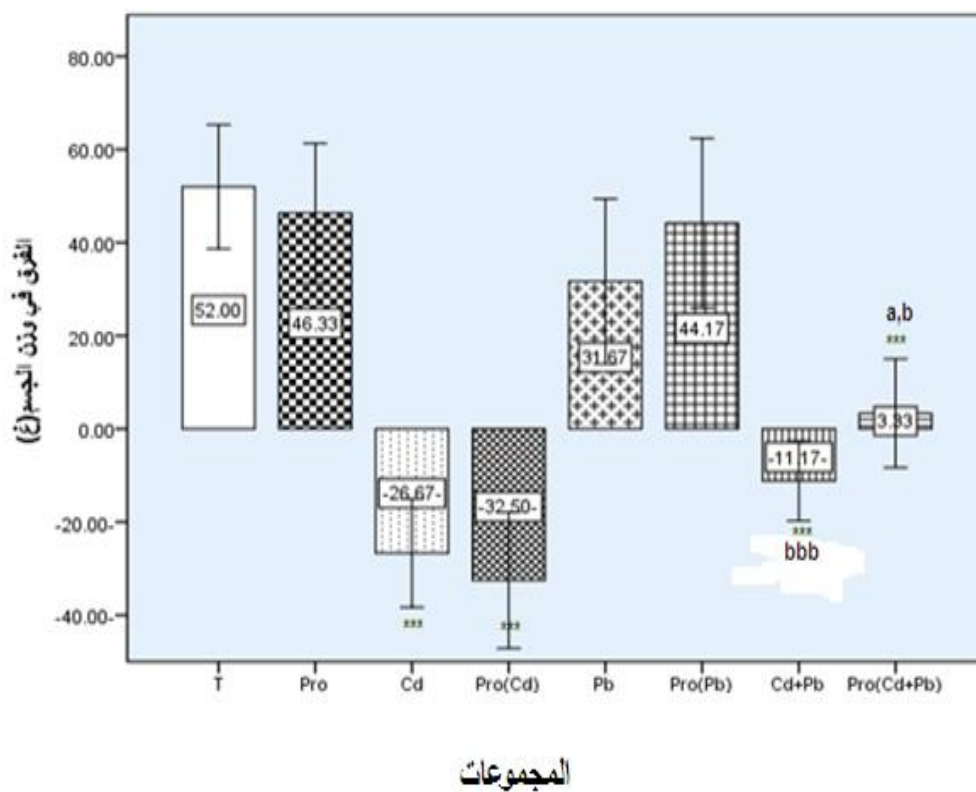
$P \leq 0.001$ على التوالي مقارنة بمجموعة CdPb.

1.1. أوزان الحيوانات

أدّت المعاملة بكلوريد الكاديوم (300ملغ/ل) خلال 12 أسبوعاً إلى فقد الحيوانات من وزنها بدرجة جدّ معتبرة ($p \leq 0.001$) بحيث بلغ فرق الوزن -11.64 \pm 26.67 وهذا مقارنة بالحيوانات الشاهدة التي زاد وزنها خلال فترة التجربة بحيث بلغ فرق الوزن عندها 13.31 \pm 52، ولم يؤد الرصاص (3غ/ل) إلى أيّ تغيير معتبر في وزن الحيوانات خلال فترة التجربة مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أمّا المعاملة بالمعدنين معا وفي الظروف نفسها من التركيز ومدة المعاملة، فقد أدّى أيضاً إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في وزن الحيوانات مقارنة بالمجموعة الشاهدة، ولكن بدرجة أقلّ ممّا أدّى إليه الكاديوم في صورة منفردة، حيث بلغ

الانخفاض في الوزن -11.17 ± 8.57 . ولم يؤد العكبر إلى تأثير معتبر في أوزان الجرذان مقارنة بتلك المعاملة بالمعدنين منفردين أو مجتمعين.

وقد لوحظ عند معاملة الحيوانات بخليط المعدنين إلى انخفاض في أوزانها بدرجة أقل من المعاملة بالكاديوم لوحده وخاصة تلك المعاملة مسبقا بالعكبر 11.67 ± 3.33 وهذا عند $(p \leq 0.05)$ مقارنة بالحيوانات المعاملة بالكاديوم وتلك المعاملة بخلات الرصاص 17.74 ± 31.67 (شكل 9).

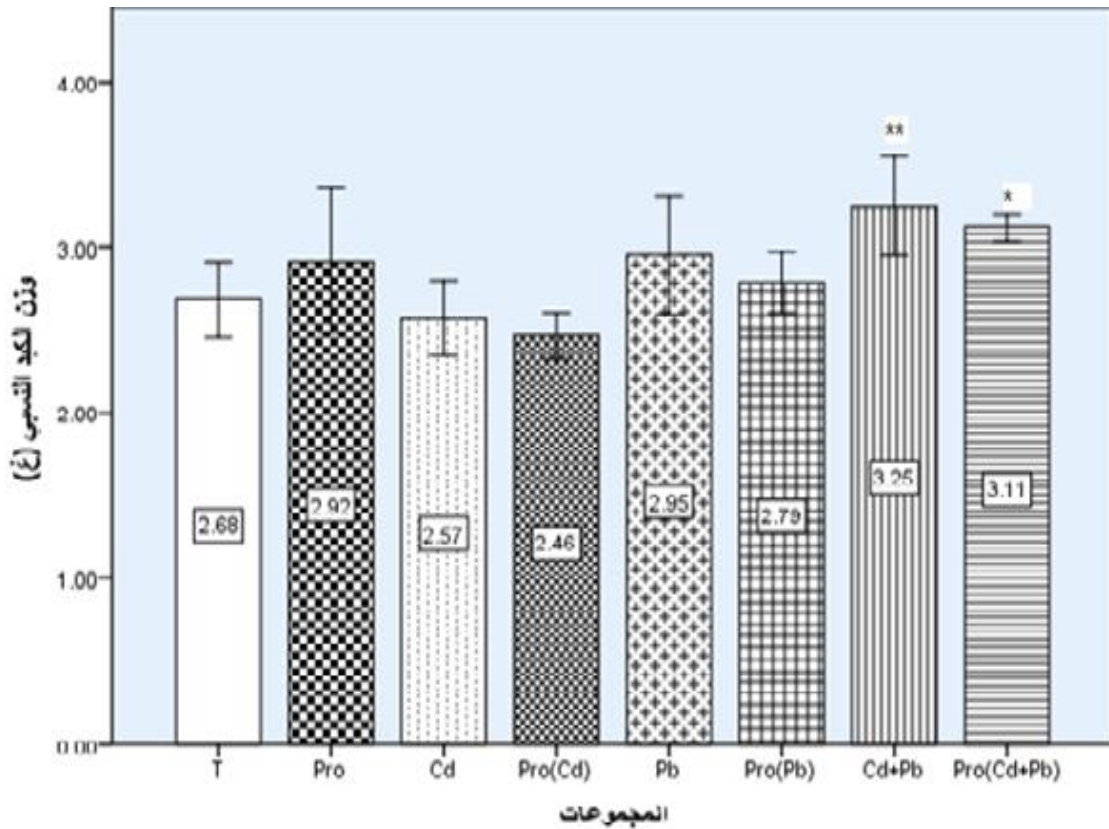


شكل 9. فرق وزن الحيوانات المكتسب أو المفقود.

2.1. الوزن النسبي للكبد

لم تؤد المعاملة بالكاديوم والرصاص في صورتها المنفردة إلى أيّ تغير في الأوزان النسبية للكبد مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أما المعاملة بخليط المعدنين في مجموعة CdPb فقد أدت إلى زيادة معتبرة $(p \leq 0.05)$

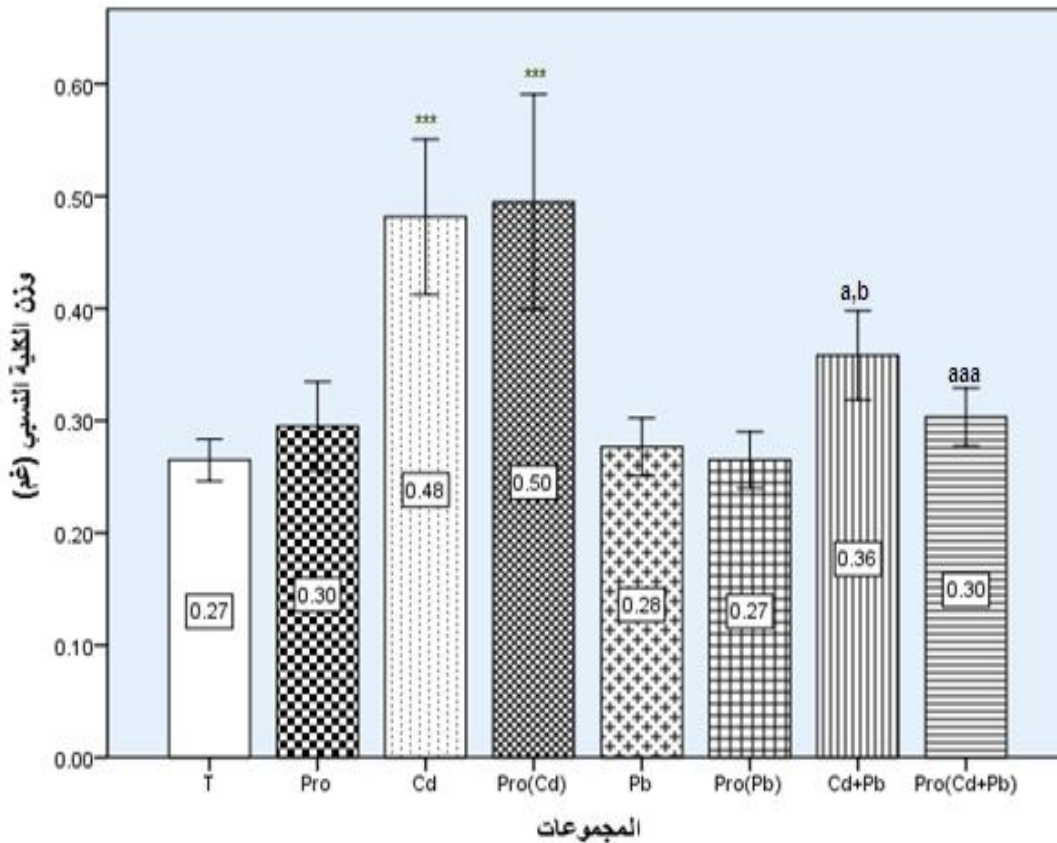
في الأوزان النسبية للكبد 0.3 ± 3.25 مقارنة بالمجموعة الشاهدة T 0.23 ± 2.68 . ولم تؤد المعاملة المسبقة بالعكبر قبل المعاملة بالكادميوم في مجموعة ProCd و بالرصاص في مجموعة ProPb إلى أي فرق معتبر مقارنة بالمجموعة المعاملة بالكادميوم أو بالرصاص على التوالي. بينما أدت المعاملة المسبقة بالعكبر في مجموعة ProCdPb إلى تجنب الزيادة المعتبرة في الوزن النسبي للكبد مقارنة بالمجموعة الشاهدة، وقد لوحظ أنّ هناك فرق معتبر عند $(P \leq 0.01)$ و $(P \leq 0.05)$ لقيم الوزن النسبي للكبد لمجموعتي CdPb و ProCdPb والمقدرة على التوالي بـ 0.30 ± 3.25 و 0.08 ± 3.11 مقارنة بمجموعة Cd 0.23 ± 2.57 (شكل 10).



شكل 10. الوزن النسبي للكبد

3.1. الوزن النسبي للكلية

أدى كلوريد الكاديوم في مجموعة Cd إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في الوزن النسبي للكلية 0.07 ± 0.48 مقارنة بالمجموعة الشاهدة 0.02 ± 0.26 ، ولم تؤدّ خلاّت الرصاص في مجموعة Pb إلى أيّ تغيير معتبر في وزن الكلية النسبي مقارنة بالمجموعة الشاهدة. وقد أدى خليط المعدنين في مجموعة CdPb إلى تجنّب زيادة وزن الكلية 0.04 ± 0.36 بدرجة معتبرة ($p \leq 0.05$) مقارنة بالمعاملة بالكاديوم في مجموعة Cd أمّا المعاملة المسبقة بالعكبر فلم تؤدّ إلى الوقاية من تأثيرات الكاديوم في مجموعة ProCd بينما المعاملة المسبقة بالعكبر في مجموعة ProCdPro وقد أدّت إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في الوزن النسبي للكلية 0.03 ± 0.30 مقارنة بمجموعة Cd (شكل 11).

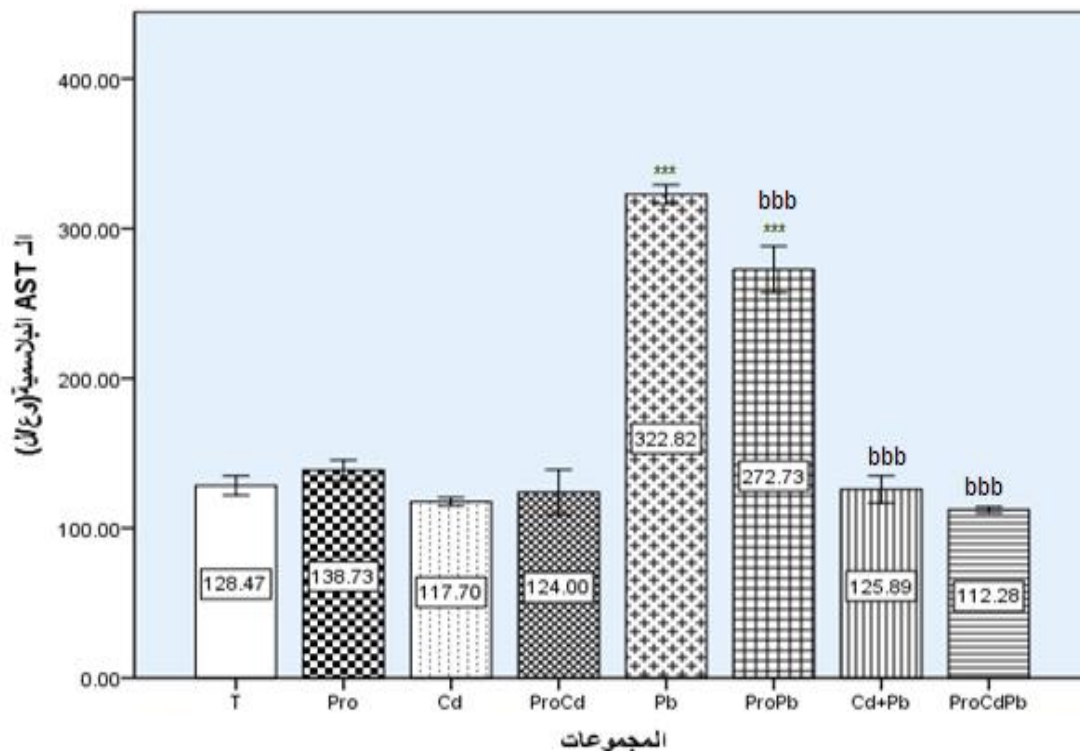


شكل 11. الوزن النسبي للكلية.

4.1. معايير النشاط الكبدي

1.4.1. إنزيم AST

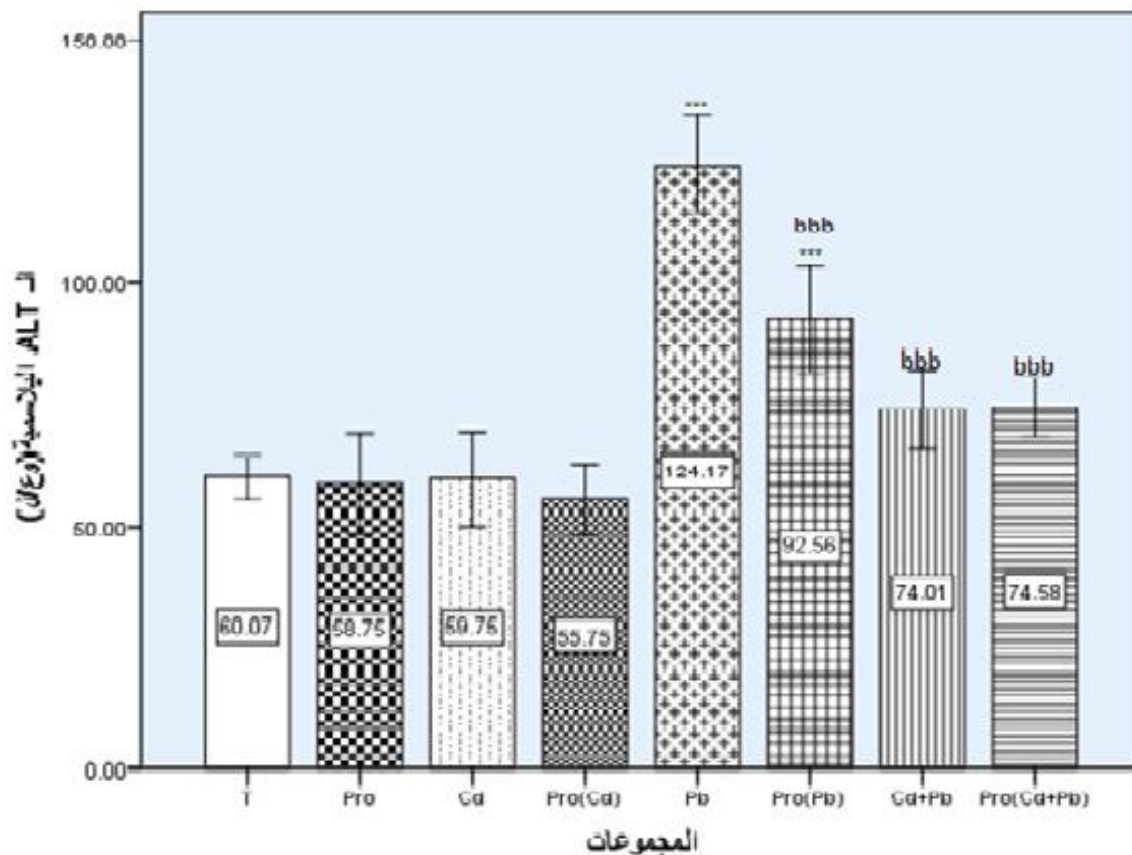
أدت المعاملة بالرصاص في مجموعة Pb إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تراكيز AST البلاسمية مقارنة بالمجموعة الشاهدة 6.36 ± 322.82 ، ولم يؤد الكاديوم في مجموعة Cd إلى أيّ تغيير معتبر في تركيز AST البلاسمية مقارنة بالمجموعة الشاهدة (T)، كما لوحظ غياب تأثير الرصاص في مجموعة المعدنين CdPb بحيث لوحظ أنّ هناك فرق معتبر ($p \leq 0.001$) في قيم AST عند هذه المجموعة بالرصاص مقارنة بمجموعة الرصاص Pb. وقد أدت المعاملة المسبقة بالعكبر للحيوانات المعاملة بالرصاص ProPb إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في AST البلاسمية 15.52 ± 272.73 مقارنة بمجموعة الرصاص غير المعاملة مسبقا بالعكبر. كما أدى خليط المعدنين في مجموعتي CdPb و ProCdPb إلى تجنّب الزيادة في قيم AST التي سببها الرصاص منفردا (شكل 12).



