

تأثير الزيت أحادي الخلية SCO المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* في بعض التغيرات النسجية والفسلجية للجرذان المختبرية

وسن داود موسى العبيدي*  لؤي حاتم علي  ظافر فخري الراوي 

جامعة الأنبار - كلية التربية للعلوم الصرفة

*المراسلة الى: وسن داود موسى العبيدي، قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الانبار، الرمادي، العراق.

البريد الالكتروني: wsa21u1005@uoanbar.edu.iq

Article info

Received: 2024-02-04

Accepted: 2024-03-05

Published: 2024-06-30

DOI-Crossref:

10.32649/ajas.2024.183744

Cite as:

Al-Obeidi, W. D. M., Ali, L. H., and Al-Rawi, Dh. F. (2024). The effects of single cell oil (sco) produced from bacillus subtilus on certain histological and physiological changes in laboratory rats. Anbar Journal of Agricultural Sciences, 22(1): 429-454.

©Authors, 2024, College of Agriculture, University of Anbar. This is an open-access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير الزيت احادي الخلية SCO المنتج من بكتريا *Bacillus subtilus* على بعض المتغيرات الكيموحيوية للكبد والكلية للجرذان المختبرية ومعرفة تأثيره على أنسجة كل منهما. استخدمت في هذه الدراسة 16 من ذكور الجرذان المختبرية وقسمت إلى أربعة مجاميع، أعطيت المجاميع الأربع الجرعة كل 48 ساعة ولمدة 21 يوما. بينت نتائج الدراسة حدوث ارتفاع معنوي في مستوى انزيمي Aspartate aminotransferase (AST) و Alanine transaminase (ALT) واليوريا Urea والكرياتينين Creatinine والكوليسترول الكلي والكلسريدات الثلاثية والمالون ثنائي الديهايد Malondialdehyde (MDA) وانخفاض في تركيز كل من Glutathion (GSH) و Catalase (CAT) في المجموعة الرابعة مقارنة مع مجموعة السيطرة، أما المجموعة الثانية فلم تظهر أي تغير معنوي في مستوى AST و ALT واليوريا والكرياتينين والكوليسترول الكلي والكلسريدات الثلاثية، بينما في المجموعة الثالثة حصل انخفاضاً معنوياً في مستوى AST و ALT واليوريا والكرياتينين والكوليسترول والكلسريدات الثلاثية و MDA مقارنة مع مجاميع السيطرة. لم تظهر المقاطع النسجية لكبد وكلية المجموعة الثانية أي تغيرات مقارنة مع مجاميع السيطرة، بينما أظهرت المجموعة الثالثة النسق الطبيعي للخلايا مع بداية حدوث تغيرات نسجية بسيطة، أما المجموعة الرابعة فأظهرت المقاطع للكبد تشوهات نسجية تمثلت بنشخ وتمزق الوريد المركزي مع ترسب Amyloid وتصلب للقناة الصفراوية مع وجود ارتشاح للخلايا اللمفية فضلا عن تنخر

Necrosis وتتكس Degeneration في بعض الخلايا، في حين أظهر الفحص النسجي لمقاطع الكلية للمجموعة الرابعة ظهور تغيرات نسجية شديدة تمثلت بتحطم الكبيبات Damage of Glomerulus مع انسلاخ بعض النبيبات البولية Desquamation وملاحظة نزف Hemorrhage وارتشاح للخلايا اللمفية وتتكس في بعض خلايا النبيبات وحدوث تثخن في جدار الاوعية الدموية Thickness wall.

كلمات مفتاحية: الزيت احادي الخلية، Bacillus Subtilus، التغيرات النسجية، التغيرات الفسلجية، الجرذان المختبرية.

THE EFFECTS OF SINGLE CELL OIL (SCO) PRODUCED FROM BACILLUS SUBTILUS ON CERTAIN HISTOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHANGES IN LABORATORY RATS

W. D. M. Al-Obeidi* 

L. H. Ali 

Dh. F. Al-Rawi 

College of Agriculture- University of Anbar

*Correspondence to: Wassan D. M. Al-Obeidi, Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Anbar, Ramadi, Iraq.

Email: wsa21u1005@uoanbar.edu.iq

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of Single Cell Oil (SCO) produced from *Bacillus subtilis* bacteria on certain biochemical variables in the liver and kidneys of laboratory rats, as well as its impact on their tissues. Sixteen male laboratory rats were used and divided into four groups, with each group receiving doses every 48 hours for a period of 21 days. The results showed a significant increase in the levels of Aspartate aminotransferase (AST), Alanine transaminase (ALT), urea, creatinine, total cholesterol, triglycerides, and Malondialdehyde (MDA), and a decrease in the concentration of Glutathione (GSH) and Catalase (CAT) in the fourth group compared to the control group. The second group did not exhibit any significant changes in the levels of AST, ALT, urea, creatinine, total cholesterol, or triglycerides. Conversely, the third group demonstrated a significant decrease in the levels of AST, ALT, urea, creatinine, cholesterol, triglycerides, and MDA compared to the control group. Histological examination revealed no changes in the liver and kidneys of the second group compared to the control group. The third group showed a normal cellular pattern with the onset of minor histological changes, whereas the fourth group exhibited histological abnormalities in the liver, including thickening of the central vein wall with amyloid deposition (AM), bile duct hardening (BC), infiltration of lymphoid cells (LI), necrosis (N), and degeneration (D) in some cells. In the kidneys of the fourth group, severe histological changes were observed, characterized by the destruction of the glomeruli (DG), desquamation of some urinary tubules (DE), hemorrhage (H),

infiltration of lymphocytes (LI), degeneration (D) in some tubule cells, and thickening of the vascular wall (TW).

Keywords: Single Cell Oil, Bacillus Subtilus, Amyloid, Degeneration, MDA, GSH Rats.