شكل 12. تركيز إنزيم ناقل أمين الأسبارتات البلاسمي

2.4.1. إنزيم ALT

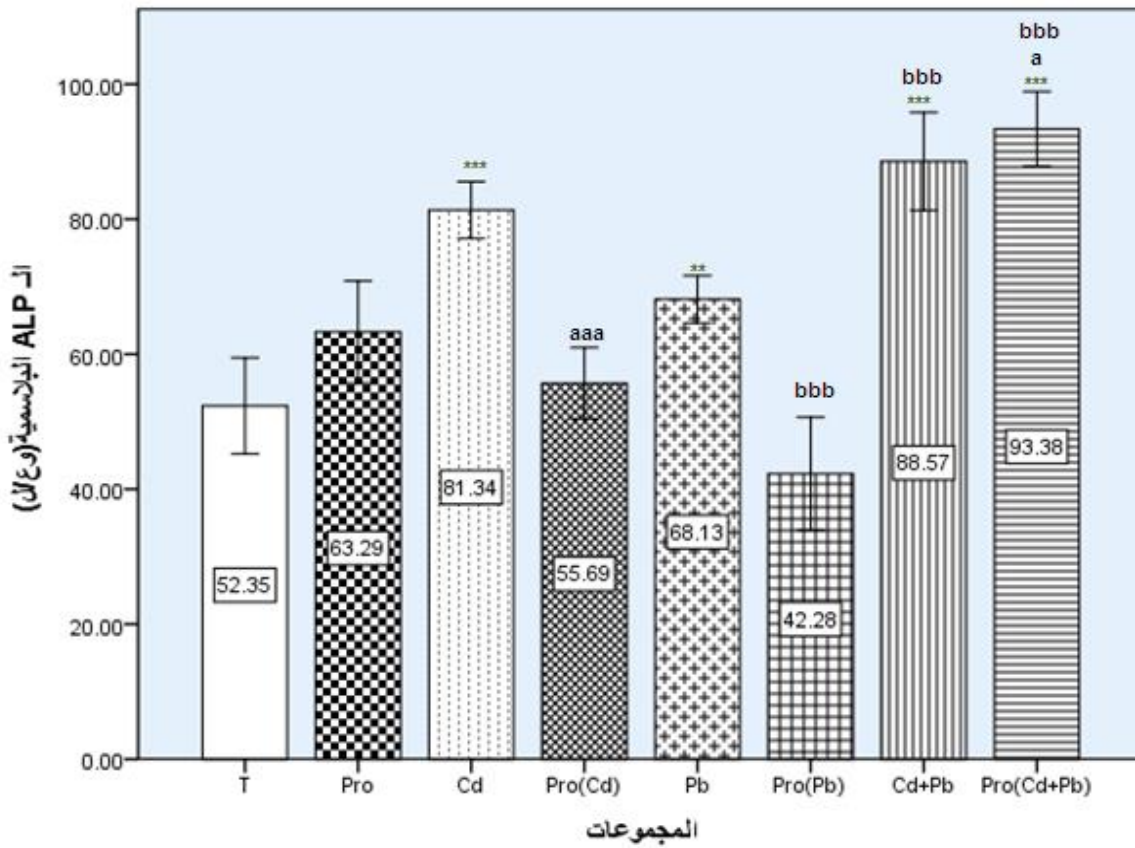
أدت المعاملة بالرصاص إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تراكيز ALT البلاسمية 9.84 ± 124.17 مقارنة بالمجموعة الشاهدة 4.51 ± 60.07 ، ولم يؤد الكاديوم في مجموعة Cd إلى أيّ تغيير معتبر في تركيز ALT البلاسمية مقارنة بالمجموعة الشاهدة، كما لوحظ غياب تأثير الرصاص على تراكيز ALT في مجموعة المعدنين CdPb بحيث لوحظ أنّ هناك فرق معتبر ($p \leq 0.001$) في قيم ALT عند هذه المجموعة بالرصاص مقارنة بمجموعة الرصاص Pb. وقد أدت المعاملة المسبقة بالعكبر للحيوانات المعاملة بالبرصاص ProPb إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في ALT البلاسمية 10.57 ± 92.56 مقارنة بمجموعة Pb. كما أدى خليط المعدنين في مجموعتي CdPb و ProCdPb إلى تجنب الزيادة في قيم ALT التي سببها خلّات الرصاص منفردة (شكل 13).



شكل 13. تركيز إنزيم ناقل أمين الألانين البلاسمي

3.4.1. إنزيم ALP

أدت أملاح المعدين في صورتها المنفردة و المجتمعمة إلى زيادة معتبرة في قيم تراكيز ALP، فقد أدى الكاديوم في مجموعة Cd إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في قيم ALP 4.21 ± 81.34 مقارنة بقيمها في المجموعة الشاهدة 7.12 ± 52.34 ، كما أدى الرصاص في مجموعة Pb إلى زيادة معتبرة عند ($p \leq 0.01$) في قيم ALP 3.50 ± 68.13 مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أدى خليط المعدين إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تراكيز ALP 7.24 ± 88.57 مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أدى العكبر دورا وقائيا في مجموعتي المعدين في صورتها المنفردة، حيث سجّل انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في تراكيز ALP عند مجموعة ProCd 5.28 ± 55.69 وكذلك عند مجموعة ProPb 8.37 ± 42.27 مقارنة بمجموعتي المعدين في صورتها المنفردة على التوالي 4.21 ± 81.34 و 3.50 ± 68.13 . وتسبب خليط المعدين إلى زيادة معتبرة في تراكيز ALP في مجموعة CdPb 5.52 ± 93.38 مقارنة بمجموعة الرصاص عند ($p \leq 0.001$)، ولم يؤدّ العكبر إلى تجنب هذا الارتفاع في تراكيز ALP الناتجة عن المعاملة بالمعدنين معا، بل أكثر من ذلك فإنّ هناك فرق معتبر ($p \leq 0.05$) في تراكيز ALP عند مجموعة ProCdPb 5.52 ± 93.38 مقارنة بقيم ALP في مجموعة Cd (شكل. 14).



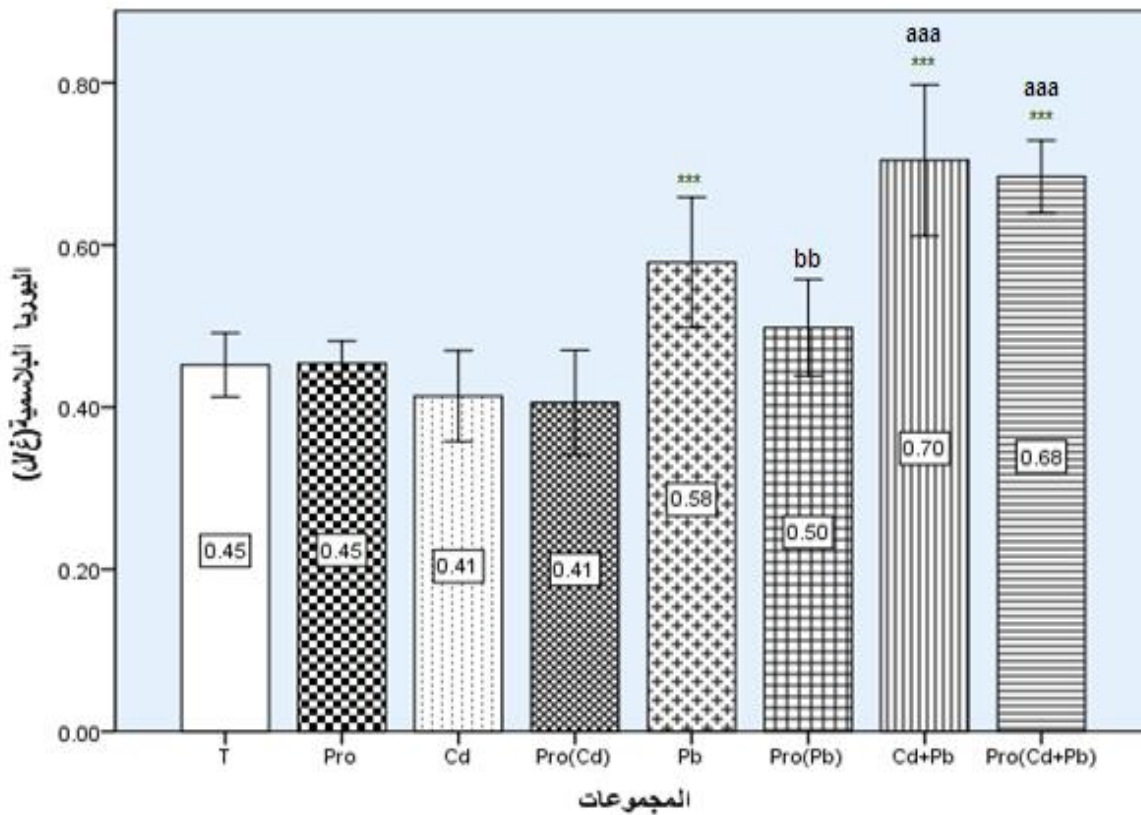
شكل 14. تركيز إنزيم الفوسفاتاز القاعدي البلاسمي

5.1 معايير النشاط الكلوي

1.5.1 اليوريا البلاسمية

لم يتسبب الكادميوم في تغيير قيم تراكيز اليوريا البلاسمية بصورة معتبرة مقارنة بالمجموعة الشاهدة بينما تسببت المعاملة بالرصاص في مجموعة Pb إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في قيم اليوريا البلاسمية (0.03 ± 0.63) مقارنة بالمجموعة الشاهدة 0.04 ± 0.45 . وأدى خليط المعدنين CdPb إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تراكيز اليوريا البلاسمية 0.04 ± 0.68 مقارنة بتراكيزها في المجموعة الشاهدة وكذلك بالمجموعة المعاملة بالرصاص. وأدت المعاملة المسبقة بالعكبر إلى منع زيادة تراكيز اليوريا بصورة معتبرة

($p \leq 0.01$) في مجموعة ProPb مقارنة بمجموعة الرصاص. ولم يتمكن العكبر من مقاومة أثر خليط المعدين في زيادة تراكيز اليوريا البلاسمية (شكل 15).

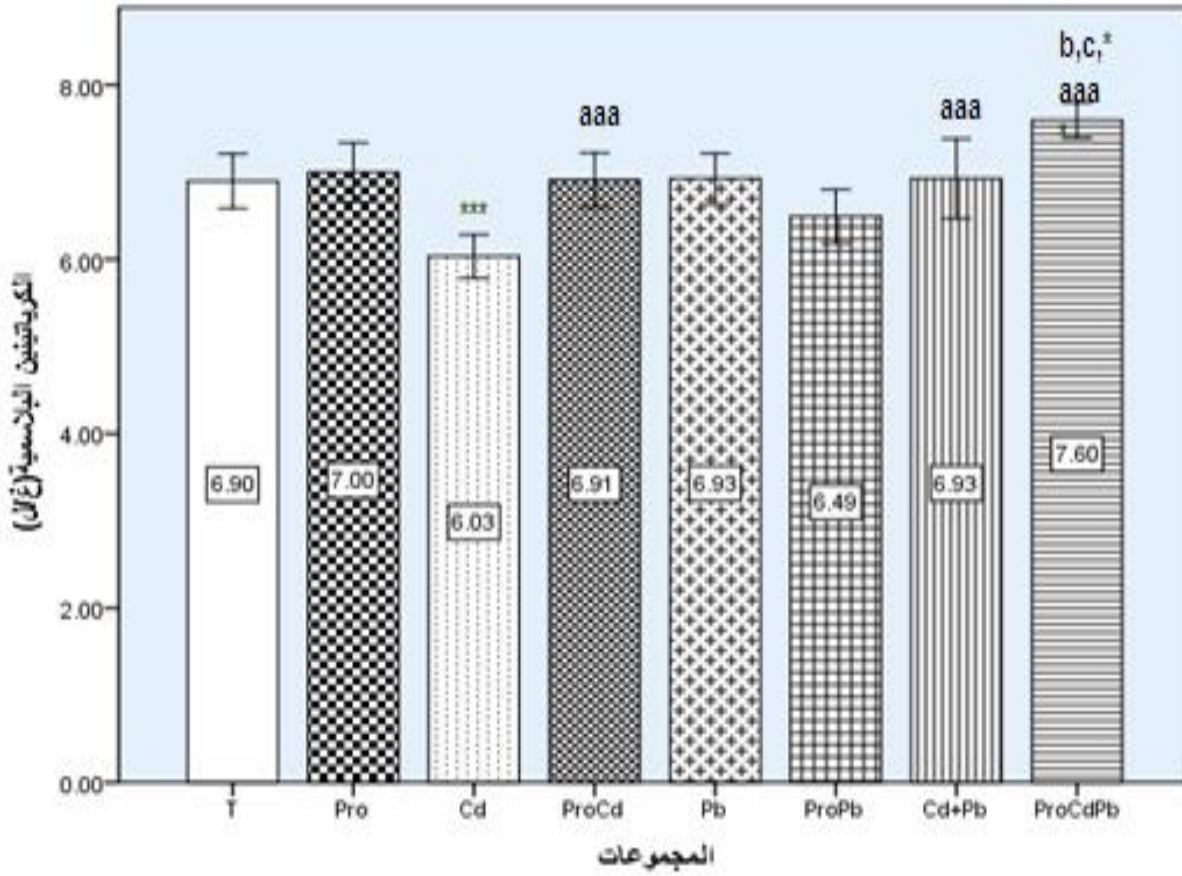


شكل 15. تركيز اليوريا البلاسمية

1. 2.5 الكرياتينين البلاسمي

تسبب الكاديوم في مجموعة Cd في تخفيض معتبر في تركيز الكرياتينين البلاسمي 0.25 ± 6.03 مقارنة بتراكيزه في المجموعة الشاهدة 0.31 ± 6.90 ، ولم يتؤد الرصاص في صورته المنفردة في مجموعة Pb إلى أي تغيير معتبر في تراكيز الكرياتينين البلاسمية مقارنة بالمجموعة الشاهدة. أما خليط المعدين في مجموعة CdPb فقد حافظ على مستوى الكرياتينين البلاسمي مقارنة بالمجموعة الشاهدة. وقد أدى العكبر إلى تحسين معتبر في مستوى الكرياتينين ($p \leq 0.001$) في مجموعة ProCd 0.31 ± 6.91 مقارنة بمستوى الكرياتينين في مجموعة Cd. أما تأثير المعاملة المسبقة بالعكبر في مجموعة ProCdPb

فقد أدى إلى زيادة معتبرة عند ($p \leq 0.05$) في تركيز الكرياتينين البلاسمي 0.2 ± 7.59 مقارنة بتركيزه في المجموعة الشاهدة و مجموعة الرصاص و مجموعة الكاديوم والرصاص (شكل. 16).



شكل. 16. تركيز الكرياتينين البلاسمي

3.5.1. الدم في البول

أظهرت نتائج معايرة البول المجمع خلال 24 ساعة ظهور الخلايا الحمراء بمعدل 50 خلية/ميكرو لتر، أما في المجموعة المعاملة الرصاص فلم تظهر هناك كريات حمراء في البول، وإنما حدث تحلل للدم وظهرت آثاره في البول (++)، أما في المجموعة المعاملة بخليط المعدين فالتأثير لم يكن بدرجة الخطورة من مجموعة الكاديوم لكنه كان أكثر حدة من المجموعة المعاملة الرصاص بحيث سجل تحلل الدم ولم تلاحظ الكريات الحمراء غير المنحلة (+++) (جدول. 3).

وقد أظهرت المعاملة المسبقة بالعكبر تأثيرا إيجابيا على حماية الكلية من آثار هذين المعدين؛ بحيث لم تبلغ درجة خروج الدم مع البول درجة ما حدث في المجموعات غير المعاملة بالعكبر.

4.5.1. البروتينات البولية

أدى الكادميوم إلى التأثير على الأنبيبات الكلوية مما سمح بخروج كمية كبيرة من البروتينات مع البول (أكبر من 3 غرام/لتر)، وكان تأثير الرصاص أقل من ذلك (3-1 غرام/لتر)، أما في المجموعة المعاملة بخليط المعدنين فيظهر أنّ هناك تضاداً بين المعدنين مما نتج عنه خروج كمية قليلة من البروتينات مع البول (0.3 غرام /لتر).

لم يؤد العكبر إلى حماية الكلية كلياً بحيث سمح بخروج البروتينات في مجموعتي الكادميوم والرصاص ولكن بدرجة أقل من المجموعات غير المعاملة بالعكبر (جدول. 3).

5.5.1. الأجسام الكيتونية

سجّل ارتفاع في تركيز الأجسام الكيتونية (1-0.3 غرام/لتر) في المجموعة المعاملة بخلات الرصاص ولم يسجّل هذا الارتفاع في المجموعات الأخرى. وقد أدى العكبر إلى الحماية من تكوين الأجسام الكيتونية وخروجها مع البول (جدول).

جدول 3. نتائج المعايرة البولية

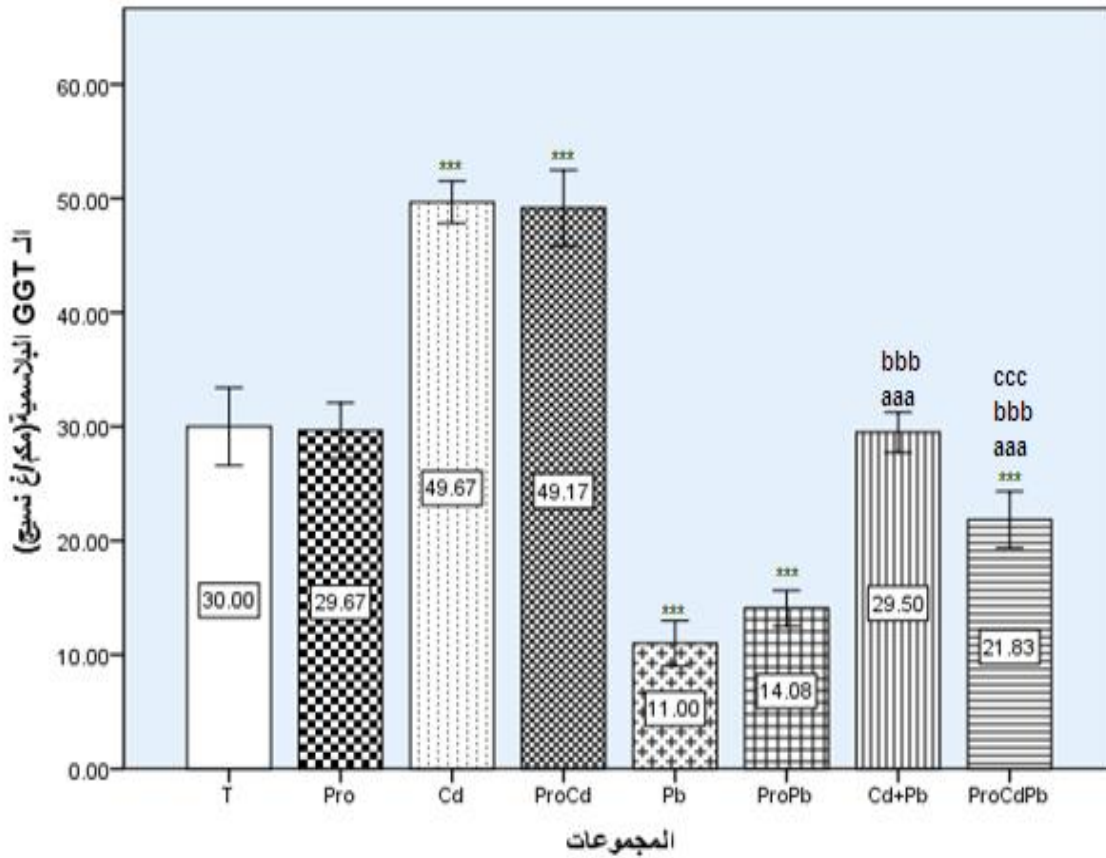
المجموعات	المعايير	الدم	البروتينات	الأجسام الكيتونية
T	مهملة	مهملة	مهملة	مهملة
Pro	مهملة	مهملة	مهملة	مهملة
Cd	50 كرية/ميكرو لتر	< 3 غ/ل	مهملة	مهملة
Pro(Cd)	تحلل +++/++	< 3 غ/ل	مهملة	مهملة
Pb	تحلل ++/+	3-1 غ/ل	10-3 ملغ/دسل	مهملة
Pro(Pb)	مهملة	1 غرام/ل	1.5-0.5 ملغ/ديسيلتر	مهملة
Cd+Pro	تحلل (+++)	مهملة	مهملة	مهملة
Pro(Cd+Pb)	تحلل (++)	مهملة	مهملة	مهملة

6.1. معايير الإجهاد التأكسدي

1.6.1. إنزيم GGT

أدى الكادميوم في مجموعة Cd إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تركيز GGT البلاسمية 1.86 ± 49.67 مقارنة بالمجموعة الشاهدة 3.41 ± 30.00 . أما الرصاص فأدى في مجموعة الرصاص إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في GGT البلاسمية 2.00 ± 11.00 مقارنة بالمجموعة الشاهدة. وقد عمل خليط المعدنين في مجموعة CdPb على منع التغير المعتبر في تركيز GGT البلاسمية مقارنة بالمجموعة الشاهدة، وهذا ما نتج عنه حدوث فرق معتبر ($p \leq 0.001$) في تركيز GGT البلاسمية في هذه المجموعة 1.76 ± 29.50 مقارنة بمجموعتي الكادميوم و الرصاص.

ولم يؤد العكبر إلى تأثير معتبر في مجموعتي ProCd و ProPb مقارنة بالمجموعة الشاهدة، بينما أدى العكبر إلى فروق معتبرة ($p \leq 0.001$) في تركيز GGT البلاسمية 2.48 ± 21.83 في مجموعة ProCdPb مقارنة بجميع المجموعات الأخرى (شكل. 17).

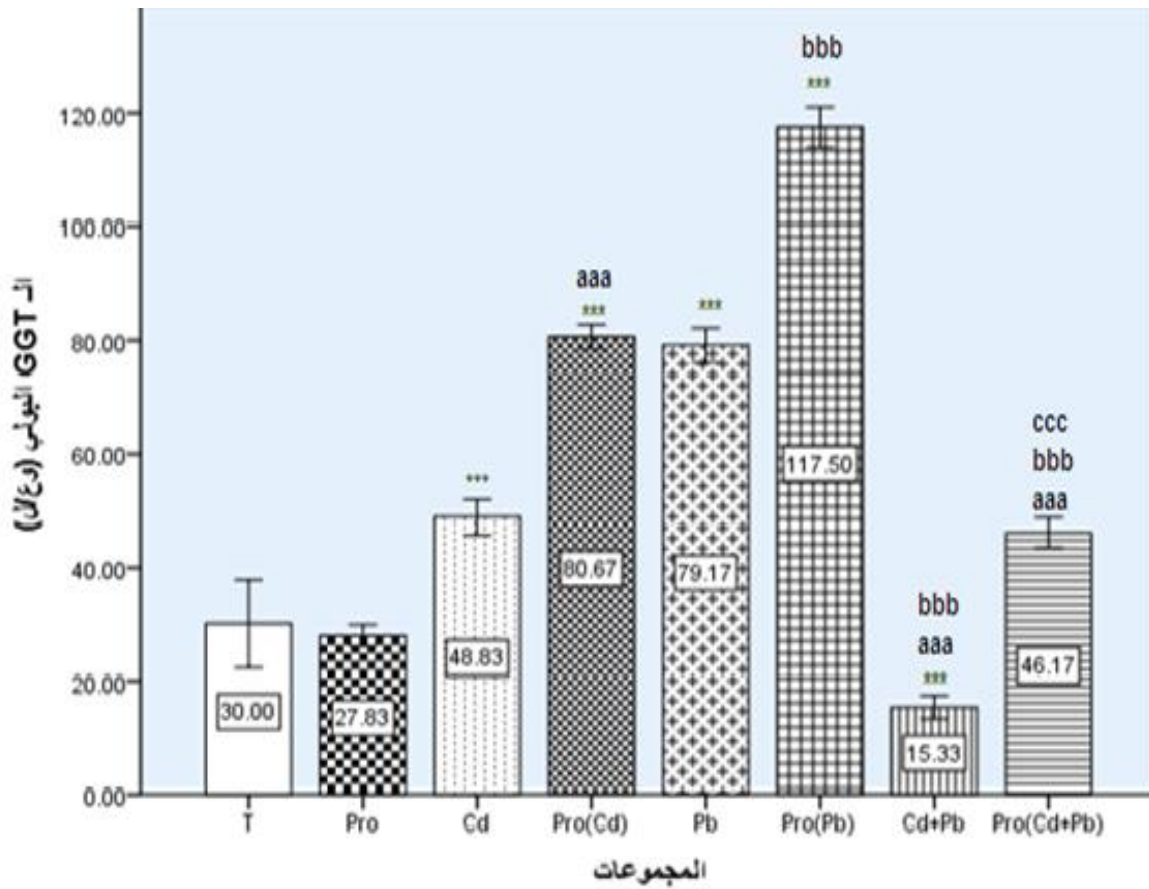


شكل 17. تركيز إنزيم ناقل الببتيد جاما جلوتاميل البلاسمي

2.6.1. نشاط إنزيم GGT البولي

أدى الكاديوم في مجموعتي Cd و Pb إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تركيز GGT البولية 3.06 ± 48.83 و 3.06 ± 79.17 على التوالي مقارنة بالمجموعة الشاهدة 7.82 ± 30.00 . أما خليط المعدنين في مجموعة CdPb فقد أدى إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في تركيز GGT البولية

مقارنة بالمجموعات الشاهدة و Cd و Pb . أما المعاملة المسبقة بالعكبر لجميع الجرذان المعاملة بالمعدنين بصورة مفردة أو مرفقة فقد أدت إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تراكيز GGT البولية ProCd و ProPb و ProCdPb والتي كانت على التوالي 2.16 ± 80.67 و 3.56 ± 117.50 و 2.56 ± 46.17 مقارنة بالحيوانات غير المعاملة بالعكبر (شكل.18).

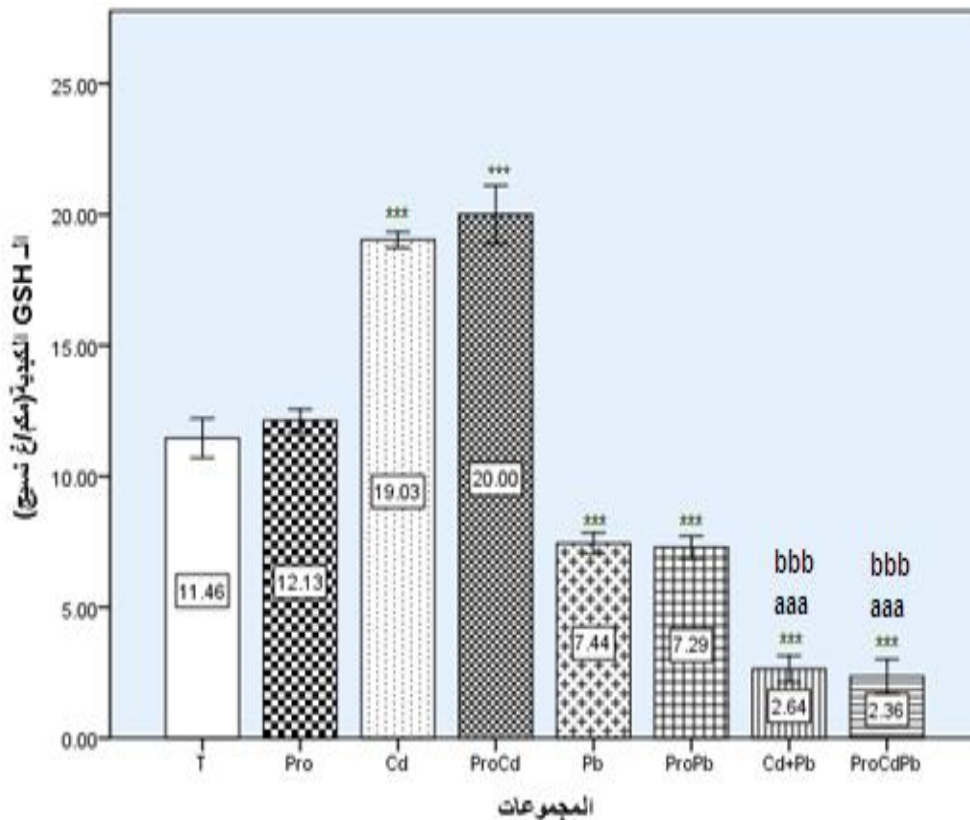


شكل.18. إنزيم ناقل الببتيد جاما جلوتاميل البولي

3.6.1. الجلوتاثيون المرجع (GSH) الكبدى

أدت المعاملة بالكاديوم في مجموعة Cd إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تركيز الجلوتاثيون المرجع الكبدى 0.31 ± 19.03 مقارنة بالمجموعة الشاهدة 0.77 ± 11.45 . وأدى الرصاص في مجموعة Pb إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) 0.40 ± 7.44 مقارنة بالمجموعة الشاهدة. كما أدى مزيج المعدنين إلى

انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) للجلوتاثيون المرجع 0.50 ± 2.64 مقارنة بالمجموعة الشاهدة. وبيّنت النتائج أنّ العكبر لم يظهر أيّ أثر وقائي معتبر ضدّ هذه التغيّرات في تراكيز الجلوتاثيون في جميع المجموعات المعاملة بالمعدنين سواء في صورتها المفردة أو المجتمعة (شكل. 19).

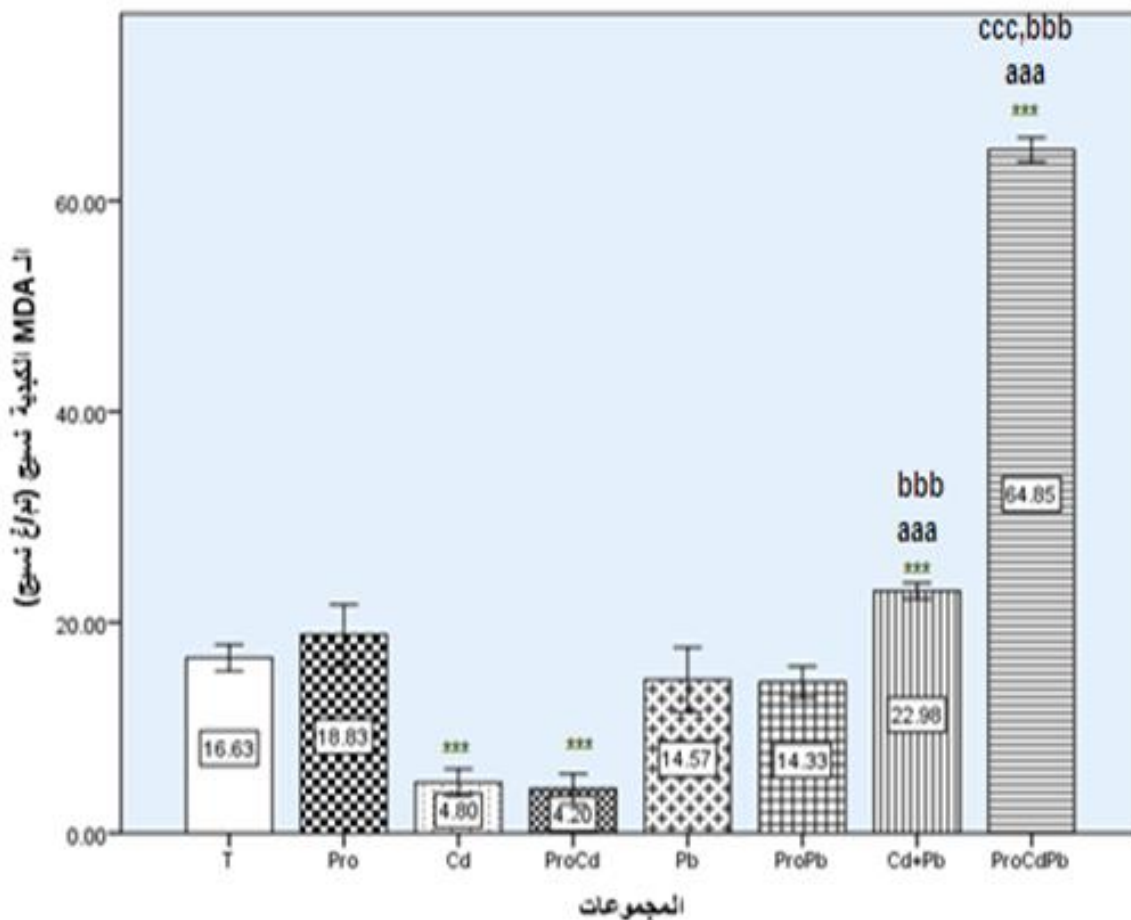


شكل 19. تركيز الجلوتاثيون المرجع الكبدية

4.6.1. المألون ثنائي الأدهيد الكبدية

أظهرت النتائج أنّ المعاملة بالكاديوم Cd أدت إلى انخفاض معتبر ($p \leq 0.001$) في تركيز MDA الكبدية 1.29 ± 4.80 مقارنة بالمجموعة الشاهدة 1.26 ± 16.63 ، بينما لم يؤدّ الرّصاص في مجموعة Pb إلى أيّ فرق معتبر مقارنة بالمجموعة الشاهدة. وبيّنت النتائج أنّ خليط المعدنين في مجموعة CdPb تسبّب في ارتفاع تركيز MDA الكبدية 0.76 ± 22.98 وبصورة معتبرة ($p \leq 0.001$) مقارنة بالمجموعات الشاهدة T و Cd و Pb 3.05 ± 14.57 بينما أدّى العكبر في مجموعة ProCdPb إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في

تركيز MDA الكبدية 64.85 ± 1.17 مقارنة بالمجموعات الشاهدة والمعاملة بملحي المعدنين سواء في صورتها المنفردة أو المجتمعة (شكل 20).

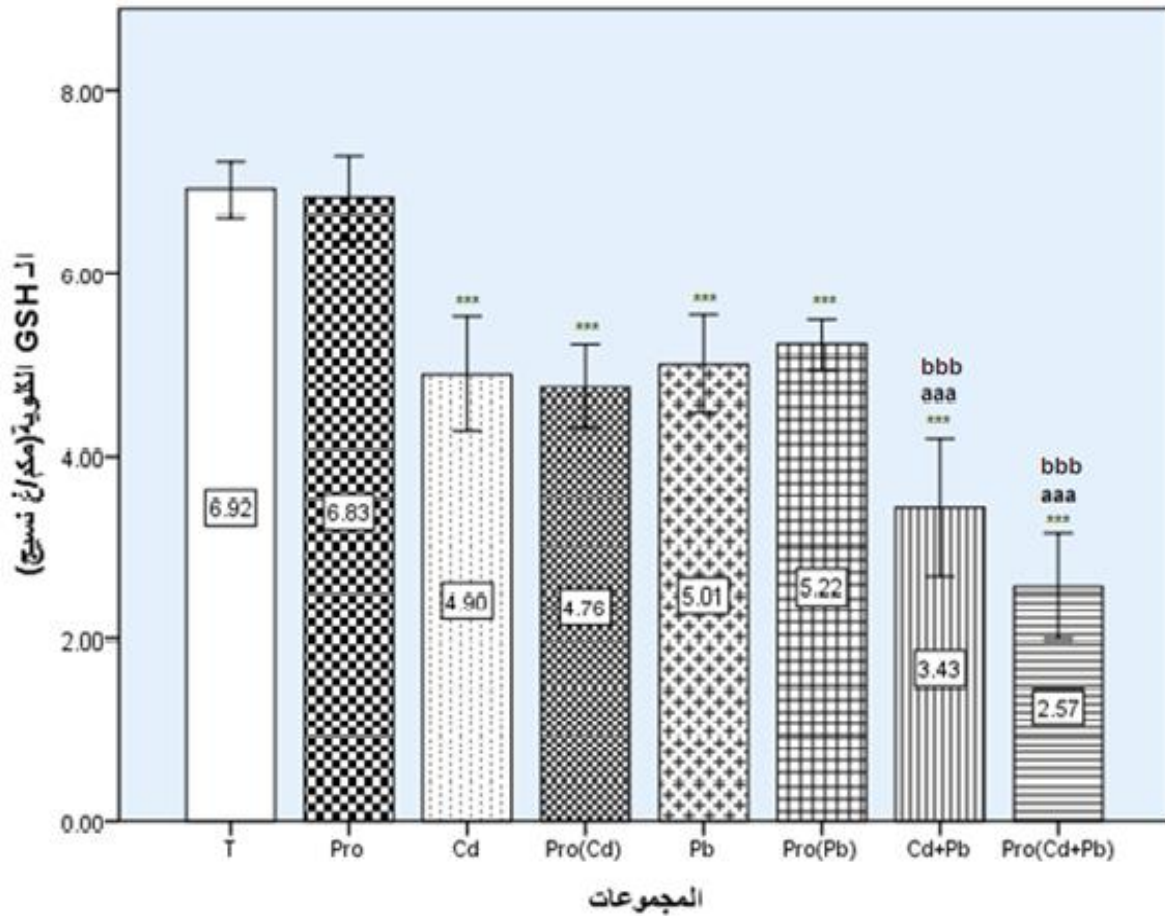


شكل 20. تركيز المألون ثنائي الأدهيد الكبدية.

5.6.1 الجلوتاثيون المرجع GSH الكلوي

أدت المعاملة بالكاديوم والرصاص في صورة منفردة أو مجتمعة إلى انخفاض معتبر ($P \leq 0.001$) في تراكيز الجلوتاثيون الكلوي 0.63 ± 4.89 و 0.54 ± 5.01 و 0.74 ± 3.43 على التوالي مقارنة بالمجموعة الشاهدة 0.30 ± 6.92 . وأظهرت النتائج أن خليط المعدنين أدى إلى زياد معتبرة ($p \leq 0.001$) من نسبة الانخفاض في الجلوتاثيون الكلوي 0.74 ± 3.43 مقارنة بالمجموعتين اللتين عوملتا بالمعدنين في صورتها المنفردة. وبيّنت النتائج أن العكبر لم يظهر أي أثر وقائي معتبر ضدّ هذا الانخفاض في تركيز الجلوتاثيون

في جميع المجموعات المعاملة بالمعدنين سواء في صورتها المنفردة أو المجتمعة (شكل 21).