المقدمة

تعتبر الدهون مصدراً مهماً للطاقة والفيتامينات الذائبة والاحماض الدهنية الاساسية المهمة لنمو الانسان، وهي من المكونات الاساسية لأغشية الخلايا وتشارك في تنظيم التعبير الجيني (16). تستعمل الدهون في إنتاج الغذاء والمكملات الغذائية والمنظفات ومواد التشحيم والوقود الحيوي (31). يؤدي استعمال الدهون والزيوت الطبيعية للاستهلاك الغذائي أو كمواد خام لإنتاج الوقود الحيوي والطاقة الحيوية إلى حدوث نقص في هذه المواد، مما يؤدي إلى مشاكل مرتبطة بندرة الموارد والتلوث البيئي (39)، يمكن أن يكون إنتاج الزيوت أحادية الخلية SCO والتي تسمى أيضاً الدهون الميكروبية أحد الحلول الممكنة لهذه المشاكل (42). تعد الكائنات الحية الدقيقة أحادية الخلية مصدراً بديلاً للدهون عالية القيمة لسلسلة من الأسواق المتنامية التي تتطلب بدائل منخفضة التكلفة وعالية الجودة (8)، إذ تعتبر الدهون المنتجة باستخدام مصادر ميكروبية مختلفة بديلاً مستداماً للدهون المشتقة من النبات، فإلى جانب المصادر التقليدية المختلفة للدهون (النباتات والحيوانات والمصادر البحرية) يمكن أن تنتج العديد من سلالات الكائنات الحية الدقيقة بما في ذلك الفطريات والطحالب والبكتيريا و *thraustochytrids* المشتقة من البحر أنواعاً مختلفة من الدهون.

يتم استخدام مجموعة متنوعة من تقنيات الإنتاج الميكروبي لتنمية هذه الكائنات الحية في ظل ظروف محددة باستخدام المخلفات الزراعية كمصدر للكربون لتكون تنافسية من حيث التكلفة مع الدهون المشتقة من النباتات (31). تشير التقديرات إلى أن المواد الأولية (مصادر الكربون) تمثل حوالي 50-85% من إجمالي التكاليف في عمليات التخمر وإنتاج الزيوت أحادية الخلية SCO (11). يوفر استعمال الكائنات الحية الدقيقة لإنتاج الدهون الميكروبية أو الزيوت أحادية الخلية بعض المزايا فيما يتعلق بالتنوع الهائل في تكوين الأحماض الدهنية اعتماداً على مصدر الكربون المستعمل في نمو الخلايا (6). إذ تحتوي هذه الزيوت في المقام الأول على أحماض *stearic* و *palmitic* بالمقارنة مع الزيوت التقليدية، وتتمتع هذه الزيوت باستقرار حراري كبير (35 و 58)، كما تمتاز باحتوائها على كمية كبيرة من مضادات الأكسدة مما يجعل الزيت الميكروبي أقل عرضة للأكسدة من الزيوت التقليدية (48).

إن إنتاج الزيت الميكروبي له مزايا مقارنة بالزيوت النباتية والبحرية منها انخفاض تكاليف النمو والقدرة على هندسة بنية الزيت باستعمال التعديل الوراثي، وأن الزيت الميكروبي المنتج يكون أكثر استدامة وأماناً بدون مبيدات حشرية أو مبيدات أعشاب أو معادن ثقيلة ودون الحاجة إلى الأرض (24). تعتبر الدهون الميكروبية أو الزيوت أحادية الخلية (SCO) التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة الزيتية مصدراً للأحماض الدهنية الأساسية للحيوانات والبشر كونها يفتقران إلى القدرة على تصنيع الأحماض الدهنية الأساسية لذا يجب توفيرها من خلال النظام الغذائي (10).

يقترن إنتاج SCO التجاري على الزيوت التي تحتوي على كميات كبيرة من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (PUFAs) للأغراض الغذائية (27)، إذ أن هذه الأحماض تؤثر في العديد من الوظائف الفسيولوجية المختلفة في جسم الإنسان وبالتالي فهي مهمة لصحة الإنسان، ومنها حامض اللينوليك LA Linoleic (أوميغا 6) وحامض ALA α -linolenic (أوميغا 3). يلعب حامض LA Linoleic و ALA α -linolenic أدواراً مهمة كونهما مكونات تركيبية للغشاء ثنائي الطبقة وكسلائف للإيكوسانويدات Eicosanoids التي تعتبر ضرورية لجميع الثدييات (41).

كما يعد حامض الدوكوساهيكسانويك DHA Docosahexaenoic (أوميغا 3) من الأحماض الدهنية الرئيسية الضرورية لتغذية الإنسان (12)، فهو يعتبر مكوناً رئيسياً للأغشية العصبية وشبكية العين ومغذٍ مهم بشكل خاص من حيث الوظائف البيولوجية أثناء نمو الرضع، إضافة إلى ذلك فإن هذا الحامض يمنع الاضطرابات العصبية والأوعية الدموية التي تسببها السكتة الدماغية وكذلك يمنع الخرف (62).

أما حامض الأراكيدونيك ARA Arachidonic (أوميغا 6) فله تطبيقات واسعة في الطب والصيدلة والنظام الغذائي وتغذية الرضع، نظراً لخصائصه البيولوجية الفريدة (15). تدخل الأحماض الدهنية غير المشبعة PUFAs في تركيب الصفائح الدموية thrombocytes والخلايا العصبية والعضلية وكذلك الخلايا ذات الكفاءة المناعية مثل العدلات neutrophils، والوحيدات monocytes (41)، كما ترتبط الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة أوميغا 3 (n-3 PUFA) بمجموعة متنوعة من الفوائد الصحية ضد الاضطرابات البشرية والأمراض (34)، إذ أنها تقلل من ضغط الدم المرتفع، والسكتة الدماغية، والسكري، وهشاشة العظام، والاكنتاب، والفصام، والربو، والتتسكس البقعي، والتهاب المفاصل الروماتويدي وما إلى ذلك (7).

الهدف من الدراسة الحالية هو معرفة تأثير الزيت احادي الخلية SCO الذي تم انتاجه في دراسة سابقة (5) من بكتريا *Bacillus subtilis* على بعض التغيرات الفسلجية والنسجية للحيوانات المختبرية (الجرذان) بعد معرفة نوعية الاحماض الدهنية المكونة له باستعمال جهاز (GC) وجهاز (HPLC) بغية استعماله لاحقاً في التطبيقات الغذائية.

المواد وطرائق العمل

حيوانات التجربة Experimental animals: أجريت الدراسة في الحقل الحيواني التابع لقسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الأنبار، وقد توفرت في الحقل كافة المستلزمات الضرورية لإجراء التجربة الخاصة بموضوع الدراسة.

شملت التجربة 16 من ذكور الجرذان البيض السويسرية Sprague Dawely التي تراوحت أعمارها بين 10-12 أسبوع، وأوزانها بين 180-200 غم، وضعت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية أبعادها 64*15.5*30 سم ذات أغشية معدنية مصممة خصيصاً لهذا الغرض.