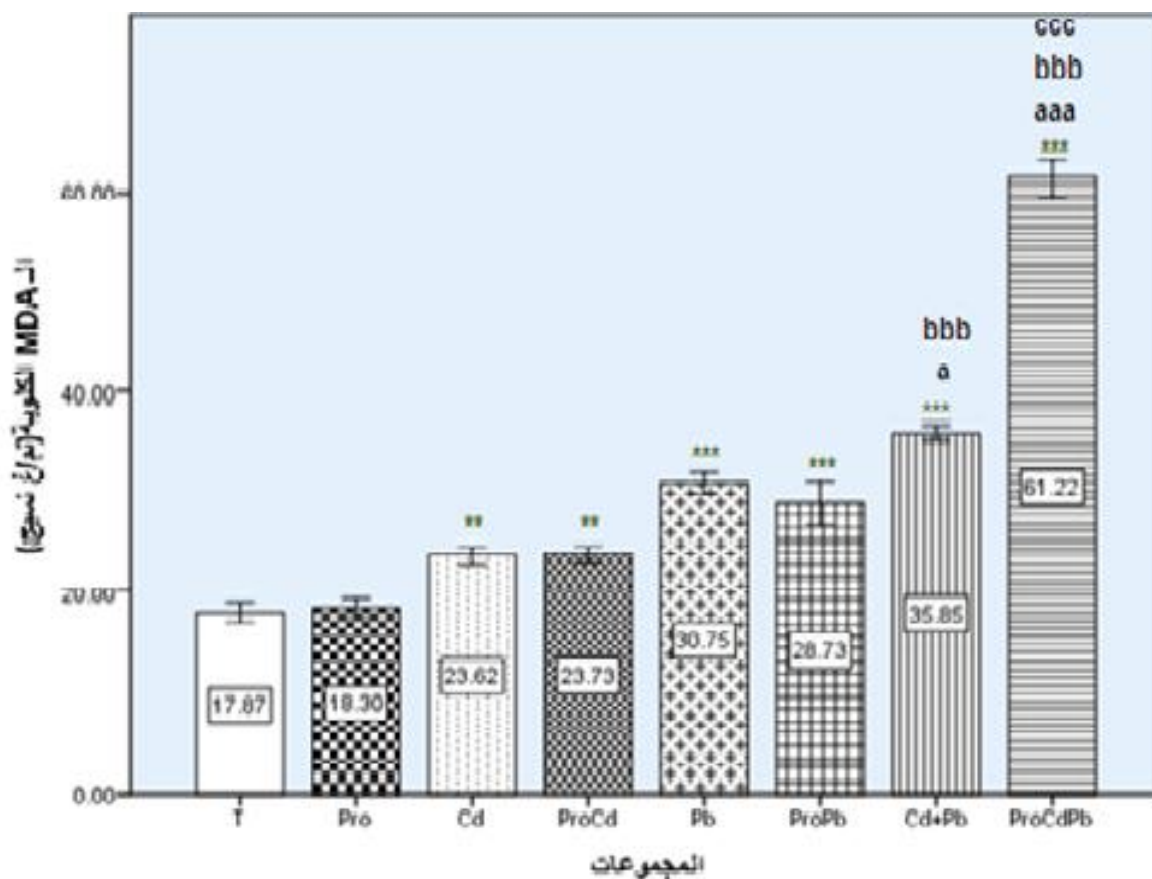


شكل 21. تركيز الجلوتاثيون المرجع الكلوي

6.6.1 المألون ثنائي الأدهيد (MDA) الكلوي

أظهرت النتائج أنّ المعاملة بكلوريد الكاديوم Cd أدت إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.01$) في تركيز MDA الكلويّة مقارنة بالمجموعة الشاهدة T 1.00 ± 17.87 ، بينما أدت خلاّت الرصاص منفردة Pb ومجموعة مع كلوريد الكاديوم CdPb إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تركيز MDA الكلوي 1.07 ± 30.75 و 0.74 ± 35.85 على التوالي مقارنة بالمجموعة الشاهدة. وبيّنت النتائج أنّ خليط المعدنين تسبّب في ارتفاع تركيز MDA الكلوي وبصورة معتبرة ($p \leq 0.001$) و ($p \leq 0.05$) مقارنة بمجموعة الكاديوم ومجموعة الرصاص على التوالي.

أدت المعاملة المسبقة بالعكبر إلى التقليل من الزيادة في كمية MDA الكلوية في مجموعة ProCd بحيث لم يظه فرق معتبر بينها وبين المجموعة الشاهدة. بينما أدى العكبر في المعاملة مسبقا بالعكبر ثم بملحي المعدنين ProCdPb إلى زيادة معتبرة ($p \leq 0.001$) في تركيز MDA الكلوية 1.67 ± 61.21 مقارنة بالمجاميع الشاهدة والمعاملة بملحي المعدنين سواء في صورتها المنفردة أو المجتمعة (شكل. 22).



شكل. 22. تركيز المألون ثنائي الألدheid الكلوي.

2. مناقشة النتائج

1.2. تغير الأوزان

بيّنت نتائج الدراسة أن الكادميوم يسبّب فقداناً معتبراً في أوزان الحيوانات دون أن يمسّ ذلك وزن الكبد. بينما على العكس من ذلك، سجّلنا زيادة معتبرة في وزن الكلى. والتأثير السلبي على أوزان الحيوانات وكذلك زيادة وزن الكلى بفعل الكادميوم يتوافق مع نتائج Gabr وآخرون (2017). قد سجّل Berroukche وآخرون (2019) فقداناً في وزن الحيوانات أثناء معاملتها بكبريتات الكادميوم وهذا يتوافق تماماً مع نتائجنا. وقد يعود سبب فقدان الوزن في حالة دراستنا إلى تأثير سميّة الكادميوم على أيض البروتينات والدهون (Erdogan *et al*, 2005)، كما يمكن إيعازه إلى فقدان الشهية مما أدى إلى انخفاض كمية الغذاء المتناولة والتأثير السلبي على الامتصاص المعوي وكذلك انخفاض مستوى البروتين والإسهال الحاد، وقد لوحظ في دراستنا ميوهة البراز في مجموعة الكادميوم وكذلك تمّ تسجيل نسبة كبيرة من البروتينات في البول وهذا يتوافق مع نتائج Josthna وآخرون (2012) و Sugawara وآخرون (1981) و Karmakar و Chatterjee، (1998) و كذلك Berroukche (2019). أما الزيادة وزن الكلى بفعل الكادميوم فيتوافق مع نتائج Gabr وآخرون (2017) و Alhalawat (2016)، ويعود ذلك إلى تراكم الكادميوم في الكلى (Karmakar and Chatterjee, 1998؛ Sugawara *et al*, 1981).

أما تأثير الرصاص على وزن الحيوانات فقد سجّلنا انخفاضاً غير معتبر في الوزن المكتسب للحيوانات، بينما أشارت دراسات سابقة إلى أنّ الرصاص يسبب انخفاضاً معتبراً في الوزن المكتسب للحيوانات (Ahlawat، 2016؛ Josthna، 2012). وقد أشار Alwaleedi، (2016) بناء على نتائج دراسته على الفئران إلى أنّ وزن الحيوانات المعرضة للرصاص أقلّ بكثير من المجموعة الشاهدة، وأنّ ذلك يتناسب مع زيادة الجرعة المتناولة وقد يكون فقدان الوزن الملاحظ بسبب تداخل في عمليتي الامتصاص والتمثيل

الغذائي للعناصر الغذائية الأساسية للجسم. كما سجّل Alwaleedi (2016) أيضا زيادة معتبرة في وزن الكبد والكلى بفعل تأثير الرصاص؛ وأرجع ذلك إلى تأثير الرصاص على نخر وموت الخلايا المبرمج والذي يرافق بتراكم الدهون.

يتعرض البشر لخليط المواد الكيميائية بدلاً من المواد الكيميائية المنفردة، وبالتالي من المهم تحديد ما إذا كانت الخلائط الكيميائية تنتج تأثيرا أكثر وضوحاً مقارنةً بالمواد الكيميائية غير الممزوجة. قد ينطوي التعرض المشترك للكاديوم والرصاص على تظافر أو تعارض محتمل أو آثار مضافة أو آثار جديدة لم يتم ملاحظتها أثناء التعرض لهذين المعدنين كل على حدى (Andjelkovic et al, 2019).

هناك تباين واسع بين نتائج الدراسات السابقة في تأثير خليط الكاديوم والرصاص سواء على أوزان الحيوانات أو أعضائها المختلفة خاصة الكبد والكلى وهذا باختلاف طريقة الامرار والجرعة المتناولة ومدة التعرض وإلى عوامل أخرى. فقد سجلنا تباينا واضحا بين تأثير المعدنين في صورتها الفردية وفي صورتها المجتمعة على أوزان الحيوانات وأوزان الكبد والكلى. عمل الخليط على التقليل من تأثيرات المعدنين خاصة الكاديوم على وزن الحيوانات والكلى، بينما أظهر زيادة معتبرة في وزن الكبد لم تلاحظ في المجموعات المعاملة بأملاح الكاديوم والرصاص في صورتها الفردية، وهذا يتباين مع نتائج Josthna وآخرون (2012) الذين بينوا أن خليط المعدنين يتسبب في تقاوم انخفاض وزن الحيوانات وقد يعود الاختلاف في النتائج إلى مدة التعرض للمعدنين وإلى تركيز الجرعة، وقد تفسر نتائجنا بأن الجرعة المرتفعة من الكاديوم قد تؤدي إلى تخفيض امتصاص الرصاص والكاديوم في الجهاز الهضمي في حالة امرارهما معا (Mahaffey et al, 1981).

إن المعاملة بالعكبر لم تكن لها الأثر المعتبر في أوزان الحيوانات والعضوين المدروسين في المجموعات المعاملة بالمعدنين في صورتها المفردة لكن سجل تحسين معتبر لأثر هذين المعدنين في حالة اجتماعهما مقارنة بما هو عليه في صورتها الفردية سواء في وزن الحيوانات أو وزن الكبد والكلى.

يقوم العكبر كمخلب لبعض المعادن وكعامل وقائي لأثر المعادن الثقيلة (Geckil *et al*, 2005)، ففي دراسة على التأثير الوقائي للعكبر على التسمم بالزئبق لوحظ تأثير إيجابي على الكلى والكبد مما جعل الباحثين يقرّون أنّ العكبر يمكن استخدامه كبديل لإزالة آثار هذا المعدن وآثار المعادن الثقيلة الأخرى (Piedra *et al*, 2018).

2.2. تأثيرات الكاديوم والرصاص على المعايير الكيميائية الحيوية

لتقييم تأثير الرصاص والكاديوم على وظائف الكبد، وجب قياس نشاط إنزيمي AST و ALT في المصل. يستخدم AST على نطاق واسع لتقييم وظيفة الكبد. ALT هو إنزيم سيتوبلازمي، في حين AST يوجد في كلّ من ميتوكوندريا وسيتوبلازم الخلايا الكبدية بالإضافة إلى وجوده في عضلة القلب حيث يعدّ مصدرا آخر يطرح في الدم (Porth and Matfin, 2009). الارتفاع في نشاط إنزيمي ALT و AST في مجموعة الرصاص قد يكون بسبب الزيادة في نفاذية غشاء الخلية الكبدية أو تلفها تحت تأثير الرصاص. هذه النتائج تتفق مع الدراسات السابقة التي ذكرت الارتفاع في مستويات AST و ALT بعد المعاملة بالرصاص بسبب التهاب الكبد الحادّ واليرقان وتليف الكبد. الرصاص له تأثير سمّي على الكبد ممّا يؤدي إلى تلف الخلايا الكبدية، والذي يسبب زيادة في مستويات مصل AST و ALT (Abdou *et al*, 2007)، فقد لوحظ أنّ الرصاص له آثار سامة على كبد الفئران، ممّا يؤدي إلى تحرير AST و ALT

(Shalan *et al*, 2005). النشاط العالي لانزيمي AST و ALT البلاسمية مرتبط بزيادة سيولة الغشاء الميكروزمي للكبد، ممّا ينتج عنه تحرير الجذور الحرة واضطراب أو خلل في الخلايا الكبدية عند المعاملة بخلات الرصاص (Ibrahim *et al*, 2012). إنّ زيادة نشاط ALT و AST قد يكون ناجما عن سمية خلّات الرصاص، والتي تسبب زيادة معدّل الأيض القاعدي الخلوي وتهيج كبدي ثمّ تلف خلوي

(Elayat and Bakheelf, 2010). لم نلاحظ أيّ ارتفاع في نشاط إنزيمي AST و ALT بفعل الكادميوم

وهذا يتوافق مع نتائج Pandi وآخرون (2001)؛ Sivaprasad (2004) و Zhu وآخرون (2014)، ويتعارض مع نتائج Yuan وآخرون (2014) وكذلك Cobbina وآخرون (2015).

سجلنا ارتفاع نشاط إنزيمات AST و ALT المصلية بفعل الرصاص (Carocci et al, 2016). أمّا خليط

الكادميوم والرصاص فقد أثر على إنزيمات النشاط الكبدية بصورة أقلّ من خلاّت الرصاص بدرجة معتبرة

بل أكثر من ذلك فالنتائج قريبة من المجموعة الضابطة، وهذا يطرح استفسارا عن ماهية العلاقة المتبادلة

بين عنصر الكادميوم والرصاص، في هذه الحالة وتحت هذه الظروف، فيبدو أنّ الكادميوم يؤثّر بطريقة

ما على التأثير السميّ للرصاص، كما أنّ الكادميوم بهذا التركيز المرتفع وفي هذه المدة الطويلة قد أدى

إلى نتائج مغايرة لما هو متوقع وتمّ ملاحظته في دراسات Brzóska وآخرون (2003) و Injac و

Strukelj (2008).

لقد أظهر العكبر بعض الحماية ضدّ خروج إنزيمات النشاط الكبدية إلى الدم، بحيث تمكّن من حماية

الكبد من التلف بدرجة معينة من التلف ويعود ذلك إلى مكوناته التي تحمي الخلايا الكبدية من تكوين أو

تحرير الجذور الحرة المسببة للإجهاد التأكسدي مما ينتج عنه تلف في تركيب الغشاء الخلوي وخاصة على

مستوى الفوسفوليبيدات المكوّنة له.

يحتوي إنزيم ALP على ثلاثة أيونات معدنية هي أيونين من الزنك وأيون المغنيزيوم تتمركز في المركز

النشط للإنزيم، وقد ثبت في دراسات سابقة (Trevino et al, 2015) أنّ ALP يثبّط بواسطة الكادميوم. تعتبر

مستويات ALP هي أيضًا من المعايير المحددة لنشاط ووظيفة الخلايا الكبدية وزيادة نشاط إنزيم

ALP المصلي المرتبط بزيادة إنتاجه بسبب زيادة الضّغط في القنوات الصفراوية

(Renugadevi and Prabu, 2010). الزيادة في نشاط ALP المصلي ناتج عن خلل واضطراب في الكبد والكلى ونخاع العظم والذي يرتبط بتحرير ALP (Kaplan and Righetti, 1970)، هذه النتائج تتوافق مع نتائج Shalan وآخرون (2005) والتي نتج فيها تحفيز ALP في الجرذان تحت تأثير الرصاص. كما سجل ارتفاع في تركيز ALP في المجموعة المعاملة بملحي المعدين وهذا يتعارض مع نتائج Andjelkovic (2019)، وقد يعود السبب إلى تركيز الجرعة ومدّة المعاملة. أمّا فعالية العكبر في حماية الكبد من تسرب ALP إلى الدم بسبب خلل في الخلايا الكبدية فقد ظهرت عند الحيوانات المعاملة بالمعدنين في صورتها المفردة، أمّا عند الحيوانات المعاملة بخليط المعدنين فلم يتمكن العكبر من الحماية ضدّ الضرر التأكسدي ومنع ALP من الانتقال إلى الدم. ففي دراسة على تأثير العكبر الوقائي على مجموع المعايير البيوكيميائية المصلية (AST و ALT و ALP و LDH و GGT) بعد التسمّم بالزئبق، سجل انخفاض في نشاط هذه الإنزيمات وهذا دليل على حماية الخلايا الكبدية من التلف الذي يسببه الزئبق (Zhao et al, 2009).

3.2. تأثيرات الكادميوم و الرصاص على النشاط الكلوي

السمية الكلوية للكادميوم تعود لتراكمه في الكلى بنسبة كبيرة، وتحركه يكون في صورة أيونية حرّة أو مرتبط بنواقل مثل الألبومين والميتالوثيونين والجلوتاثيون. والأنبيبات الكلوية القريبة هي الأجزاء المتأثرة بشكل أساسي بسمية الكادميوم وهي المرتبطة بإطراح السكريات والأحماض الأمينية في البول، وهذا ما سجل في دراستنا بحيث سجل تواجد كمية كبيرة من البروتينات في البول عند المجموعة المعاملة بالكادميوم وكذلك احتواء البول على الدم، كما أنّ الاختبارات المصلية كشفت عن انخفاض في كمية الكرياتينين المصلية وقد يعود ذلك إلى التلف الذي اصاب الخلايا الكبدية، وبالتالي إمكانية خروجه مع البول. وتباينت نتائجنا مع نتائج Alwaleedi (2016) التي سجلت ارتفاعا في تركيز الكرياتينين واليوريا المصلية عند الحيوانات المعاملة بالكادميوم.

وقد لوحظ ارتفاع في تركيز اليوريا في المجموعة المعاملة بالرصاص، كما سجّل أيضا مرور كمية كبيرة من البروتينات مع البول وهذا أيضا يتوافق مع نتائج Alwaleedi (2016).

كما أنّ المجموعة المعاملة بخليط المعدنيين سجّل عندها ارتفاع نسبة البروتينات المتسرّبة مع البول والذي يتوافق مع نتائج الدراسة السابقة نفسها.

أدى العكبر إلى تخفيض أثر الكاديوم والرصاص على الكلى عند الحيوانات المعرضة للعنصرين بصورة فردية، لكن لم يؤدي إلى ذلك في حالة خليط المعدنيين.