خضعت الحيوانات لظروف مختبرية من دورة إضاءة تتكون من 11 ساعة من الضوء و13 ساعة من الظلام، تم الحفاظ على درجة الحرارة ثابتة عند 22 ± 2 درجة مئوية، وتم تنظيف وتعقيم الأقفاص، واستبدال نشارة الخشب مرتين في الأسبوع.

تركزت الحيوانات لمدة أسبوع للتأقلم مع الظروف الجديدة وللتأكد من خلوها من الأمراض، بعدها تم تجرير الحيوانات المختبرية فموياً بالزيت أحادي الخلية SCO الذي تم إنتاجه من بكتريا *B. subtilis* (5) مع إعطاء الغذاء والماء بشكل مستمر طوال مدة التجريع.

تصميم التجربة Experimental design: قسمت الحيوانات عشوائياً إلى أربع مجاميع تضم كل مجموعة أربعة حيوانات وبأوزان متقاربة كما مبين أدناه:

المجموعة الأولى (مجموعة السيطرة Control group): جرعت فموياً بزيت الذرة تركيز 2 مل / كغم.

المجموعة الثانية: جرعت فموياً بـ SCO تركيز 2 مل / كغم.

المجموعة الثالثة: جرعت فموياً بـ SCO تركيز 4 مل / كغم.

المجموعة الرابعة: جرعت فموياً بـ SCO تركيز 8 مل / كغم.

أعطيت المجاميع الأربع الجرعة كل 48 ساعة ولمدة 21 يوماً.

أخذ عينات الدم: بعد انتهاء فترة التجريع جوعت الجردان لمدة 24 ساعة، ثم سحبت عينات الدم بواسطة محقنة طبية من القلب مباشرة بعد تخدير الحيوان بمادة الكلوروفورم، ووضعت العينات في انابيب اختبار test tubes خالية من مانع تخثر الدم وتركت لمدة 30 دقيقة في حمام مائي بدرجة حرارة 37م°، ثم فصل المصل serum بجهاز الطرد المركزي centrifuge بسرعة 3000 دورة/دقيقة وحفظت بدرجة حرارة -20 م° لحين إجراء الاختبارات الكيموحيوية.

أخذ عينات الأنسجة: تم استئصال الأعضاء (الكلى Kidney والكبد Liver) لكل حيوان، ثم وضعت في المحلول الملحي الفسلجي (0.9%) لغسلها، بعدها نُقلت إلى محلول التثبيت (الفورمالين 10%) لحين إجراء الدراسة النسجية عليها.

الاختبارات الكيموحيوية: تم استخدام الطريقة الإنزيمية في اختبارات وظائف الكبد Liver function test، إذ استخدمت عدّة التحليل (Kit) من شركة (Linear) الإسبانية لتقدير فعالية إنزيم ALT وAST وحسب طريقة (47).

وفي اختبارات وظائف الكلى Renal function test تم تقدير تركيز الكرياتينين (Creatinine) في مصل دم الجردان باستخدام عدّة التحاليل الجاهزة من شركة (Linear) الإسبانية وحسب طريقة (56)، وقدر تركيز اليوريا Urea في المصل باستخدام عدّة التحليل من نوع (Linear) الإسبانية وحسب طريقة (13 و51).

أما مرتسم الدهون فقد تم قياس تركيز الكوليسترول cholesterol في مصل الدم باستخدام عدّة التحاليل (Kit) الجاهزة من شركة (Biolabo) الفرنسية وحسب (4)، وقدر تركيز الكليسيريدات الثلاثية triglycerides باستخدام عدّة التحاليل (Kit) الجاهزة من شركة (Biolabo) الفرنسية وحسب طريقة (20).

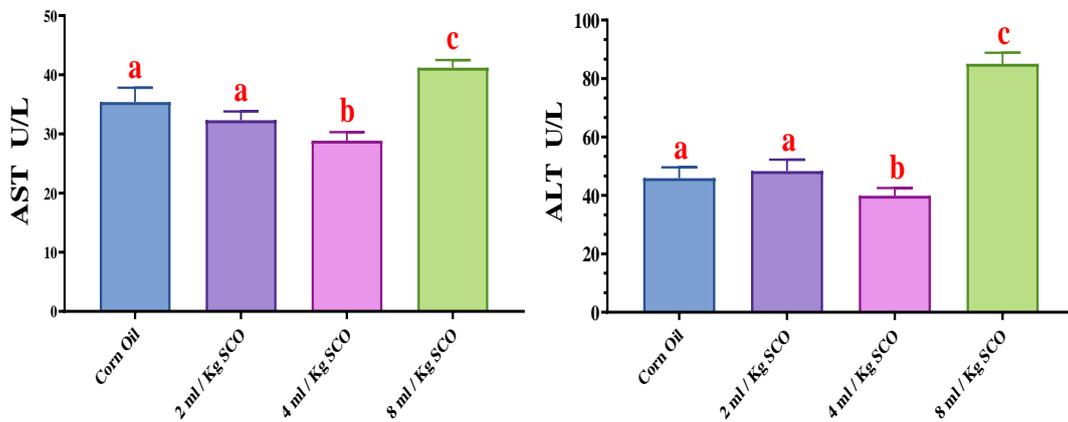
وأما الإجهاد التأكسدي Oxidative stress فقد تم تقدير تركيز المالون ثنائي الديهايد في المصل (MDA) malondialdehyde باستخدام الطريقة المحورة من خلال قياس كمية المالون ثنائي الديهايد وهو يمثل أحد النواتج الرئيسية لبيروكسدة الدهون وحسب طريقة (32).

وتم قياس مضادات الأكسدة Antioxidants وتشمل قياس نسبة مستوى الجلوتاثيون (GSH) في مصل الدم والكتاليز (CAT)، إذ قَدَّر تركيز الكلوتاثيون باستخدام الطريقة المحورة المتبعة من قبل الباحثين (52) وتعتمد هذه الطريقة على استخدام كاشف إلمان Ellman's reagent الحاوي على (DTNB) 5,5- dithio bis2- Nitrobenzoic acid، وقَدَّرت فعالية إنزيم الكتاليز حسب الطريقة المتبعة من قبل الباحث (3) التي تعتمد على خاصية انزيم الكتاليز في تجزئة مركب بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الى ماء H_2O .

تحضير المقاطع النُسجية Histological Sections Preparation: تم تشريح الفئران واستئصال (الكبد والكلية) المطلوبة في الدراسة الحالية، شطفت الأعضاء بمحلول الملح الفسلاحي ثم غمرت في محلول 10% من الفورمالين المحاييد لمدة يوم واحد، بعد ذلك شطفت العينات بماء الصنبور لمدة ثلاثين دقيقة لإزالة أي محلول تثبيت متبقي، ثم تم استخدام هذا النهج لإجراء سلسلة من الإجراءات عليهم (9).