4.2. تأثيرات الكاديوم و الرصاص على الإجهاد التأكسدي

لقد أظهرت نتائج الدراسة انخفاضاً في MDA الكبدية بفعل كلوريد الكاديوم، وهذا استثناء للإجهاد التأكسدي الذي يسببه الكاديوم، وتتوافق هذه النتائج مع دراسات Shibutani وآخرون (2001) و kawagoe وآخرون (2005)؛ Haouem و El Hani (2013)، وتتعارض هذه النتائج مع نتائج دراسات أخرى التي سجّلت ارتفاع فوق أكسدة الدهون في الكبد تحت تأثير الكاديوم (Shibutani et al, 2001)؛ Hamoud et al, 2017). بالمقابل، فإننا سجّلنا زيادة في كلّ من تركيز الجلوتاثيون المرجع الكبدي و GGT البلاسمي وتدعم هذه النتائج بنتائج دراسات kawagoe وآخرون (2005)؛ El Hani و Esrefoglu وآخرون (2007). وقد يعود سبب زيادة تركيز الجلوتاثيون المرجع إلى زيادة نظام نسخ GGT والمسؤول عن عملية إنتاج جلوتاثيون (Esrefoglu et al, 2007). إنّ التعرّض المزمن للكاديوم يختلف عن التعرّض الحادّ للكاديوم (Patra et al, 2011). فالأنواع الأوكسجينية النشطة الناتجة عن التسمّم بالكاديوم هي السبب في الأضرار التي يحدثها الكاديوم. هناك أدلة مباشرة على توليد الجذور الحرّة في الحيوانات بعد التراكم الحادّ للكاديوم، كما أنّ هناك دليلاً غير مباشر على تورّط ROS في سمية الكاديوم المزمنة والسرطان. فالتسمّم بالكاديوم يؤدي إلى تحرير أنيون فوق الأوكسيد وبيروكسيد

الهيدروجين وجذور الهيدروكسيل عند الكائن الحي، ويرافق هذا تنشيط نسخ العوامل الحساسة للأكسدة والإرجاع مثل NF-κB و AP-1 و Nrf2، وتغيير التعبير الجيني ذو الصلة بـ ROS. ومن المتفق عليه عموماً أنّ الإجهاد التأكسدي يلعب أدواراً مهمّة في التسمّم الحادّ بالكادميوم. ومع ذلك، فإنّ الأدلّة المباشرة على الإجهاد التأكسدي غالباً ما تكون غامضة بعد المستويات المنخفضة وطويلة الأجل ذات الصلة بالبيئة من التعرّض لعنصر الكادميوم. التعديلات في التعبير الجيني المرتبط بـ ROS أثناء التعرّض المزمن هي أيضاً أقلّ أهميّة بالمقارنة مع التسمّم الحادّ للكادميوم. ربما يرجع ذلك إلى آليات التكيف المستحثّة مثل الإفراط في التعبير عن ميتالوثيونين والجلوتاثيون في أعقاب التعرّض المزمن للكادميوم، والذي بدوره يقلّل من الإجهاد التأكسدي الناجم عن الكادميوم. لقد تمّ الكشف عن إشارات ضعيفة بواسطة اختبارات الفلورة لعناصر ROS في الخلايا المتحوّلة بالتسمّم المزمن بالكادميوم، فتحمل الموت الخلوي المبرمج المكتسب يجعل الخلايا التالفة تتكاثر مع آفات الحمض النووي المؤكسدة الكامنة، ممّا يحتمل أن يؤدّي إلى حدوث ورم سرطاني. هذه الأنواع الأكسجينية النشطة الناتجة خلال تراكم الكادميوم الحادّ تلعب دوراً كبيراً في تلف الأنسجة. التكيف مع التسمّم المزمن بالكادميوم يخفض من إنتاج ROS، ولكن تحمل الكادميوم المكتسب مع تعبير الجينات الشاذّة يلعب دوراً مهمّاً في التسمّم المزمن بالكادميوم والتسرطن (Patra et al, 2011).

على عكس الكبد، أظهرت الكليتان في الجرذان المعرّضة لكلوريد الكادميوم مستويات عالية من MDA مقارنة مع الشاهدة، مما يدلّ على تكثيف عملية أكسدة الدهون في الكليتين تحت تأثير الكادميوم المتسبّب في تحرير الجذور الحرّة (Haouem and ElHani, 2013)، هذا يتفق مع دراسات Ursini وآخرون (1995) و Amara وآخرون (2006) و Santos وآخرون (2004). وبالتوازي مع هذه الزيادة في MDA سجّلنا انخفاضاً في مستويات GSH في كلى الجرذان المعرّضة لكلوريد الكادميوم. وهذا يتوافق مع نتائج Haouem و ElHani (2013)؛ Koyutürk وآخرون (2006)؛ El-Missiry و Shalaby (2000).

يعتبر ضعف نظام الدفاع المضاد للأكسدة من نواتج سمية الكادميوم على الكلى فقد أظهرت العديد من الدراسات انخفاض مستويات مضادات الأكسدة الإنزيمية في كلى الحيوانات المعرضة للكادميوم لفترة طويلة. بين Casolino وآخرون (2002) أن التجريع عن طريق الفم للكادميوم بواسطة ماء الشرب سبب انخفاضا في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة (Dkhil et al, 2014؛ Morales et al, 2006) وفسروا ذلك بالتداخل المباشر بين الكادميوم والإنزيمات المضادة للأكسدة، بمعنى ارتباط الكادميوم بمجاميع SH- أو إزالة العناصر المعدنية للمراكز النشطة للإنزيمات. والكثير من الدراسات التي أطالت مدة التعرض للكادميوم سجلت ارتفاعا في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة وخاصة في الكلى وهذا ناتج عن تأثير الكادميوم على التعبير الجيني وكذلك زيادة مستويات النحاس والزنك والتي هي عوامل مساعدة لإنزيم CuZn-SOD (Wätjen and Beyersmann, 2004؛ Jurczuk et al, 2004 Djukić-Ćosić, 2011).

اقتُرحت بعض الدراسات أن كلاً من موت الخلايا المبرمج والنخر الخلوي يمكن أن يحدث عن طريق تسبب الكادميوم في تراكم ROS في الكلى (Fleury et al, 2002؛ Hossain et al, 2009). من ناحية أخرى، زيادة مستويات ROS في خلايا الكلى تحفز التعبير الجيني لجين ناقل المقاومة للأدوية المتعددة الذي يحمي خلايا الأنابيب القريبة ضد موت الخلايا المبرمج (Nair et al, 2013).

وسجل انخفاض معتبر في مستويات مضادات الأكسدة غير الإنزيمية GSH وTSH في دراسات Dkhil وآخرون (2014)؛ و Renugadevi و Prabu (2009)، وهذا يمكن إرجاعه إلى انخفاض توافر NADPH اللازم لتحويل الجلوتاثيون المؤكسد (GSSG) إلى الجلوتاثيون المرجع (GSH) (Deneke, 2000).

انخفاض مستوى GGT البلاسمية بتأثير خلايا الرصاص يتعارض مع نتائج Alwaleedi (2016)، وقد يفسر هذا الاختلاف إلى الضرر الذي أصاب الكلى وسمح بخروج كميات كبيرة منه مع البول. إن التعرض لمدة طويلة للرصاص يؤدي إلى انخفاض في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة وكذلك في الجلوتاثيون المرجع في الكبد (Sivaprasad et al, 2004)، وقد سجلنا انخفاضا في كمية الجلوتاثيون

الكبد في المجموعة المعاملة بكلوريد الكادميوم، وتفسير ذلك أنّ الكادميوم يرتبط بمجاميع SH- للبروتينات عموماً كما يرتبط بالمعادن الحيويّة والتي تعتبر كمراكز نشطة للإنزيمات المضادّة للأكسدة. وقد سجّلنا في دراستنا ارتفاع نسبة أكسدة الدّهون والمعبر عنها بـ MDA. وهذا بسبب تأثير الرّصاص على تكامل الأغشية الخلويّة وتكوين الأحماض الدهنيّة، ويرتبط هذا بارتفاع مستوى MDA في الكبد، ويكمن تأثير الرّصاص على غشاء الخليّة الكبدية تأثيره على الأحماض الدهنيّة غير المشبّعة مثل حمض الأراشيدونيك (Lawton and Donaldson, 1991). وأكثر من ذلك، فإنّ الرّصاص يتسبب للإجهاد التأكسدي يمكن أن يؤدي إلى خلل وتلف في DNA، والموت الخلوي المبرمج (Xu et al, 2008).

يؤدي التعرّض لمُدّة طويلة للرّصاص إلى تحرير الجذور الحرّة و إلى ارتفاع نسبة فوق أكسدة الدّهون في الكلى و يتبع بفقدان تكامل وتنشيط مكوّنات خلايا الأنبيبات الكلويّة (Aziz et al, 2012؛ Sharma and Singh, 2014).

يؤدي التعرّض المطوّل للرّصاص إلى التخفيض في كلّ من نشاط الإنزيمات المضادّة للأكسدة و

كميّة GSH الكلويّة (Lakshmi et al, 2013). فقد سجّلنا انخفاضاً في كميّة GSH الكبدية و GGT

المصلي، وهذا ما يتوافق مع نتائج Matovic وآخرون (2015). وآلية الرّصاص هي نفسها المتبّعة في

الكبد سواء بشغل مكان المعادن الحيويّة في الإنزيمات أو بالارتباط بمجموعة SH- مع البروتينات

(Lakshmi et al, 2013) ويمكن أن يرجع انخفاض GSH على الأقل جزئياً إلى انخفاض نشاط GST

(Glutathione-S-Transferase) (Matovic et al, 2015).

كما يؤدي الرّصاص إلى زيادة في الموت الخلوي المبرمج في الكلى، فقد سجّل Sujatha وآخرون (2011)

أنّ تعرّض الجرذان للرّصاص لمدة 12 أسبوعاً أدت إلى ارتفاع في عدد apoptotic bodies في خلايا

الأنبيبات القريبة، وهذا ما يجعل اقتراح أنّ التسمّم بالرّصاص يؤدي إلى التأثير على التعبير الجيني لبروتينات

الموت الخلوي المبرمج.

عند حقن الرصاص و الكاديوم داخل التجويف البيروتونيالي بتركيزات مماثلة فإنّ تأثيرات الأوكسدة للكاديوم هي المسيطرة بسبب طبيعته التفاعليّة (Pillai and Gupta, 2005) وفي دراسة أخرى لـ Pandya وآخرون (2010) وتكملة للبحث المذكور أعلاه ، وبتطبيق التجربة نفسها لكن بتخفيض تركيز المعدنين وجد أنّ تركيز المعدنين وخاصة الكاديوم في الكبد قد انخفض في المجموعة التي مزج فيها المعدنين مقارنة مع مجموعات المعدنين في صورتها الفردية وهذا ما يجعل تفسير ذلك بحدوث تداخل بين العنصرين في الكبد واحتمال حدوث تضاد بينهما في إحداث الإجهاد التأكسدي في الكبد.

في دراسة Dai وآخرون (2013) حيث استخدم فيها خليط من 10 μ l من LD₅₀ من نترات الرصاص وكلوريد الكاديوم ولمدة 90 يوم سجلت زيادة كبيرة في تراكيز MDA وانخفاض في تراكيز الجلوتاثيون المرجع في الكبد والكلى وانخفاضا في نشاط الإنزيمات المضادة للأوكسدة. في التجربة نفسها، تمّ فحص تعبيرات الجين MT-1 و MT-2 في كبد الجرذان وقشرة الكلى وسجّل تنظيمها في كلا العضوين، وتنشيط نظام الدفاع، فسّر بالتأثير المضادّ للأوكسدة من قبل الميتيونين بتوافر السيستئين لإنتاج الميتيونين، وكذلك الاستجابة لنسخ mRNA الخاص بالميتيونين.

بيّنت نتائج دراستنا زيادة في تراكيز MDA والجلوتاثيون المرجع في المجموعة المعاملة بخليط

المعدنين الكاديوم والرصاص، وهذا مقارنة إلى ما أدّى إليه كلّ عنصر على حدى، وتتوافق نتائجنا مع نتائج Wang وآخرون (2010) و Dai وآخرون (2013).

إنّا امرار مزيج الكاديوم والرصاص في مياه شرب الجرذان لمدة 8 أسابيع أدّى إلى زيادة مستويات MDA في القشرة الكلويّة، مقارنة مع الشواهد والمجموعات المعاملة بالكاديوم والرصاص بصورة منفصلة وهذا ما يفسّر بالفعل التآزري ودعم هذا بفحص البنية الدقيقة للميتاكوندري (ultrastructural analyses) والتي بيّنت أنّ خليط ملحي المعدنين تسبّب في خلل كبير في بنية الميتاكوندري مقارنة بالخلل الذي سبّبه

كلّ معدن على حدى (Wang *et al*, 2010). ودعمت هذه النتائج أيضا بنتائج Dai وآخرون (2013) الذين سجّلوا -كذلك- انخفاضا في تركيز الجلوتاثيون المرجع.

5.2. التأثير الوقائي للعكبر على الإجهاد التأكسدي

لم يؤدّ العكبر إلى الحماية ضدّ تأثير معدني الكاديوم والرصاص في مستوى الجلوتاثيون المرجع الكبدي والكلوي في جميع المجموعات المعرّضة للتسمّم بالعنصرين، أمّا بالنسبة لتأثيره على أكسدة الدهون في الكبد والكلى فليس هناك أثر واضح على مستوى MDA باستثناء مجموعة مزيج المعدنين التي عمل فيها العكبر على زيادة نسبة MDA مقارنة بمجموعة مزيج العنصرين غير المعالجة مسبقا بالعكبر. وتحتاج هذه النتائج تحتاج إلى مزيد من البحث والتأكيد؛ فليس هناك تفسير واضح حول تأثير العكبر على الزيادة في أكسدة الدهون عند تناول الحيوانات لمزيج المعدنين.

قليلة هي الدراسات التي أجريت على تأثير العكبر على الإجهاد التأكسدي الناتج عن المعادن الثقيلة وخاصة الكاديوم والرصاص، ففي دراسة على تأثير العكبر الوقائي على الإجهاد التأكسدي الناتج عن الزئبق سجّل انخفاض معتبر في عملية أكسدة الدهون في الكبد (Zhao *et al*, 2009). فالفلانويدات والمركبات الفينولية تعمل كمضادات أكسدة ضدّ أكسدة الدهون المسببة لمضاعفات مرضية (Molina *et al*, 2003). كما تعمل كمخلّبات (chelators) فعالة ضدّ الأيونات المعدنية السامة (Afanasav *et al*, 1989). فالكيرسيتين Quercetin من المكونات الأساسية للعكبر، وأنّه من المركّبات التي تثبّط عملية أكسدة الدهون بإزالة الجذور الحرّة و/أو أيونات المعادن الناقلة (Terao and Piskula, 1999). وفي نفس دراسة Zhao وآخرون (2009) سجّل ارتفاع في كمية الجلوتاثيون و انخفاض في نشاط إنزيم GST الذي يستخدم الجلوتاثيون المرجع كمدّة التفاعل. فالعكبر يحمي الكبد من التلف أو الضرر الذي تسببه بعض المواد السامة (Bhadouria. *et al*, 2007؛ Nirala and Bhadauria, 2008). تعتمد آلية العكبر المضادة للأكسدة على محتوياته الفينولية والتي تتخلّى عن أيونات الهيدروجين لصالح الجذور الحرّة لحماية الخلية من تفاعلات

الأكسدة. فالعكبر له القدرة على إزالة الجذور الحرّة التي تعدّ السبب الأول في أكسدة كلّ من الهون والأحماض النوويّة والبروتينات (Anjum *et al*, 2018).

في دراسة Berroukche وآخرون (2019) على التأثير الوقائي لعكبر الغرب الجزائري على سمّيّة كبريتات الكاديوم على الخصيتين عند ذكور الجرذان، سجّل ارتفاع في كمّيّة الجلوتاثيون المرجع وكذلك في نشاط إنزيم GST، كما توصلّ Tohamy وآخرون (2014) إلى فعاليّة العكبر في الوقاية ضدّ الإجهاد التأكسدي في كلّ من الخصيتين والكليتين.

يعتمد نشاط العكبر المضادّ للأكسدة على محتواه من الفلافونويدات؛ فهو له القدرة على إزالة الجذور الحرّة والحماية ضدّ أكسدة الدهون، كما أنّه يعمل على تنشيط الإنزيمات المضادّة للأكسدة ضدّ الجذور الحرّة (Çilenk *et al*, 2016).

1. الخاتمة

إن أبرز ضرر يسببه الكادميوم والرصاص هو الإخلال في عملية التوازن بين مضادات الأكسدة والجنور الحرّة، وذلك بتشجيعها لتكوين هذه الأخيرة أو بتثبيط مضادات الأكسدة بصفة عامّة، سواء الإنزيمية منها أو غير الإنزيمية كالبروتينات وأبرزها الجلوتاثيون المرجع. وتحرير الجنور الحرّة يترتب عنه إحداث فوق أكسدة الدّهون، التي من نواتجها النهائية المألون ثنائي الألدheid.

تعتبر مضادات الأكسدة الخارجية من الحلول الممكنة لمنع حدوث هذه الأضرار التي تسببها هذه المعادن. ولعلّ من أبرز هذه الموادّ نواتج النحل ومنها العكبر الذي يعتبر من منتجات النحل الثانوية التي يستخدمها في حماية خلاياه، وهو يتميز بقدرة عالية في الوقاية من حدوث الإجهاد التأكسدي، وهذا ما تثبتته وأكّدته دراسات عديدة؛ وذلك لاحتوائه على المركبات الفينولية بصفة عامّة، وخاصّة الفلافونويدات التي لها القدرة العالية في اقتناص وشطب الجنور الحرّة وتجديد والإسهام في إعادة ترميم الأغشية الخلوية.

يعتبر الكبد والكلية من الأعضاء المهمّة في جسم الحيوان والإنسان التي تسهم في توزيع وتراكم المعادن الثقيلة بصفة عامّة، والكادميوم والرصاص بصفة خاصّة.

من أجل ما ذكر، حاولنا في هذه الدراسة البحث في عدّة نقاط استفهامية، وهي:

❖ تأثير الرصاص والكادميوم وقدرتهما على التأثير على أحد مضادات الأكسدة البروتينية وهو

الجلوتاثيون، وكذلك مدى تشكل البيروكسيدات الدهنية.

❖ كما حاولنا إطالة مدّة التعرّض لهذين المعدنين وبتراكيز جدّ عالية.

❖ كما تمّ استخدام وسيلة ماء الشرب لتسميم الحيوانات بدل الأكل والجرعة الوحيدة أو الحقن.

❖ من أجل البحث عن إمكانية حماية العكبر - بتركيز منخفض 25 ملغ/كغ من وزن الحيوانات ولمدّة

خمسة أيّام - من آثار هذين المعدنين وخاصّة على النّشاط الكبدي والكلوي بصفة عامّة والجلوتاثيون

و مالون ثنائي الألدheid بصفة خاصّة.

استخدم كل من كلوريد الكاديوم بتركيز (0.3غرام/ل) وخلات الرصاص (3غرام/ل) وهذا في صورة ماء الشرب وذلك لمدة ثلاثة أشهر.

أدى كلوريد الكاديوم وخليطه مع خلات الرصاص إلى التأثير على وزن الحيوانات، وهذا من خلال فقدانها وبصورة معتبرة لوزنها. أما خلات الرصاص منفردة فلم تؤد إلى أيّ تغيير معتبر في وزن الحيوانات. أما تأثير العكبر الوقائي فكان جزئي، بحيث لم يرق أن يكون معتبرا في منع فقدان الوزن عند الحيوانات في جميع المجموعات المعاملة بمعدي الكاديوم والرصاص. أما تأثير الكاديوم والرصاص على الأوزان النسبية للكبد فسجل ارتفاعا معتبرا في أوزانها في مجموعة خليط المعدنين، ولم يلاحظ أيّ أثر معتبر للعكبر على ذلك.

يبدو أنّ الكاديوم يسبب تلفا كبيرا في الكلى، فقد أدى إلى زيادة وزنها بسبب تراكمه فيها، وقد يكون هناك أثر تضادي بين الكاديوم والرصاص بسبب عدم زيادة معتبرة في وزن الكلى في مجموعة خليط الملحنيين. لوحظ أنّ أثر الكاديوم على الكلى كان أبلغ مقارنة بتأثيره على الكبد، فلم نلاحظ ارتفاعا في نشاط إنزيمات النشاط الكبدي عند الحيوانات المعاملة بالكاديوم. ويبدو أنّ تأثير الرصاص كان أبلغ على الكبد بحيث أدى إلى زيادة معتبرة في نشاط الإنزيمات المحددة للنشاط الكبدي. أما خليط المعدنين فلم يؤد إلى ارتفاع معتبر في نشاط هذه الإنزيمات باستثناء فوسفاتاز القاعدي، ويبدو أنّ هناك تضاداً بدرجة معينة سمحت بعدم تحزب الأغشية الخلوية الكبدية. وقد لوحظ أثر معتبر للعكبر للتقليل من أثر المعدنين على هذه الإنزيمات.

من خلال نتائج المعايير البيوكيميائية البلاسمية والبولية لمعايرة النشاط الكلوي تبين أنّ الكاديوم أدى إلى تلف كبير في النسيج الكلوي، وخاصة في الأنابيب القريبة بحيث سمح بخروج البروتينات والدم مع البول. وقد أدى العكبر إلى وقاية جزئية من آثار الكاديوم على الكلى.

للكادميوم خصائص سميّة تختلف عن بعض العناصر المعدنية الأخرى، وخاصّة في التراكيز العالية والفترات الطويلة، بحيث أظهرت معايير الإجهاد التأكسدي أنّ الكادميوم أدّى إلى انخفاض تركيز مالون ثنائي الأدهيد الكبدي وارتفاع في تركيز الجلوتاثيون المرجع، وهذا ما يتعارض مع جلّ الأبحاث التي طبّقت تراكيز منخفضة من الكادميوم وفي فترات قصيرة.

أمّا الرصاص فقد أدّى إلى زيادة في إنتاج الجلوتاثيون المرجع، وهذا من مؤشرات الإجهاد التأكسدي ولم يؤدّ إلى ارتفاع في تركيز المالون ثنائي الأدهيد الكبدي، وقد يعود ذلك إلى خلل في أيض الدهون؛ لأنّه سجّل ارتفاع الأجسام الكيتونيّة في البول.

أمّا خليط المعدنين فأدّى إلى إجهاد تأكسدي واضح على الكبد من خلال ارتفاع تركيز المالون ثنائي الأدهيد وانخفاض في تركيز الجلوتاثيون المرجع. لم يؤدّ العكبر إلى آثار وقائيّة واضحة على التأثير التأكسدي للرصاص على الكبد. أمّا الزيادة العالية المعتبرة في كميّة المالون ثنائي الأدهيد الكبديّة في مجموعة خليط المعدنين والمعاملة مسبقا بالعكبر فلم نجد لها تفسيراً.

إنّ التأثير التأكسدي الكلوي للمعدنين بدا واضحاً بارتفاع تركيز المالون ثنائي الأدهيد وانخفاض الجلوتاثيون المرجع في جميع المجاميع المعاملة بالمعدنيين، وكان تأثير الخليط أكثر حدّة. أمّا العكبر فأدّى إلى انخفاض طفيف في كميّة المالون ثنائي الأدهيد، كما أدّى إلى زيادتها في مجموعة مزيج المعدنين بصورة مذهلة والذي حدث في الكبد كما أسلفنا.

نستشفّ من هذه الدّراسة أنّ للعكبر تأثيراً على النّشاط الكبدي والكلوي، فهو يلعب دوراً في حماية أنسجتها بفعل ما يحتوي من مركبات فعّالة، إلّا أنّ التأثير لم يكن واضحاً بصورة جيّدة، والذي قد يعود إلى التراكيز العالية المستخدمة من أملاح المعادن، وإلى المدّة المطوّلة، وكذلك إلى طبيعة هذه العناصر.

2. الآفاق

- توسيع البحث على التأثير الوقائي للعكبر على الإجهاد التأكسدي الناتج عن معادن ثقيلة أخرى كالزئبق.
- العمل على تراكيز متصاعدة من المعادن الثقيلة بدءاً بالتراكيز الطبيعية المنخفضة الموجودة عند الإنسان في البيئة الملوثة بالمعادن الثقيلة .
- تغيير طريقة تمرير المعادن لحيوانات التجارب .
- دراسة التأثير العلاجي للإجهاد التأكسدي الناتج عن المعادن الثقيلة.
- البحث عن حقيقة التأثير الجيني للتراكيز المرتفعة من الكادميوم على الإجهاد التأكسدي .
- دراسة مخبرية على التأثير الوقائي والعلاجي للعكبر على الإجهاد التأكسدي على مستوى الميتاكوندري.

Bibliographic references

Abadin, H., Ashizawa, A., Stevens, Y.W., Llados, F., Diamond, G., Sage, G., Citra, M., Quinones, A., Bosch, S.J., Swarts, S.G. (2007). Toxicological Profile for Lead; Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA, USA.pp582.

Abdou, H.M., Hassan, M.A. (2014). Protective role of omega-3 polyunsaturated fatty acid against lead acetate-induced toxicity in liver and kidney of female rats. *BioMed. Res. Int.* doi: 10.1155 /435857.

Abdou, Z.A., Attia, M.H., Raafat, M.A. (2007). Protective effect of citric acid and thiol compounds against cadmium and lead toxicity in experimental animals. *J Biol Chem Environ Sci.*2:481–97.

Afanasev, I.B., Dorozhko, A.I., Brodskii, A.V., Kostyuk, V.A., Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol.* 38(11): 1763-1769.

Ahamed, M., Siddiqui, M.K.J. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta.* 383: 57-64.

Ahlawat, P. (2016). Effect of Cadmium and Lead Exposure in Albino Rat. *Journal of Scientific and Engineering Research.* 3(6):1-5.

Alwaleedi, S.A. (2016). Hematobiochemical changes induced by lead intoxication in male and female albino mice. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology.* 11(6):46-51.

Amara, S., Abdelmalek, H., Garrel, C., Guiraud, P., et al. (2006). Influence of static magnetic field on cadmium toxicity: Study of oxidative stress and DNA damage in rat tissues. *J Trace Elem Med Biol.* 20(4): 263–269.

Andjelkovic, M., Djordjevic, A.B., Antonijevic, E., Antonijevic, B. et al. (2019). Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 16: 274-294

Anjum, S.I., Ullah, A., Khan, K.A., Attaullah, M., et al. (2018). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>.

ATSDR. (2018). Substance Priority List. Available online: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (accessed on 26 September 2018).

Aziz, F.M., Maulood, I.M., Chawsheen, A.H. (2012). Effects of melatonin, vitamin C and E alone or in combination on lead-induced injury in liver and kidney organs of rats. *IOSR J. Pharm.* 2: 13-18.

Benguedouar, L., Boussenane, H.N., Kebsa, W., Alyane, M., Rouibah, H., Lahouel, M. (2008). Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*.46 (2): 112-119

Bergdahl, I.A., Sheveleva, M., Schütz, A., Artamonova, V.G., Skerfving, S. (1998). Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase and other leadbinding components. *Toxicol. Sci.* 46: 247-253.

Berroukche, A., Denai, I., Brahmi, M., Dellaoui, H., et al. (2019). Western Algerian propolis alcohol extract effects against disruption of testes function induced by cadmium-sulfate in male Rats. *Asian J. Biol. Sci.* 12 (1): 24-30

Bhadauria, M., Nirala, S.K., Shukla, S. (2007). Duration dependent hepatoprotective effect of propolis extract against carbon tetrachloride induced acute damage in rats. *Adv Ther.* 2007 24(5):1136-1145.

Bhattacharya, S. (2015). Reactive oxygen species and cellular defense system. In Rani, V. and Yadav, U eds., *Free Radicals in Human Health and Disease*. Springer India.17-29

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal.* 5 (1): 9-19.

Bogdanov, S. (2017). Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*, www.bee-hexagon.net.1-44

- Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M., Lahouel, M. (2011).** Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian Journal of Nephrology*. 21(2): 101-106.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., Lahouel, M. (2018).** Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant. *Toxicol Sci* .63(1) : 132-142.
- Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Pilat-Marcinkiewicz, B., Sawicki, B. (2003).** Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol*.38 (1):2-10.
- Buege, J.A., Aust, S.D. (1978).** Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52: 302-310.
- Carocci, A., Catalano, A., Lauria, G., Sinicropi, M.S., Genchi, G. (2016).** Lead toxicity, antioxidant defense and environment. *Rev Environ Contam Toxicol*. 238: 45-67.
- Casalino, E., Calsaretti, G., Sblano, C., Landriscina, C. (2002).** Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*. 179(1-2): 37-50.
- Cazzola, R., Rondanelli, M., Russo-Volpe, S., Ferrari, E., Cestaro, B. (2004).** Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res*. 45:1846-1851.
- Chandrasekaran, A., Idelchik, M.D.P.S., Melendez, J.A. (2017).** Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*.11: 91-102.
- Chiu L. Y., Ho F. M., Shiah S. G., Chang Y., Lin W. W. (2011).** Oxidative stress initiates DNA damager MNNG-induced poly ADP-ribose polymerase-1-dependent parthanatos cell death. *Biochem Pharmacol*. 81: 459-470.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Bertrand, M. (2006).** Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res*. 20: 531-536.
- Cilenk, K.T., Ozturk, I., Sonmez, M.F. (2016).**Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. *Exp. Mol. Pathol*. 101(2): 207-213.

- Cobbina, S.J., Chen, Y., Zhou, Z., Wu, X., et al. (2015).** Toxicity assessment due to sub-chronic exposure to individual and mixtures of four toxic heavy metals. *J. Hazard. Mater.* 294: 109–120.
- Curtin, J.F., Donovan, M., Cotter, T.G. (2002).** Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods*. 265: 49-72
- D'Souza, C., Peretiako, R. (2002).** The nexus between industrialization and environment: A case study of Indian enterprises. *Environ. Manag. Health.* 13: 80–97.
- Dai, S., Yin, Z., Yuan, G., Lu, H. et al. (2013).** Quantification of metallothionein on the liver and kidney of rats by subchronic lead and cadmium in combination. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36: 1207-1216.
- Dalton, T.P., Shertzer, H. G., Puga, A. (1999).** Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39: 67-101.
- De Castro, S.L. (2001).** Propolis: Biological and pharmacological activities therapeutic uses of this bee-product. *Annual Review of Biomedical.* 3: 49-83.
- Deneke, S.M. (2000).** Thiol-based antioxidants. *Curr.top.Cell.Regul.* 36: 151-180.
- Djukić-Ćosić, D., (2011).** The Effect of Magnesium on Oxidative stress and Bioelements in Mice Exposed to Acute and Subacute Cadmium Intoxication. Ph. D. thesis, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade.
- Dkhil, M.A., Al-Quraishy, S., Diab, M.M., Othman, M.S., et al. (2014).** The potential protective role of *Physalis peruviana* L. fruit in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 74: 98-106.
- Dominici, S., Paolicchi, A., Corti, A., Maellaro, E., Pompella, A. (2005).** Prooxidant reactions promoted by soluble and cell-bound gamma-glutamyltransferase activity. *Methods Enzymol.* 401: 484–501.
- Elayat, W., Bakheelf, M.S. (2010).** Effects of chronic lead toxicity on liver and kidney functions. *J Med Lab Sci.* 1(2):29–36.
- Ellman, G. L. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* 82(1), 70–77.

- El-Missiry, M.A., Shalaby, F. (2000).** Role of β -carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol.* 14(5): 238–243.
- Erdogan, Z., Erdogan, S., Celik, S., Unlu, A. (2005).** Effects of ascorbic acid on cadmium induced oxidative stress and performance of broilers. *Biological Trace Element Research.* 104:19-32.
- Eşrefoglu, M., Gül, M., Dogru, M.I., Dogru, A., Yürekli, M. (2007).** Adrenomedullin fails to reduce cadmium-induced oxidative damage in rat liver. *Exp Toxicol Pathol.* 58(5):367-74.
- Farmand, F., Ehdaie, A., Roberts, C.K., Sindhu, R.K. (2005).** Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ. Res.*98:33-39.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. (2009).** Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.* 16: 1543–1560.
- Fleury, C., Mignotte, B., Vayssie`re, J-L. (2002).** Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. *Biochimie.* 84(2-3):131–141.
- Flora, S.J.S. (2009).** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and mettaloid exposure. *Oxid Med Cell. Longev.* 2: 191–206.
- Fowler, B.A., Whittaker, M.H., Lipsky, M., Wang, G., Chen, X.Q. (2004).** Oxidative stress induced by lead, cadmium and arsenic mixtures: 30-day, 90-day, and 180-day drinking water studies in rats: an overview. *Biometals.* 17: 567-568.
- Freudenthal, B.D., Beard, W.A., Perera, L., Shock, D.D., et al. (2015).** Uncovering the polymeraseinduced cytotoxicity of an oxidized nucleotide. *Nature.* 517: 635–39.
- Gabr, S.A., Alghadir, A.H., Ghoniem, G.A. (2017).** Biological activities of ginger against cadmium-induced renal toxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences.* [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.sjbs.2017.08.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.008)
- Ghezzi, P., Bonetto, V., Fratelli, M. (2005).** Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Signal.* 7: 964-972.

- Grotto, D., Maria, L.S., Valentini, J., Paniz, C., et al. (2009).** Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova*. 32:169–74
- Gurer-Orhan, H., Sabir, H.U., Ozgüneş, H. (2004).** Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 195: 147-154.
- Halliwell, B. (2007).** Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 1147–1150.
- Hammoud, G.M., Salem, A.A., ELSawy, K.M. (2017).** Assessment of beneficial effect of propolis against cadmium induced toxicity and oxidative stress in rats. *Journal of Chemical, Biological and physical Sciences*. 7(4): 1205-1224.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell*. 100 (1): 57–70.
- Haouem, S., El Hani, A. (2013).** Effect of cadmium on lipid peroxidation and on some antioxidants in the liver, kidneys and testes of rats given diet containing cadmium-polluted radish bulbs. *J Toxicol Pathol*. 26(4): 359–364.
- Havsteen, B.H. (2002).** the biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 96(2-3): 67-202.
- Helpfenberg, K.D. (1983).** The analysis of beeswax and propolis. *Chemiker Zeitungm*. 31: 987–998.
- Hosnuter, M., Gurel, A., Babucc, O., Armutcu, F., et al. (2004).** the effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*. 30(2): 121-125.
- Hossain, S., Liu, H-N, Nguyen, M., et al (2009).** Cadmium exposure induces mitochondria-dependent apoptosis in oligodendrocytes. *Neurotoxicology*. 30(4):544–554.
- Hutter, E., Skovbro, M., Lener, B., Prats, C., et al. (2007).** Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell*. 6: 245-256.

- Ibrahim, N.M., Eweis, E.A., El-Beltagi, H.S., Abdel-Mobdy, Y.E. (2012).** Effect of lead acetate toxicity on experimental male albinorat. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(1):41–46.
- Injac, R., Strukelj, B. (2008).** Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat.* 7 (6):497-516.
- Jan, A.T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., et al. (2015).** Heavy metals and human health: mechanistic insights into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Int. J. Molec. Sci.* 16: 29592-29630.
- Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z. (2007).** *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J. of Ethnopharmacology.* 110(3): 548-54.
- Jihen, el H., Sonia, S., Fatima, H., Mohamed Tahar, S., Abdelhamid, K. (2011).** Interrelationships between cadmium, zinc and antioxidants in the liver of the rat exposed orally to relatively high doses of cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 2099-2104.
- Josthna, P., Geetharathan, T., Sujatha, P., Deepika, G. (2012).** Accumulation of lead and cadmium in the organs and tissues of albino rat. *Int. J. of Pharm. & Life Sci.* 3(12): 2186-2189.
- Junge, W., Wilke, B., Halabi, A., Klein, G. (2004).** Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffe method. *Clin Chim Acta.* 344 (1-2):137–148.
- Jurczuk, M., Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E. (2004).** Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol.* 42(3):429-438.
- Kaplan, M.M., Righetti, A. (1970).** Induction of rat liver alkaline phosphatase: the mechanism of serum elevation in bile duct obstruction. *J Clin Invest.* 49(3):508–516.
- Karmakar, R., Chatterjee, M. (1998).** Cadmium-induced time-dependent oxidative stress in liver of mice: a correlation with kidney. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6:201–207.
- Kart, A., Cigremis, Y., Ozen, H., Dogan, O. (2009).** Caffeic acid phenethyl ester prevents ovary ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Food and Chem. Toxicol.* 47(8): 1980-1984.

- Kaur, J., Kaur, R., Kaur, A. (2018).** Dietary Antioxidants and Infectious Diseases. *Infectious Diseases and Your Health*, 307–316. Doi:10.1007/978-981-13-1577-0_16
- Kawagoe, M., Hirasawa, F., Wang, S.G., Liu, Y., et al. (2005).** Orally administrated rare earth element cerium induces metallothionein synthesis and increases glutathione in the mouse liver. *Life Sci.* **77(8)**: 922–937.
- Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A. (2009).** Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**: 215-220.
- Koyuturk, M., Yanardag, R., Bolkent, S., Tunali, S. (2006).** Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. *Environ Toxicol Pharmacol.* **21(3)**: 235– 240.
- Krimmel, B., Swoboda, F., Solar, S., Reznicek, G. (2010).** OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – a gamma radiolysis study. *Radiat. Phys. Chem.* **79**: 1247.
- Krol, W., Czuba, Z., Scheller, S., Gabrys, J., et al. (1990).** Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis EEP as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem. Int.* **21**: 593-597.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004).** Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *J.Food.Chemistry.* **84**: 329-339.
- Lakshmi, B.V., Sudhakar, M., Aparna, M. (2013).** Protective potential of Black grapes against lead induced oxidative stress in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **35**: 361-368.
- Lawton, L.J., Donaldson, W.E., (1991).** Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol. Trace Elem. Res.* **28(2)**: 83-97.
- Lee, J., koo, N., Min, D.B. (2004).** Reactive oxygen species, aging. Antioxidative nutraceuticals. *Food Science and Food Safety.* **3**: 21-33.
- Lee, S., Kim, K.S., Park, Y., Shin, K.H., Kim, B.K. (2003).** *In vivo* antioxidant activities of tectochrysin. *Arch Pharm Res.* **26**: 43-6.

- Liu, C.M., Ma, J.Q., Sun, Y.Z. (2012).** Puerarin protects the rat liver against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64:575-582.
- Liu, T., He, W., Yan, C., Qi, Y., Zhang, Y. (2011).** Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicol. Ind. Health.* 27: 249-256.
- Mahaffey, K.R., Capar, S.G., Gladen, B.C., Fowler, B.A. (1981).** Concurrent exposure to lead, cadmium, and arsenic. Effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 98: 463-481.
- Matović, V., Đukić-Ćosić, D., Buha, A., Bulat, Z. (2013).** Route, dose and duration of exposure to cadmium-relevance to oxidative stress induction. *In Peroxidases, Bogaert Lucas and Coppens Noah (Eds.).* 161-175, Nova Science Publisher, USA.
- Matović, V., Buha, A., Bulat, Z., Đukić-Ćosić, D., et al. (2012).** Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food Chem. Toxicol.* 50: 552-557.
- Matović, V., Buha, A., Đukić-Ćosić, D., Bulat, Z. (2015).** Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food.Chem. Toxicol.* 78: 130–140.
- Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., Antunes, M. D. (2010).** Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem.toxicol.* 48(12):3418-3423
- Molina, M. F., Sanchez-Reus, I., Iglesias, I., Benedi, J. (2003).** Quercetin, a flavonoids antioxidant, prevents and protects against ethanol induced oxidative stress in mouse liver. *BiolPharmaceut Bull.* 26(10): 1398-1402.
- Monnier, V.M., Cerami, A. (1981).** Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 211: 491–93.
- Morales, A.I., Vicente-Sánchez, C., Sandoval, J.M., Egido, J., et al. (2006).** Protective effect of quercetin on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is based on its antioxidant properties. *Food Chem. Toxicol.* 44: 2092-2100.

Murray R. (1984) a. Aspartate aminotransferase. Kaplan A *et al.* Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1112-1116.

Murray, R. (1984) b. Alanine aminotransferase. Kaplan A *et al.* Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1088-1090.