النتائج والمناقشة

الاختبارات الكيموحيوية: أولاً: تأثير الزيت أحادي الخلية (SCO) على بعض انزيمات الكبد: أظهرت نتائج الدراسة الحالية حدوث ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في مستوى كلا من AST و ALT في المجموعة المعاملة ب (SCO) تركيز 8 مل / كغم وكما موضح في الشكل 1، إذ كانت نتائج الـ AST و ALT 41.19 ± 1.28 و 85.05 ± 3.79 وحدة دولية وعلى التتابع بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي كانت نتائجها 35.36 ± 2.44 و 45.86 ± 3.74 وحدة دولية، في حين لم تظهر النتائج أي تغير معنوي ($P \leq 0.05$) في مستوى كلا من AST و ALT في المجموعة المعاملة ب (SCO) تركيز 4 مل / كغم، إذ كانت النتائج 32.31 ± 1.49 و 48.32 ± 3.89 ، بينما سجلت النتائج انخفاضاً في مستوى كلا من AST و ALT في المجموعة الثالثة والتي جرعت 4 مل / كغم، إذ سجلت النتائج 28.84 ± 1.45 و 39.85 ± 2.65 وحدة دولية وعلى التتابع عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.



شكل 1: يوضح تأثير الزيت احادي الخلية على بعض انزيمات الكبد AST و ALT.

(Fig. 1) The Effect of Single Cell Oil (SCO) on liver enzymes (AST and ALT).

- The number of animals is four for each group.

- Different letters indicate the presence of significant differences ($P \geq 0.05$) within the 21-day experimental period.

ان الانخفاض الحاصل في فعالية الانزيمات المذكورة اعلاه كان واضحا في المجموعة الثالثة وهذا ربما بسبب احتواء زيت احادي الخلية على احماض دهنية منها α -Linolenic Acid و Linoleic Acid كما موضحة في الجدول 1 التي تعمل كمنظفات Scavengers في التخلص من الجذور الحرة (38)، وأن هذه النتائج تشير الى فعالية الزيت ربما كمضادة للاكسدة ضد الاذى التخريري المحدث بواسطة تراكم الجذور الحرة اذ إنه يحمي مايتوكونديريا ومايكروسومات الكبد من التغيرات المحطمة للأغشية وخاصة بيروكسدة الدهون، وبالتالي يمنع انزيمات الخلايا من التحرر الى الدم (19).

كما نعتقد ان الانخفاض الحاصل في معدل فعالية الإنزيمات AST و ALT في امصال حيوانات المجاميع المعاملة بزيت احادي الخلية قد يكون دوره في المساهمة في اصلاح اغشية الخلايا وبذلك يعمل على المحافظة على بقاء تراكيز الإنزيمات طبيعياً داخل الخلايا او عن طريق رفعه لمستوى مضادات الأكسدة (63).
بينما سبب الارتفاع في المجموعة الرابعة ربما يكون ناتج من حدوث ضرر في بعض اغشية الخلايا الكبدية الناجمة من الجرعات العالية من SCO وما تحتويه من بعض الاحماض الدهنية المشبعة منها Palmitic acid وغيره والتي قد تولد انتاج مفرط من الجذور الحرة من مجاميع الاوكسجين التفاعلي (ROS) التي تولد اجهدا تأكسدياً للأغشية الخلوية فتزيد من نفاذية هذه الاغشية وفقدان سلامتها الوظيفية (40).

جدول 1: الاحماض الدهنية الموجودة في الزيت أحادي الخلية ونسبها.

ت	Fatty acid	Percentage	Fatty acid	Percentage
1.	Palmitic acid (saturated)	6.383%	Propionic acid (unsaturated)	8.914%
2.	Palmitoleic acid (unsaturated)	16.579%	Acetic acid	1.723%
3.	Stearic acid (saturated)	1.996%	Butyric acid (saturated)	0.663%
4.	Oleic acid (unsaturated)	4.449%	Formic acid	0.511%
5.	Linoleic acid (unsaturated)	46.030%	Lactic acid	5.081%
6.	Linolenic acid (unsaturated)	7.666%		

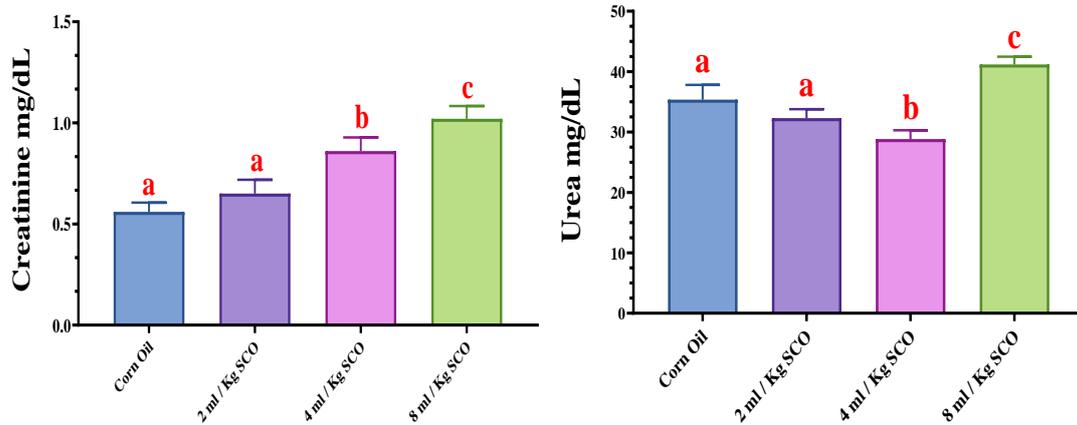
(Table 1) Fatty acids in unicellular oil and their ratios.