Muselin, F., Trif, A. Brezovan, D. Stancu, A. Snejana, P. (2010) The consequences of chronic exposure to lead on liver, spleen, lungs and kidney arhitectonics in rats. *Lucrari stiintifice medicina veterinara* vol. xliii (2) : 123-127

Nair, A.R., Degheselle, O., Smeets, K., Van Kerkhove, E., Cuypers, A. (2013). Cadmium-Induced Pathologies: Where Is the Oxidative Balance Lost or Not? *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6116-6143.

Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H. (2007). Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylequinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci.* 80 : 370-377.

Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., Salvayre, R. (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol.* 153:6-20.

Nirala, S. K., Bhadauria, M. (2008). Propolis reverses acetaminophen induced hepatorenal biochemical and histopathological alterations. *Arch Pharm Res.* 31 (4): 45-461.

Nordberg, G.F., Jin, T., Wu, X., Lu, J., et al. (2009). Prevalence of kidney dysfunction in humans - relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors. *Biochimie.* 91: 1282-1285.

Nordberg, M., Nordberg, G.F. (2000). Toxicological aspects of metallothionein. *Cell. Mol. Biol.* 46: 451- 463.

OECD. (2008). OECD guidelines for testing of chemicals, Test No. 425, Acute toxic class method.

Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., et al. (2007). Characterization of the extracellular gamma-glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *Plant J.* 49: 865–877.

- Pandya, C.D., Pillai, P.P., Gupta, S.S. (2010).** Lead and cadmium co-exposure mediated toxic insults on hepatic steroid metabolism and antioxidant system of adult male rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 134: 307-317.
- Patra, R.C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., et al. (2007).** Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 66 (1): 127–131.
- Patra, R.C., Rautray, A.K., Swarup, D. (2011).** Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet Med Int.* 2011(5): 457327.
- Phillips, C., Gyori, Z., Kovács, B. (2003).** The effect of adding cadmium and lead alone or in combination to the diet of pigs on their growth, carcass composition and reproduction. *J Sci Food Agric.* 83: 1357-1365.
- Piedra, J.V., Zienkiewicz, A., Khudhur, H.B., Szymańczyk, S.E., Rumińska, E. (2018).** Influence of the administration of propolis and bee pollen preparation on the concentration of mercury in the muscles, kidneys and liver of white storks. *Med. Weter.* 74 (3): 171-174.
- Pillai, A., Gupta, S. (2005).** Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver of female rats coexposed to lead and cadmium: Effects of vitamin E and Mn²⁺. *Free Radic. Res.* 39: 707–712.
- Porth, C. M., Matfin, G. (2009).** Pathophysiology, concepts of altered health states, 8th Ed., Wolters kluwer Health and Lippincott Williams and Wilkins, 1686 P. Programme on Chemical Safety, Geneva Publishing Company.
- Pratt, D. A., Tallman, K. A., Porter, N. A. (2011).** Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: new mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc Chem Res.* 44: 458-467.
- Prochazkova, D., Boušova, I., Wilhelmova, N. (2011).** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 82: 513–523.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D. A. (2016).** Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1863(12): 2977–2992.

- Renugadevi, J., Prabu, S.M. (2009).** Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicology*. 256: 128-134.
- Renugadevi, J., Prabu, S.M., (2010).** Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Exp toxicol Pathol*.62 (2):171-181.
- Rikans, L.E., Yamano, T. (2000).** Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J. Biochem. Mol. Toxicol*. 14: 110-117.
- Robertson, R.P. (2004).** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem*. 279: 42351–42354.
- Rudyk, O., Eaton, P. (2014).** Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology* 2: 803–813
- Russo, A., Longo, R., Vanella, A. (2002).** Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 73 (sup 1): S21- 29.
- Sachdev, S., Davies, K. J. (2008).** Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*. 44: 215-223.
- Sampson, E.J., Baired, M.A., Burtis, C.A., Smith. E.M., et al. (1980).** A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: Optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem*. 26:816-826.
- Santos, F.W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J.B., et al. (2004).** Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol Lett*. 152(3): 255–263.
- Sathiavelu, J., Senapathy, G.J., Devaraj, R., Namasivayam, N. (2009).** Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *J Pharm Pharmacol*, 61: 809-817.
- Sato, N., Kamada, T., Suematsu, T., Shichiri, M., et al. (1978).** Cadmium toxicity and liver mitochondria. I. Different effects of cadmium administered in vivo to adult, young, and ethionine-fed rats. *J Biochem* Jul;84(1):117-25.
- Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M., & Rhouati, S. (2016).** Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*. 9: S425–S428.

- Shalan, M.G., Mostafa, M.S., Hassouna, M.M., El-Nabi, S.E., El-Refaie, A. (2005).** Amelioration of lead toxicity on rat liver with vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology*. 206(1):1–15.
- Sharma, S., Sinhg, B. (2014).** Effects of acute and chronic lead exposure on kidney lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in BALB-C mice (Mus Musculus). *Int. J. Sci. Res.* 3(9):1564-1566.
- Shibutani, M., Kunitoshi, M., Shin-ichi, S., Hideaki, H., et al. (2001).** Relationship between toxicity and cadmium accumulation rats given low amounts of cadmium chloride or cadmium – polluted rice for 22 months. *The Journal of Toxicological Sciences*, 26(5): 337-358.
- Shih, C. M., W. C., Ko, J. S., Wu., et al. (2004).** Mediating of caspase-independent apoptosis by cadmium through the mitochondria-ROS pathway in MRC-5 fibroblasts, *Journal of Cellular Biochemistry*. 91 (2): 384–397.
- Shukla, S., Bhadauria, M., Jadon, A.(2004)** Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Indian J Exp Biol.* 42(10):993-7. PMID: 15511003.
- Sies, H. (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 82 (2): 291-295.
- Silva, J. P., Gomesm, A. C., Coutinho, O. P. (2008).** Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *Eur J Pharmacol.* 601(1-3): 50-60.
- Sivaprasad, R., Nagaraj, M., Varalakshmi, P. (2004).** Combined efficacies of lipoic acid and 2, 3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. Nutr. Biochem.* 15 (1): 18–23.
- Steenvoorden, D.P.T., Henegouwen, G.M.J.B. (1997).** The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J. Photochem. Photobiol. B.* 41(1-2): 1–10.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M. (2000).** Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions, *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 19(3):201-13.
- Storz, G., Christman, M.F., Sies, H., Ames, B.N. (1987).** Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *PNAS.* 84: 8917–21.

- Sugamura, K., Keaney, J. F.Jr. (2011).** Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 51: 978-92.
- Sugawara, C., Sugawara, N., Miyake, H. (1981).** Decrease of plasma vitamin A, albumin and zinc in cadmiumtreated rats.*Toxicology Letters.* 8: 323-329.
- Sujatha, K., Srilatha, C.H., Anjaneyulu, Y., Amaravathi, P. (2011).** Lead acetate induced nephrotoxicity in wistar albino rats. A pathological, immunohistochemical and ultrastructural studies. *Int. J. Pharm. BioSci.* 2: B458-B468.
- Swiergosz-Kowalewska, R. (2001).** Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc. Res. Tech.* 55:208–222.
- Szasz, G. (1974).** Gamma-Glutamyltranspeptidase. In: Bergmeyer HU. *Methoden der enzymatischen Analyse.* Weinheim: Verlag Chemie. p. 757
- Szweda, P. A., Friguet, B., Szweda, L. I. (2002).** Proteolysis, free radical, and aging. *Free Radic Biol Med.* 33: 29-36.
- Tang, X., Luo, Y.X., Chen, H.Z., Liu, D.P. (2014).** Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in Physiology | Oxidant Physiology.*5 (2): 175
- Tan-No, K., Nakajima, T. Shoji, T. (2006).** Anti- inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageen in-induced mouse paw edema. *Biol Pharmaceutical Bull.* 29 (1): 96-9.
- Terao, J., Piskula, M.K. (1999).** Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition, *Nutr.*15 (10): 790-791.
- Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N.P., Abramovic̃, H. (2011).** Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chem.* 128: 62–68.
- Tohamy, A.A., Abdella, E.M., Ahmed, R.R., Ahmed, Y.K. (2014).** Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. *Cytotechnology.* 66(2): 283-297.

- Trevino, S., Andrade-García, A., Camacho, I.H., Leon-Chavez, B.A. et al. (2015).** Chronic cadmium exposure lead to inhibition of serum and hepatic alkaline phosphatase activity in Wistar rats. *J Biochem Molecular Toxicology*. 29(12):587-594.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Auman, K.D. et al. (1995).** Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 252: 38–53.
- Urso, M.L, Clarkson, P.M. (2003).** Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation.. *Toxicology*. 189(1-2):41-54.
- Vaziri, N.D., Lin, C.Y., Farmand, F., Sindhu, R.K. (2003).** Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension. *Kidney Int*. 63: 186-194.
- Wagh, V.D. (2013).** Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*. Article ID: 308249. [Http: //dx.doi.org/10.1155/308249](http://dx.doi.org/10.1155/308249).
- Walker, P., Crane, E. (1987).** Constituents of propolis. *Apidologie*. 18: 327–334.
- Wang, J., Yang, Z., Lin, L., Zhao, Z., Liu, Z., Liu, X. (2012).** Protective effect of naringenin against leadinduced oxidative stress in rats. *Biol. Trace Elem. Res*. 146: 354-359.
- Wang, J., Zhu, H., Liu, X., Liu, Z. (2014).** Oxidative stress and Ca²⁺ signals involved on cadmiuminduced apoptosis in rat hepatocyte. *Biol. Trace Elem. Res*. 161: 180-189.
- Wang, J.X., Gao, J., Ding, S.L., Wang, K., Jiao, J.Q. et al. (2015).** Oxidative modification of miR-184 enables it to target Bcl-xL and Bcl-w. *Mol. Cell*. 59: 50–61.
- Wang, L., Li, J., Li, J., Liu, Z. (2010).** Effects of lead and/or cadmium on the oxidative damage of rat kidney cortex mitochondria. *Biol. Trace Elem. Res*. 137: 69-78.
- Wätjen, W., Beyersmann, D. (2004).** Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress. *Biometals*. 17(1): 65-78.
- Wenger, C., Kaplan, A., Rubaltelli, F. F. Hammerman, C. (1984).** “Alkaline phosphatase,” in *Clinical Chemistry*, pp. 1094–1098, The C. V. Mosby Co, St. Louis, Mo, USA, Princeton, Toronto, Canada.

WHO. (2010). Action Is Needed on Chemicals of Major Public Health Concern. *Public Health Environmental.* 1–4. Available online: https://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/en/ (accessed on 26 September 2018).

Wu, K.C., Liu, J.J., Klaassen, C.D. (2012). Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263: 14-20.

Xu, J., Lian, L.J., Wu, C., Wang, X.F., Fu, W.Y., Xu, L.H. (2008). Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53: Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem. Toxicol.* 46: 1488-1494.

Yuan, G., Dai, S., Yin, Z., Lu, H. et al. (2014). Toxicological assessment of combined lead and cadmium: Acute and sub-chronic toxicity study in rats. *Food Chem. Toxicol.* 65: 260–268.

Yuan, G., Dai, S., Yin, Z., Lu, H. et al. (2014). Sub-chronic lead and cadmium co-induce apoptosis protein expression in liver and kidney of rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 15:2905-2914.

Zalups, R.K., Ahmad, S. (2003). Molecular handling of cadmium in transporting epithelia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186: 163-188.

Zhang, M., Bao, S., Lin, F., Lin, Y., et al . (2015). Metabolomics analysis in rats after administration of *Datura stramonium*. *Int J Clin Exp Med.* 8(11): 21180–21186.

Zhao, J.Q., Wen, Y.F., Bhadauria, M. (2009). Protective effects of propolis on inorganic mercury induced oxidative stress in mice. *Indian J Exp Biol.* 47(4): 264-9.

Zhu, H., Jia, Y., Cao, H., Meng, F., Liu, X. (2014). Biochemical and histopathological effects of subchronic oral exposure of rats to a mixture of five toxic elements. *Food Chem. Toxicol.* 71: 166–17

TRANSYLVANIAN REVIEW

Vol XXVI, No. 29, 2018



Transylvanian Review

Centrul de Studii Transilvane | str. Mihail Kogalniceanu nr. 12-14, et.5, Cluj-Napoca

Email: transylvanianreview@gmail.com

Online Submission System: <http://transylvanianreviewjournal.org/>

Effects of Propolis on Cadmium-Induced Hepatotoxicity in Rats

^{1, 2} Hachemi Messaoud, ² Lahouel Mesbah, ¹ Yahia Mouloud and ^{*1} Mihoubi Mohamed Aimène

¹Laboratory of Biotechnology of Bioactive molecules and Cell Physiopathology, University of Batna 2 Mustapha Benboulaid, Algeria and ²Laboratory of Molecular Toxicology, Faculty of Sciences, University of Algeria

Abstract

Aim (Background): Cadmium is a major environmental pollutant and is known for its wide toxic manifestations. The liver and kidneys, which are the primary organs involved in the elimination of this metal. The present study evaluates possible ameliorating effects of propolis on CdCl₂ induced hepatotoxicity in adult male Wistar rats. **Materials and methods:** Forty-eight rats were divided in two different groups. Treated group (propolis 25 mg/kg BW) by gavage and no treated group for five days. After pretreatment the animals were divided into four groups each of 6 rats: normal control group, propolis group, CdCl₂ group and propolis-CdCl₂ group. The first and the second group received bidistilled water such as the drinking water. The third and the fourth group received CdCl₂ 300 mg/l in bidistilled water such as the drinking water. After 12weeks, the animals were Weighted and then were killed to determine the activities of hepatic marker enzymes alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT) and alkaline phosphatase (ALP (in serum, the level of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) in liver homogenate. **Results:** The result showed that the Cd treatment caused decreased in body weight gain and liver weight at (p< 0.001) and at (p< 0.01) sequentially when compared to the control group. The results showed that Cd treatment caused a significant increase of serum AST (p< 0.05) and APH (p< 0.01), the decreased hepatic level of MDA (p< 0.001), the increased hepatic level of reduced GSH (p< 0.001) when compared to the control group. In addition, the pretreatment with propolis before Cd administration could not inhibit the changes against Cd toxicity except the APH that the propolis decreased the APH (p< 0.01), when compared to the Cd group. **Conclusion:** Therefore, it was concluded that propolis at dose of 25 mg/kg BW could not prevent the toxic effects of Cd against oxidative damages in rat liver since no improvement of the majority of parameters by propolis treatment.

Keywords: Propolis, cadmium, hepatotoxicity, lipid peroxidation malondialdehyde (mda), glutathione (gsh), alt, ast, alp.

* Corresponding author: Laboratory of Biotechnology of Bioactive molecules and Cell Physiopathology, University of Batna 2 Mustapha Benboulaid, Algeria.

Introduction

Cadmium is one of the most toxic heavy metals (El-Sharaky *et al.*, 2007), Cadmium (Cd) is distributed widely in the environment and is a highly toxic heavy metal. With the development of industries, the frequency of exposure of the body to Cd is gradually on the rise (Godt *et al.*, 2006). Cadmium exerts its toxic effects via oxidative damage to cellular organelles by inducing the generation of reactive oxygen species (ROS) (Stohs *et al.*, 2000), followed by development of oxidative stress in the target organs (Casalino *et al.*, 2002). Reactions of these ROS with cellular biomolecules have been shown to lead to lipid peroxidation and depletion of glutathione (Bagchi *et al.*, 1996, Stohs *et al.*, 2000). Cd accelerates lipid peroxidation by stimulating the peroxidation chain reaction in the target organs, resulting in the generation of ROS and consequently the induction of cytotoxicity (Habeebu *et al.*, 1998). The evolution of chronic liver diseases start from steatosis to chronic hepatitis, fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (Loguercio C. and Federico A., 2003, Lima *et al.*, 2007). Liver is the first organ exposed to the damaging effects of newly formed toxic substance. Natural antioxidants in complex mixtures if ingested with the diet are more efficacious than pure compounds in preventing oxidative stress-related pathologies due to particular interactions and synergisms (Vitaglione *et al.*, 2004) by modulating antioxidant, drug-metabolizing, and repairing enzymes along with acting as signaling molecules in important cascades for cell survival (Ferguson *et al.*, 2004, Williams *et al.*, 2004). Propolis has gained popularity in connection with oxidative stress (Tatli *et al.*, 2009). Several investigations on propolis in Eastern Europe, North Africa and South America have showed that flavonoids concentrated in propolis are powerful antioxidants which are able to scavenge free radicals (Kosalec *et al.* 2004, Segueni *et al.*, 2016, Ferreira *et al.*, 2017). In this study, we wished to investigate the possible effects of oral low dose (25 mg/kg BW (of lyophilized propolis (Jijel region, Algeria) pretreatment in combating the toxicity of CdCl₂ at high dose (300 mg/l drinking water) for twelve weeks on the activities of hepatic marker enzymes ASAT, ALA Tand ALP in serum, the level of lipid peroxidation and reduced GSH in liver homogenate in rats.

Materials and Methods

Chemicals

The lyophilized propolis was kindly provided from the laboratory of toxicology of Jijel University in

Algeria. CdCl₂ (prepared in distilled water) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) the other chemicals used, e.g. KCl, Na₂HPO₄ was purchased from Sigma-Aldrich (USA) and all the reagents were of analytical grade.

Animals

The study was performed on 3-month old male albinos Wistar rats (Pasteur Institute of Algiers, Algeria) each weighing approximately 230 g. The animals were divided to 4 groups, with free access to water and food. The ambient temperature was set at 22 °C, with a relative

Treatment of Animals

Pretreatment with Propolis

The animals were divided into two groups of: 12 rats receiving saline solution 0.9% daily for 5 days, 12 rats receiving an oral administration of lyophilized propolis (25 mg/kg/day) for 5 days.

CdCl₂ Treatment

The pretreatment animals were divided into four groups of 6 rats:

Control group (pretreatment with saline solution 0.9%) receiving bidistilled water as the drinking water for 12 weeks. Propolis (Pro) group (pretreatment with lyophilized propolis 25 mg/kg/day) receiving bidistilled water as the drinking water for 12 weeks. CdCl₂ group (pretreatment with saline solution 0.9%) receiving CdCl₂ (300 mg/l) in drinking water for 12 weeks. CdCl₂+Pro group (pretreatment with lyophilized propolis 25 mg/kg/day) receiving CdCl₂ (300 mg/l) in drinking water for 12 weeks. Diets and water were given ad libitum to rats

Collection of Biological Samples

At the end of 12 weeks of treatment, all rats were weighed and the blood was collected for collected the serum, then euthanized by ketamine anaesthesia. The liver was removed quickly from animals, washed in ice-cold physiological saline, weighed and stored with the serum at -80°C.

Analytical Procedure

Serum ALAT, ASAT, ALP and GGT determination: The serum levels of hepatic enzymes ALAT/ASAT and ALP, and serum GGT from treated animals were measured and their relative activities/level were compared with control samples. The serum level of ASAT, ALAT, ALP and GGT were assayed in the clinical laboratory Ibno-Sina. Constantine. Algeria. Using Cobas 6000 analyses USA.

Malondialdehyde (MDA) and Glutathione (GSH)

Lipid peroxidation (LPO) was measured by the

Hachemi *et al.*

method of Buege and Aust (1978). The level of LPO in the liver homogenate (1/10 tissue in potassium phosphate buffer pH = 7, 4) was measured based on the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Malondialdehyde (MDA) formed adducts with thiobarbituric acid, which was measured spectrophotometrically at 532 nm. An extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was applied for calculation and results were expressed as nmol MDA/mg tissues. GSH measurements were performed using a modification of the Ellman procedure (Beutler, 1975). Briefly, after centrifugation of the tissue homogenate at $3000 \times g$ for 10 min, 0.5 ml of supernatant was added to 2 ml of 0.3 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution. A 0.2 ml solution of dithiobisnitrobenzoate (0.4 mg/ml in 1% sodium citrate) was added and the absorbance at 405 nm was measured immediately after mixing. GSH levels were calculated using an extinction coefficient of $1.36 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Results were expressed as $\mu\text{mol GSH/mg}$ tissues.