ثانيا: تأثير زيت احادي الخلية (SCO) على وظائف الكلى: أشارت نتائج الدراسة إلى وجود ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في مستوى اليوريا والكرياتينين كما في الشكل 2 عند تجريب الجرذان بـ (SCO) تركيز 8 مل / كغم مقارنة بمجموعة السيطرة، اذ بلغ تركيز اليوريا 41.19 ± 1.28 بينما كان تركيز الكرياتينين 1.02 ± 0.06 مقارنة مع مجموعة السيطرة التي سجلت 35.36 ± 2.44 و 0.56 ± 0.04 لليوريا والكرياتينين وعلى التوالي. في حين بينت دراستنا حصول انخفاض معنوي في مستوى اليوريا والكرياتينين في المجموعة الثالثة اذ بلغ تركيز اليوريا 28.84 ± 1.45 بينما كان تركيز الكرياتينين 0.86 ± 0.06 مقارنة مع مجموعة السيطرة، بينما لم تسجل نتائج دراستنا الحالية اي فروقات معنوية ($P \leq 0.05$) في مستوى كلا من اليوريا والكرياتينين في المجموعة المعاملة بـ (SCO) تركيز 2 مل/كغم، اذ سجلت النتائج 32.31 ± 1.49 و 0.65 ± 0.06 لليوريا والكرياتينين وعلى التوالي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة.

قد يعزى سبب الارتفاع إلى الجذور الحرة والتي قد تكونت بفعل المكونات الموجودة في زيت احادي الخلية التي تعمل على أكسدة البروتينات والأحماض الامينية وينتج عن هذه العملية زيادة تركيز اليوريا في مصل الدم

كنتاج ثانوي (57)، كذلك يمكن تفسير ارتفاع مستوى اليوريا في حالة الكرب التأكسدي بفقدان المصدر المباشر للطاقة (الكوكوز) ولجوء الحيوان إلى استهلاك البروتينات مصدراً بديلاً للطاقة والذي ينجم عنه تكوين كميات كبيرة من اليوريا بسبب حدوث خللا في كفاءة النفرون في تخليص الجسم من فضلات الايض الخلوي (35)، اذ تعد قدرة الكلية على طرح الكرياتينين واليوريا من المؤشرات الحيوية المهمة في تقييم اداء الكلى، فضلا عن ذلك ما يحدثه الاجهاد التاكسدي من اضطراب وظيفي لخلايا الطبقة الداخلية للأوعية الشعرية الكبيبية مما يؤدي إلى زيادة تركيز الكرياتينين في الدم وقلة طرحه مع البول (53)، او قد يرجع سبب الارتفاع هو المضاعفات المزمنة التي تحدث في بعض اجزاء الجسم بسبب الاجهاد التأكسدي ومنها الاعتلال الكلوي الذي يتميز بتغيرات سلبية بطيئة ومتدرجة في وظيفة الكلى مما يؤدي إلى ارتفاع مستوى اليوريا والكرياتينين (1).

بينت النتائج ان معاملة الجرذان بزيت احادي الخلية تركيز 2 و4 مل /كغم ادى إلى حدوث انخفاض معنوي في تركيز اليوريا وارتفاعا غير معنوي في تركيز الكرياتينين مقارنة بمجموعة السيطرة، ويعزى سبب الانخفاض في تركيز اليوريا إلى احتواء الزيت على مركبات مهمة تعمل كمضادات للأكسدة وبشكل خاص حامض Linoleic وحامض Palmitoleic التي تعمل على إزالة الجذور الحرة ومنع أكسدة البروتينات والأحماض الأمينية وبذلك تقلل من إنتاج اليوريا في الجسم، وكما تسهم في اختزال التلف التأكسدي للخلايا الكلوية والكبيبات الدموية وزيادة معدل الترشيح الكبيبي وتعمل على تقليل الأذى الناتج عن الجذور الحرة وحسب الباحث (21).



شكل 2: يوضح تأثير الزيت احادي الخلية على بعض انزيمات الكلية (Urea و Creatinine).

(Fig. 2) The effect of Single Cell Oil (SCO) on kidney enzymes (creatinine and urea).

- The number of animals is four for each group.

- Different letters indicate the presence of significant differences ($P \geq 0.05$) within the 21-day experimental period.

ثالثاً: تأثير زيت احادي الخلية (SCO) على مرتسم الدهون: بينت النتائج في الشكل 3 عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) في معدل تركيز الكوليسترول الكلي TC والكليسيريدات الثلاثية TG في مصل دم الجرذان التي جرعت بزيت احادي الخلية (SCO) بتركيز 2 مل/كغم، اذ كانت النتائج 72.01 ± 6.38 و 77.98 ± 5.42 للكوليسترول والكليسيريدات الثلاثية وعلى التوالي، بينما سجلت النتائج للمجموعة الثالثة التي جرعت بزيت SCO تركيز 4 مل/كغم انخفاضا معنوياً لكل من الكوليسترول الكلي والكليسيريدات الثلاثية، اذ

سجلت 71.37 ± 7.67 و 75.63 ± 4.76 وعلى التتابع مقارنة بمجموعة السيطرة التي سجلت 87.63 ± 8.92 للكوليسترول و 91.83 ± 5.00 للكليسيريدات الثلاثية.

في حين اظهرت نتائج المجموعة الرابعة والتي جرعت بزيت SCO تركيز 8 مل /كغم ارتفاعا معنويا في تركيز الكوليسترول الكلي والكليسيريدات الثلاثية فكان تركيز الكوليسترول هو 121.0 ± 8.55 بينما كان تركيز الكليسيريدات الثلاثية 109.3 ± 13.11 مقارنة مع مجموعة السيطرة.

يظهر من نتائج دراستنا هذه التأثير السلبي لزيت احادي الخلية على مرتسم الدهون معتمداً في ذلك على الجرعة، إذ كان تركيز كل من الكوليسترول والكليسيريدات الثلاثية في مجموعة الجرذان المعاملة بزيت احادي الخلية في المجموعتين الثانية والثالثة منخفضاً او مقارباً لما اظهرته مجموعة السيطرة التي جرعت بزيت الذرة، بينما في المجموعة الرابعة سجل ارتفاعاً ملحوظاً وقد يعزى السبب في ارتفاع الكوليسترول إلى أن المعاملة بزيت احادي الخلية بالكميات العالية قد يؤثر على تركيبية الطبقة الأحادية المعوية Intestinal monolayer structure ويزيد من امتصاص الكوليسترول عن طريق الأمعاء (22)، او قد يعزى سبب ارتفاع الكوليسترول عند التغذية بجرعات عالية من زيت احادي الخلية الى حدوث خلل في نقل الكوليسترول من والى الكبد مما يؤدي الى اضطراب في عمليات الايض، كما ان ارتفاع مستويات الشحوم الفوسفاتية يكون مرتبطاً بارتفاع مستوى كوليسترول الدم الكلي (26).