Statistical Analysis

All values were presented as means \pm SEM. Differences between group means were calculated by one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test used by SPSS/PC computer program (IBM SPSS Statistics 20). Results were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Body Weight

The body weight gain/loss, of the rats in the experimental groups are presented in Fig 1. The results obtained indicated that body weight of rats exposed to CdCl_2 /pro + CdCl_2 decreased significantly compared with the control ($p < 0.001$).

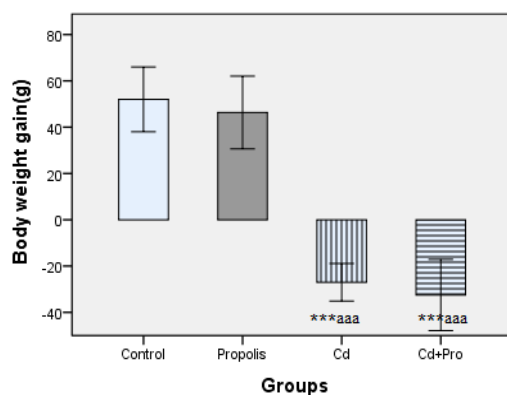


Figure 1: Body weight gain/loss. Expressed as body weight gain/loss in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl_2 treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl_2 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean \pm S.E.M from 6 animals. (***) denote significantly different from the control group at $p < 0.001$. (aaa) denote significantly different from the (Pro) group at $p < 0.001$.

Liver Weight Ratio

The results obtained indicated the liver weight ratio are presented Fig 2. The CdCl_2 no exert any significant effect on the liver weight ratio compared with the control ($p < 0.05$).

Enzyme Activities of ALAT, ASAT and ALP

The results obtained indicated the enzymes activities are presented in Figs 3, 4 and 5. No significant changes on the enzyme activities of ALAT and ASAT were observed in rats of (Pro + CdCl_2) group. In (CdCl_2) group the enzyme activity of ASAT decreased significantly when compared to the control group ($p < 0.05$). The propolis pretreatment in (Pro + CdCl_2) group decreased significantly the effects of CdCl_2 on ALP activity when compared to the (CdCl_2) group ($p < 0.05$).

Serum GGT Level

The results obtained indicated the levels of serum GGT are presented in Fig 6. The GGT increased significantly in the two groups of Cd (CdCl_2 and Pro + CdCl_2 group compared with the control group ($p < 0.001$).

Hepatic MDA and Reduced GSH Level

The CdCl_2 exert significantly decreased on the hepatic level of MDA and increased in reduced GSH level when compared to the control group ($p < 0.001$). In addition, the decrease of MDA of reduced GSH level by Cd treatment could not be prevented by the pre-treatment with lyophilized propolis 25 mg/kg BW. There was remain significantly decrease of MDA ($p < 0.001$) and increase of reduced GSH ($p < 0.001$) when compared to the control group (Figs 7, 8).

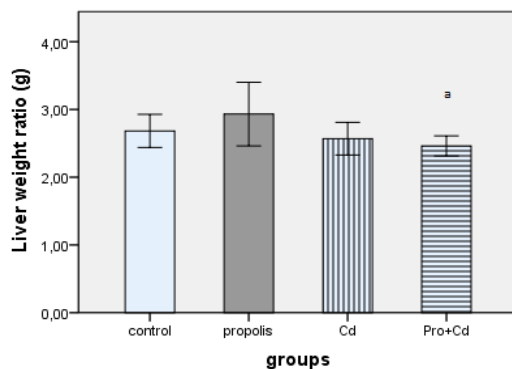


Figure 2: Liver weight ratio. Expressed as liver weight ratio in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl₂ treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl₂ 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean ± S.E.M from 6 animals. (A) Denote significantly different from the (Pro) group at p < 0.05.

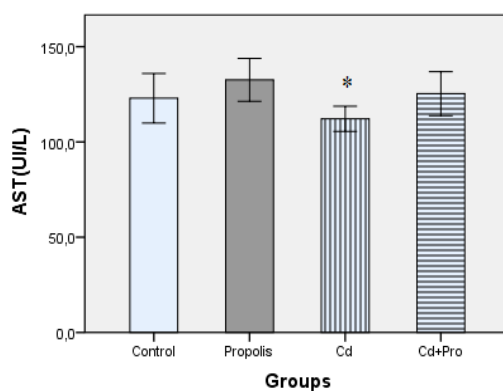


Figure 3: Serum ASAT level. Expressed as serum AST level in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl₂ treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl₂ 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean ± S.E.M from 6 animals. (*) denote significantly different from the (control) group at p < 0.05.

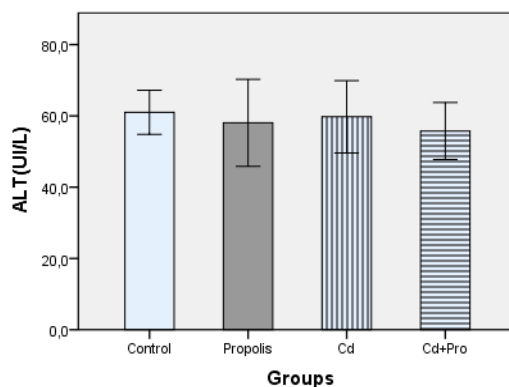


Figure 4: Serum ALAT level. Expressed as serum ALT level in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl₂ treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl₂ 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean ± S.E.M from 6 animals.

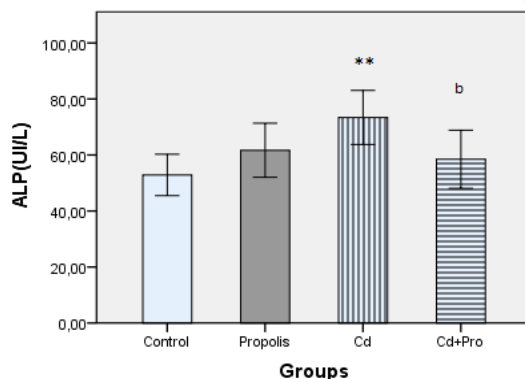


Figure 5: Serum ALP level. Expressed as serum ALP level in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl₂ treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl₂ 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean ± S.E.M from 6 animals. (**) denote significantly different from the (control) group at $p < 0.01$. (b) Denote significantly different from the (Cd) group at $p < 0.05$.

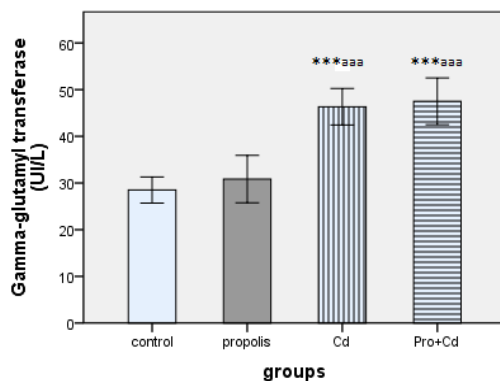


Figure 6: Serum GGT level. Expressed as serum GGT level in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl₂ treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl₂ 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean ± S.E.M from 6 animals. (***) denote significantly different from the control group at $p < 0.001$. (aaa) denote significantly different from the (Pro) group at $p < 0.001$.

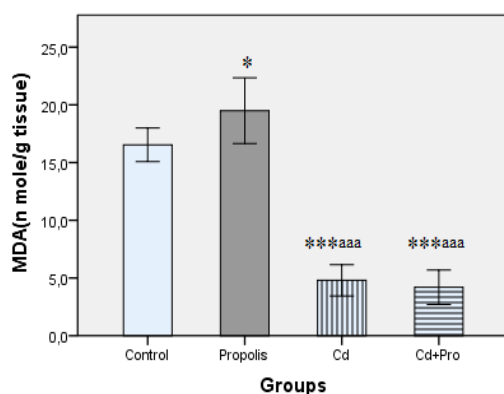


Figure 7: Hepatic MDA level. Expressed as MDA level, in the liver homogenate in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl₂ treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl₂ 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean ± S.E.M from 6 animals. (*) denote significantly different from the control group at $p < 0.05$. (***) denote significantly different from the control group at $p < 0.001$. (aaa) denote significantly different from the (Pro) group at $p < 0.001$.

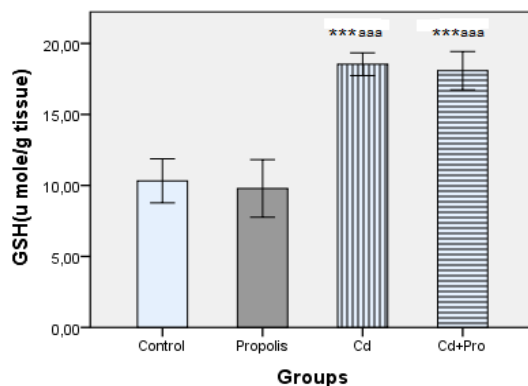


Figure 8: Hepatic GSH level. Expressed as serum GSH level in 12 weeks of treatment of control rats (control), propolis treated rats at dose of 25 mg/kg BW (Propolis), CdCl₂ treated rats at dose of 300 mg/l water (Cd), propolis 25 mg/kg BW and CdCl₂ 300 mg/kg BW (Pro + Cd). Results were expressed as mean ± S.E.M from 6 animals. (***) denote significantly different from the control group at $p < 0.001$. (aaa) denote significantly different from the (Pro) group at $p < 0.001$.

That cadmium administration resulted in remarkable reduction in body weight but no exert any significantly effect on liver weight ratio. The effect of Cd on the relative weights of the liver has been reported in several previous studies. Some studies have reported atrophy of the kidney, liver (Biswas *et al.*, 2001), while others have reported enlargement of this organ under the effect of cadmium (Novelli *et al.*, 1998, Zeng *et al.*, 2003, Pari and Murugavel, 2005). In our study, it was proposed that animals experiencing continuous exposure to heavy metals usually lose weight (Nwokocha *et al.*, 2012). In this study we observed Ur study the effect of CdCl₂ and AST is unexpected. There is not any effect of CdCl₂ on the serum ALT level and significantly decreased in AST compared with the control ($p < 0.05$). The ALP increased significantly in (CdCl₂) group compared with control group ($p < 0.01$). The propolis significantly inhibit the increase of the serum level of ALP compared with (CdCl₂) group ($p < 0.05$). Liver injury subsequent to cadmium-toxicity is usually established by high levels of serum hepatic marker enzymes indicating cellular leakage and damage of functional integrity of liver membrane architecture. Elevated levels of alanine transaminase and aspartate transaminase are vital parameters to identify liver damage (Gupta *et al.*, 2004). High levels of serum alkaline phosphatase (ALP) are also linked to the condition and function of liver cells. An elevated serum alkaline phosphatase is associated with liver damage (Renugadevi and Prabu, 2010). The present study showed a significant decrease in MDA levels in the liver of the contaminated rats with CdCl₂ (300 mg/l water) for 12 weeks compared with the control rats ($p < 0.001$) at the end of the study period. This excludes the possibility of an oxidative nature of the Cd in the liver tissue These results are in accordance with several previous reports (Shibutani *et al.*, 2001,

Kawagoe *et al.*, 2005, Haouem and El Hani, 2013) which showed that cadmium decreases lipid peroxidation in the liver of rats and mice. In contrast, other studies have reported an increase in lipid peroxidation in the liver under the influence of Cd (Shibutani *et al.*, 2001, Hammoud *et al.*, 2017). Along with the reduction of lipid peroxidation, we reported increased levels of GSH and gamma GT significantly in this organ compared with the control group ($p < 0.001$). Other studies (Kawagoe *et al.*, 2005, Eşrefoglu *et al.*, 2007, Haouem and El Hani, 2013) supports our result. The effect of chronic exposures to Cd is different of the acute exposure (Patra *et al.*, 2011). Reactive oxygen species (ROS) are often implicated in Cd-induced deleterious health effects. There are direct evidence of the generation of free radicals in animals following acute Cd overload, and indirect evidence of involvement of ROS in chronic Cd toxicity and carcinogenesis. Cd-generated superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals in vivo have been detected by the electron spin resonance spectra, which are often accompanied by activation of redox sensitive transcription factors (e.g., NF-κB, AP-1 and Nrf2) and alteration of ROS related gene expression. It is generally agreed upon that oxidative stress plays important roles in acute Cd poisoning. However, direct evidence for oxidative stress is often obscure following long-term and environmentally-relevant low levels of Cd exposure. Alterations in ROS-related gene expression during chronic exposures are also less significant compared to acute Cd poisoning. This is probably due to induced adaptation mechanisms such as overexpression of metallothionein and glutathione following chronic Cd exposures, which in turn diminish Cd-induced oxidative stress. In chronic Cd-transformed cells, less ROS signals are detected with fluorescence probes. Acquired apoptotic tolerance renders damaged cells to proliferate with inherent

oxidative DNA lesions, potentially leading to tumorigenesis. Thus, ROS are generated following acute Cd overload that play an important roles in tissue damage. Adaptation to chronic Cd exposure reduces ROS production, but acquired Cd tolerance with aberrant gene expression plays important roles in chronic Cd toxicity and carcinogenesis³¹. In conclusion, the data of the present study suggest that the CdCl₂ (300 mg/l water) during 12 weeks produce an oxidative nature of this metal in liver tissue characterized by decreased in MDA level and increased in gamma GT and reduced GSH. This study demonstrates that oral pre-treatment with propolis at dose of 25 mg/kg BW did not recover the alterations induced by Cd at a significant statistically level. Exception the significant effect on ALP level in (Pro+ CdCl₂) group compared with (CdCl₂) group (p< 0.001). Further detail study will be needed to clarify the mechanism of propolis against Cd-induced liver injury and the mechanism of decreased in hepatic MDA during high dose and longtime of exposition to cadmium.

References

- El-Sharaky A.S., Newairy A.A., Badreldeen M.M., Eweda SM, and Sheweita S.A. (2007) Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats. *Toxicology*, 235: 185–193.
- Godt J., Scheidig F., Grosse Siestrup C., *et al.*, The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol*. 10 (1): 22, 2006.
- Stohs S.J., Bagchi D., Hassoun E., Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 20: 77–88, 2000.
- Casalino E., Calzaretto G., Sblano C., Landriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicol*. 30: 37-50, 2002.
- Stohs S.J., Bagchi D., Hassoun E., Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 20: 77–88, 2000.
- Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E.A., Stohs S.J. Cadmium induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. *Biol Trace Elem Res*. 52: 143–54, 1996.
- Habeebu S.S., Liu J., Liu Y., *et al.*, Susceptibility of MT null mice to chronic CdCl₂-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. *Toxicol Sci*. 46: 197–203, 1998.
- Lima C.F., Fernandes Ferreira M., and Pereira Wilson C. Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 45(3): 456–464, 2007.
- Loguercio C. and Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*. 34 (1): 1–10, 2003.
- Vitaglione P., Morisco F., Caporaso N., and Fogliano V. “Dietary antioxidant compounds and liver health,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44 (7-8): 575–586, 2004.
- Ferguson L.R., Philpott M., and Karunasinghe N. Dietary cancer and prevention using anti mutagens, *Toxicology*. 198 (1–3): 147–159, 2004.
- Williams R.J., Spencer P.E., and Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*. 36 (7): 838–849, 2004.
- Tatli Seven P., Yılmaz, S., Seven İ., Çerçi İ.H., Azman, M.A. & Yılmaz M. The effect of propolis on selected blood indicators and antioxidant enzyme activities in broilers under heat stress. *Acta Vet Brno*. 78: 75-83, 2009.
- Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S., Vladimir Knezevic S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta. Pharm*. 54 (1): 65-72, 2004.
- Segueni N., Zellagui A., Moussaoui F., Lahouel M., Rhouati S. Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian Journal of Chemistry*. 9 (1): s425-s428 2016.
- Ferreira J.M., Fernandes-Silva C.C., Salatino A. New propolis type form north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical. *Origin Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97 (11): 5552-3558, 2017.
- Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 52: 302-10, 1978.
- Beutler E. Glutathione in red blood cell metabolism. *A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune and Stratton. 112, 1975.
- Biswas N.M., Gupta R.S., Chattopadhyay A., Coudhury G.R., and Sarcar M. Effect of atenolol on cadmium-induced testicular toxicity in male rats. *Reprod Toxicol*. 15: 699–704, 2001.
- Pari L., and Murugavel P. Role of diallyl tetrasulfide in ameliorating the cadmium induced biochemical changes in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 20: 493–500, 2005.
- Novelli E.L., Vieira E.P., Rodrigues N.L., and Ribas B.O. Riskassessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. *Environ Res*. 79: 102–105, 1998.
- Zeng X., Jin T., Zhou Y., and Nordberg G.F. Changes of serum sex hormone levels and MT mRNA expression in rats orally exposed to cadmium. *Toxicology*. 186: 109–118, 2003.
- Nwokocha C.R., Owu D.U., Nwokocha M.I., Ufearo

Hachemi *et al.*

- C.S., Iwuala M.O.E. Comparative study on the efficacy of *Allium sativum* (garlic) in reducing some heavy metal accumulation in liver of Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 50: 222–6, 2012.
- Gupta M., Mazumder U.K., Kumar T.S., Gomathi P., Kumar R.S. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Bauhinia racemosa* against paracetamol and carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Iran J Pharmacol Ther.* 3 (1): 12–20, 2004.
- Renugadevi J., Prabu S.M. Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin. *Exp Toxicol Pathol.* 62 (2): 171–181, 2010.
- Shibutani M., Mitsumori K., Satoh S., Hiratsuka H., Satoh M., Sumiyoshi M., Nichijima M., Katsuki Y., Suzuki J., Nakagawa J., Akagi T., Imazawa T., and Ando M. Relationship between toxicity and cadmium accumulation in rats given low amounts of cadmium chloride or cadmium-polluted rice for 22 months. *J Toxicol Sci.* 26: 337–358, 2001.
- Kawagoe M., Hirasawa F., Wang S.G., Liu Y., Ueno Y., and Sugiyama T. Orally administrated rare earth element cerium induces metallthionein synthesis and increases glutathione in the mouse liver. *Life Sci.* 77: 922–937, 2005
- Haouem S. and El Hani A. Effect of Cadmium on Lipid Peroxidation and on Some Antioxidants in the Liver, Kidneys and Testes of Rats Given Diet Containing Cadmium-polluted Radish Bulbs. *J Toxicol Pathol.*, 26: 359–364, 2013
- Hammoud G.M., Salem A.A. and EL Sawy K.M. Assessment of beneficial effect of propolis against cadmium induced toxicity and oxidative stress in rats. *Journal of Chemical, Biological and physical Sciences.* 7 (4): 1205-1224, 2017.
- Eşrefoglu M., Gül M., Dogru M.I., Dogru A., and Yürekli M. Adrenomedullin fails to reduce cadmium-induced oxidative damage in rat liver. *Exp Toxicol Pathol.* 58: 367–374, 2007.
- Patra, R.C. Rautray A.K. and Swarup D. Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. *Veterinary Medicine International.* 5: 1-9 pages, 2011.