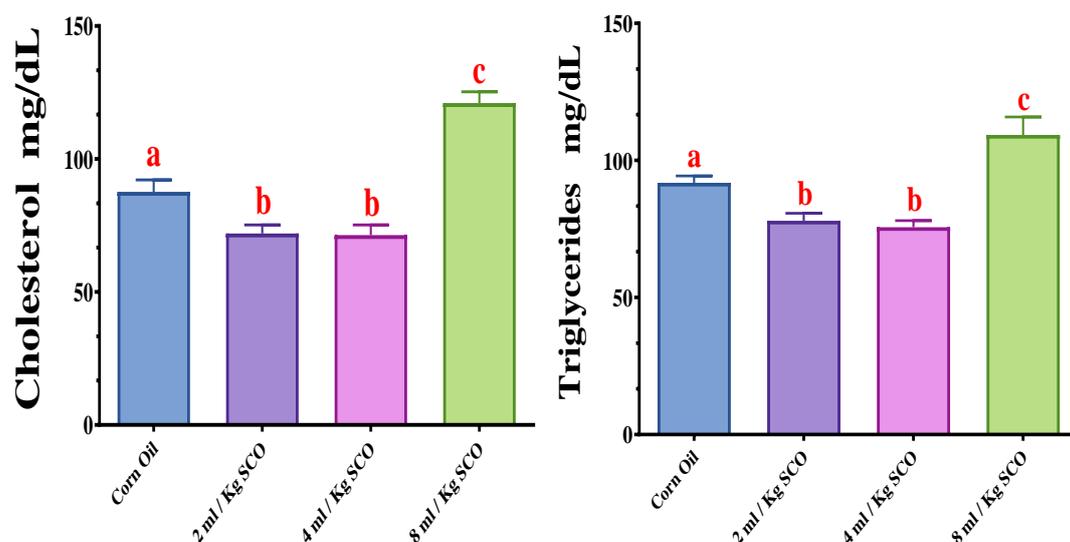
اما الارتفاع في تركيز الكليسيريدات الثلاثية عند الجرعة في الدم عند الجرعة 8 مل /كغم، قد يرجع إلى عدة أسباب منها أن الإجهاد التأكسدي الناتج عن الجرعات العالية لزيت احادي الخلية ممكن ان يؤدي إلى نقص في إفراز الأنسولين بسبب تأثيره وتحطيمه لجزء من خلايا β -Cells البنكرياسية، ونقصان الأنسولين يؤدي إلى انخفاض فعالية إنزيم لايبوبروتين لايباز Lipoprotein lipase المسؤول عن تحليل الكليسيريدات الثلاثية إلى احماض دهنية وكليسرول (65)، كما أن الإصابة بالإجهاد ونتيجة نقصان الأنسولين تتحفز عملية تحلل الدهون في الانسجة الدهنية وتتحلل الاحماض الدهنية الحرة FFA لاستخدامها كمصدر للطاقة وكذلك تشارك في عملية بناء TG فضلا عن أن الكبد يأخذ كميات كبيرة من FFA ليزداد انتاجه لـ VLDL والذي يؤدي إلى ارتفاع تركيز (TG) في مصل الدم (44).

وقد يعزى الانخفاض في تركيز الكوليسترول الكلي والكليسيريدات الثلاثية في المجموعة الثالثة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة الى احتواء زيت احادي الخلية على بعض المكونات الاساسية المهمة وخصوصاً مركب Palmitoleic acid و Oleic acid، فهذه المكونات قد تمنع امتصاص الكوليسترول من قبل جدران الامعاء، إذ أن وجود تراكيز عالية من الأحماض الدهنية الاحادية غير المشبعة (MUFA) تمنع أكسدة LDL-C وتعمل على انخفاض تركيز الكوليسترول في مصل الدم (66).

كما ان الزيت احادي الخلية قد يعمل على تثبيط إنزيم Hydroxy methylglutaryl reductase CoA الكبدي الداخل في تخليق الكوليسترول وبذلك ينخفض تركيز الكوليسترول والمواد الوسطية الداخلة في تخليقه (45)، كما أن مكونات زيت احادي الخلية قد تعمل على تثبيط الامتصاص للكوليسترول من الغذاء في الامعاء وتثبيط إنتاجه في الكبد وتحفيز الإفراز الصفراوي له وطرحه مع الفضلات البرازية إلى خارج الجسم (28).

ان وجود الحامض الدهني لينوليك Linoleic acid يعمل على تحفيز أكسدة الأحماض الدهنية وبالتالي تعزيز معدل التمثيل الغذائي، فضلا عن ذلك وجود هذا الحامض له دور مهم في تحسين عملية التمثيل الحيوي للعناصر الغذائية ولاسيما البروتين، اما الدهون فان للحامض القدرة على استغلالها في تحفيز الطاقة عن طريق تحفيز الكبد على إفراز انزيم اللايباز الهاضم للدهون (64).

يبين الجدول 1 وجود احماض دهنية مشبعة من ضمن مكون الزيت والتي تؤثر سلباً على مستويات شحوم الدم وكذلك ارتفاع قيمة البيروكسيد التي تعكس وجود احماض شحمية متأكسدة ضمن تركيب الزيت فضلاً عن ارتفاع مستوى الكوليسترول الكلي، ان هذه الصفات للزيت يمكن اعتبارها ضارة للجسم عند الجرعات العالية وقد تؤدي او تساعد على التعصد.



شكل 3: يوضح تأثير الزيت احادي الخلية على مرتسم الدهون (Triglycerides و Cholesterol).

Figure 3: The effect of Single Cell Oil (SCO) on lipid profile (cholesterol and triglycerides).

- The number of animals is four for each group.

- Different letters indicate the presence of significant differences ($P \geq 0.05$) within the 21-day experimental period.

رابعا: تأثير زيت احادي الخلية (SCO) على ميزان الاكسدة: أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 4 حصول انخفاضا معنويا عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) في تركيز (MDA) في مصل دم المجموعة الثانية والثالثة للجرذان التي جرعت بـ SCO تركيز 2 و 4 مل/كغم، اذ بلغت قيمتها 0.35 ± 0.04 و 0.24 ± 0.04 وعلى التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة التي بلغت 0.34 ± 0.03 ، وكما بينت النتائج ارتفاع معنوي ($P \leq 0.05$) في مستوى بيروكسيد الدهن MDA في مصل دم الجرذان المجموعة الرابعة والتي جرعت بزيت SCO تركيز 8 مل/كغم فكان التركيز 0.60 ± 0.03 مقارنة بمجموعة السيطرة.

بينما سجلت النتائج ارتفاعا معنويا في مستوى معدل الـ GSH و CAT، اذ بلغت 19.95 ± 1.14 و 2.03 ± 0.18 في مصل جرذان المجموعة الثالثة، اما المجموعة الثانية فكانت النتائج 14.98 ± 1.06 و 1.61 ± 0.16 ، في حين سجلت النتائج انخفاضا معنويا في مستوى معدل الـ GSH و CAT في المجموعة الرابعة التي جرعت بزيت تركيز

8 مل/كغم، اذ بلغت 8.53 ± 0.60 و 1.31 ± 0.08 في مصل الجردان وعلى التوالي مقارنة مع المجموعة السيطرة التي بلغت 12.15 ± 1.33 لا (GSH) و 1.70 ± 0.13 لا CAT.

اوضحت نتائج المعاملة بزيت احادي الخلية بتركيز 2 و 4 مل/كغم وجود انخفاض معنوي في مستوى MDA وارتفاع في تركيز الكلوتاثيون GSH وفعالية CAT مقارنة بالمجموعة السيطرة، وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحثون (43).

أحد التفسيرات المحتملة هو وفرة الأحماض الدهنية الأحادية غير المشبعة، وخاصة حمض الأوليك، الذي له تأثير على خفض تركيز الدهون المشبعة في الجسم، وبالتالي، الإجهاد التأكسدي وبيروكسيد الدهون. ونتيجة لذلك، يتم تقليل البيروكسيد ومشتقاته، بما في ذلك المالونديالدهيد (37).

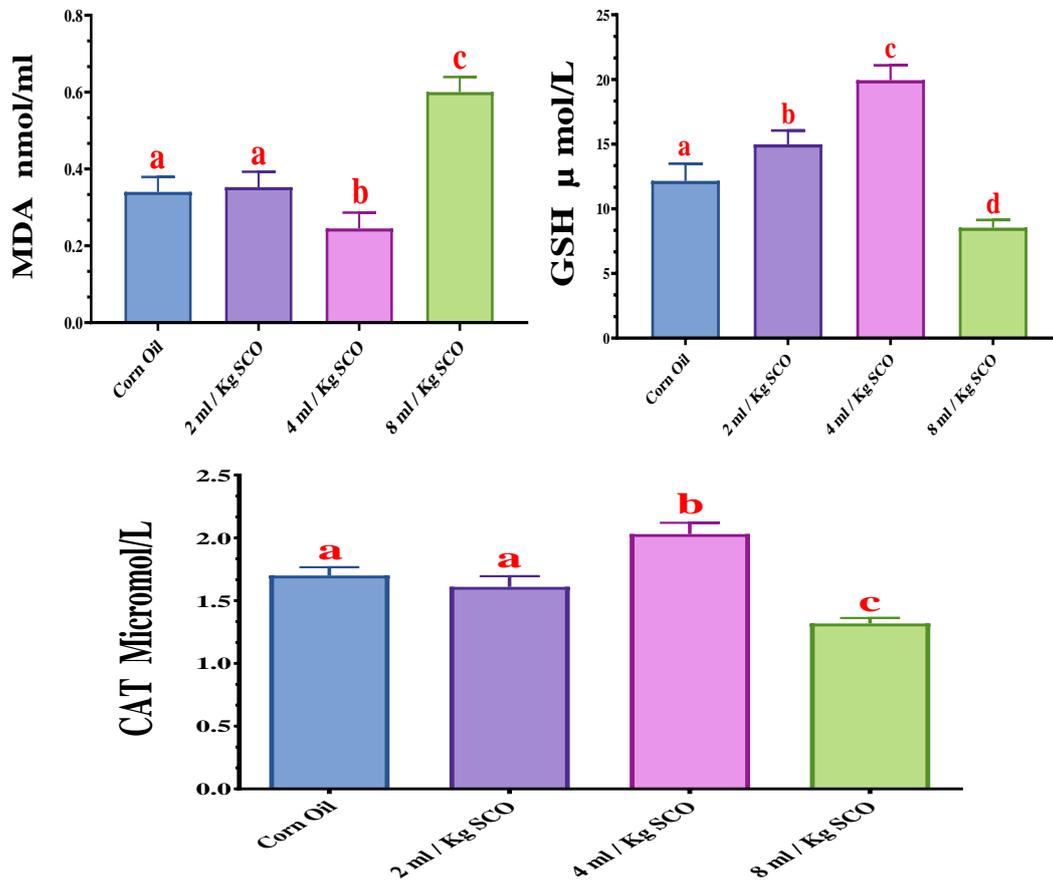
في الجدول 1، الذي تم فصله باستخدام جهاز GC وجهاز HPLC، تؤكد الدراسة الحالية ذلك، تساعد الأحماض الدهنية غير المشبعة، مثل حمض اللينوليك وحمض البالميتوليك، على إزالة الجذور الحرة وتعزيز نشاط إنزيمات الكبد المضادة للأكسدة مثل الكاتالاز وأكسيد ديسموتاز الفائق (SOD). إلى جانب الجلوتاثيون وبيروكسيداز (Gpx)، وهو إنزيم يمكنه منع بيروكسيد الدهون وأضرار الجذور الحرة، فإنه يحمي الخلايا أيضًا من الإجهاد (66).

بسبب إنتاج الجذور الحرة الناجمة عن كميات زائدة من الزيت أحادي الخلية، والتي قد تلحق الضرر بالدهون في الأغشية الخلوية، لوحظ ارتفاع مستوى MDA. نظرًا لوجود روابط مزدوجة، فإن الأحماض الدهنية غير المشبعة الموجودة في الأغشية الخلوية غالبًا ما تكون مستهدفة من خلال عمليات الجذور الحرة (14)، وتنتج الـ MDA من أكسدة هذه الحوامض الدهنية من خلال تفاعلات الجذور الحرة بعملية بيروكسيدها الدهن. فضلًا عن ذلك قد يعود السبب إلى حالة الإجهاد التأكسدي التي تؤثر على خلايا β -Cells البنكرياسية والأنسولين وبالتالي تؤدي إلى انخفاض تركيز الأنسولين في الدم مما يؤدي إلى تحفيز وزيادة فعالية أنزيم Fatty acyl CoA oxidase الذي يحفز عملية (β -oxidation) للأحماض الدهنية وزيادة تكوين H_2O_2 وفي النهاية زيادة معدلات بيروكسيدها الدهن وارتفاع MDA (18).

ربما ساهمت عدة عوامل في انخفاض مستويات مضادات الأكسدة التي لوحظت في هذه الدراسة. وتشمل هذه: زيادة في معدل استهلاك GSH - أحد أهم مضادات الأكسدة غير الأنزيمية في القضاء على الجذور الحرة ومنتجاتها - كان سببها ارتفاع استهلاك الزيت أحادي الخلية. يتم بعد ذلك تحويل GSH من شكله النشط إلى شكله الثنائي غير النشط. الكبريت: هذا هو ثاني كبريتيد الجلوتاثيون. تعتبر مجموعة الكبريت، التي تلعب دورًا في تخليق الجلوتاثيون، عامل اختزال فعال لأن الجذور الحرة لها ارتباط قوي بين الكربون والهيدروجين (C-H) وارتباط ضعيف بين الكبريت والهيدروجين (S-H). يحمي أغشية الخلايا من التأثيرات الضارة للجذور الحرة (40)، يمكن استعادة الشكل غير النشط من الجلوتاثيون من حالته غير النشطة بواسطة الإنزيم المساعد NADPH، والذي يكون ناقصًا في هذه الحالة. يمكن أن يكون نقص هذه العناصر الأساسية أيضًا سببًا لانخفاض مستوى الجلوتاثيون (55).

ويرجع سبب التأثير السمي للجرعات العالية من زيت (SCO) المستعمل في التجربة كونها ادت الى انتاج كميات كبيرة من الجذور الحرة شديدة السمية لخلايا نسيج الكبد، مما يؤدي إلى نشوء مضاعفات خطيرة ومنها تفاعلات استنفاد احتياطي الـ ATP وأكسدة الدهون للأغشية الخلوية وتلفها جزئياً وفقدان مرونتها بعملية تدعى بيروكسدة الدهون Lipid peroxidation، ثم تتخر الخلايا وموتها (41)، وإن الاجهاد التأكسدي الناتج عن زيت (SCO) يحتوي على مواد ربما تصبح سمية عند اخذها بجرع عالية والتي تسبب تولد جذور حرة (ROS) شديدة السمية للخلايا وهذا يسبب استنفاداً في نظام مضادات الاكسدة (33).

إن لحامض لينولنيك الموجود ضمن مكونات زيت احادي الخلية دوراً في حماية الخلية وغشاءها من الجذور الحرة والقضاء عليها وكذلك من تفاعلات الأكسدة في الخلية، وكما يحافظ على سلامة الحامض النووي ويمنع حدوث حالة موت الخلية، إذ يعمل حامض لينولنيك كمضاد اكسدة انزيمي من خلال تحفيز الخلايا على زيادة تكوين الانزيمات (الكوتاثيون بيروكسيديز وانزيم الكاتاليز) اللذين يعملان على المحافظة على الخلايا ومنع تكوين الجذور الحرة والتخلص من بيروكسيد الهيدروجين في الانسجة الحيوانية (19).



شكل 4: يوضح تأثير الزيت احادي الخلية على ميزان الاكسدة (MDA و GSH و CAT).

Figure 4: The effects of Single Cell Oil (SCO) on oxidative stress balance (MDA, GSH, and CAT)
 - The number of animals is four for each group.
 - Different letters indicate the presence of significant differences ($P \geq 0.05$) within the 21-day experimental period.

الفحص النسيجي والخلوي للكبد: يعد الكبد من أكبر الأعضاء المتخصصة لأداء وظائف متنوعة في الجسم ومنها ازالة السموم، مما يجعل منه عرضة للضرر بسبب هذه المواد وما ينتج من أضرارها فيه.

ان التغييرات النسجية كانت مطابقة للتغيرات الكيميوحيوية التي رافقت دراستنا الحالية، اذ أظهرت نتائج الدراسة المجهرية لبعض المقاطع النسجية للأعضاء المدروسة التي أخذت من ذكور الجرذان المختبرية حدوث تشوهات وتغيرات مرضية يمكن توضيحها حسب مجاميع الجرذان المعاملة.

اظهر الفحص المجهرى لنسيج الكبد لمجموعة السيطرة السليمة والمعاملة بزيت الذرة (صورة 1) وجود خلايا كبدية (Hepatocytes) (HC) مضلعة الشكل ذات احجام طبيعية وسائتوبلازم حامضي الصبغة Eosinophilic ونوى الخلايا قاعدية الصبغة كروية الشكل وتمتلك بعض الخلايا نواتين في السائتوبلازم وتترتب صفوف الخلايا بشكل خلايا النحل شعاعيا Radial pattern باتجاه الوريد المركزي (CV) central vein ويلاحظ ايضا وجود الجيبانيات الدموية Sinusoids التي احتوت على كريات الدم الحمراء وفضلا عن ذلك يمكن مشاهدة خلايا كوفر Kupffer cells (KC) بشكل انفرادي واحتوت الباحت البابية على فرع للشريان الكبدي واخر للوريد البابي امتلأت بالدم ومحاطة بالخلايا اللمفية.

وكما اظهرت نتائج الفحوصات النسجية لأكباد الجرذان في المجموعة الثانية والتي جرعت بزيت احادي الخلية (SCO) تركيز 2 مل/كغم (صورة 2) النسق الطبيعي لنسيج الكبد المشابه لمجموعة السيطرة ولم تظهر اي تغييرات نسجية، اذ اظهرت نتائج الفحص النسجي ملاحظة الوريد المركزي (CV) والخلايا الكبدية (HC) مع وجود جيبانيات (S) الحاوية على خلايا كفر (KC)، كذلك اظهرت نتائج الفحص المجهرى لنسيج الكبد في المجموعة الثالثة والتي جرعت بزيت (SCO) تركيز 4 مل/كغم النسق الطبيعي للخلايا الكبدية مع بداية حدوث تغييرات نسجية بسيطة تمثلت بتثخن جدار الوريد المركزي (TW) Thickness wall اضافة الى مع ملاحظة بداية ارتشاح خلوي Infiltration للخلايا اللمفية (LI) Lymphocytes كما في (الصورة 3)، في حين اظهرت المجموعة الرابعة والتي جرعت بزيت (SCO) تركيز 8 مل/كغم تشوهات نسجية تمثلت بوجود تثخن وتمزق في جدار الوريد المركزي مع تكثف في النواة (PN) Pyknotic nucleus، وكما لوحظ في نتائجنا للفحص النسجي ترسب بروتين الأميلويد (AM) Amyloid مع حدوث تصلب للقناة الصفراوية (BD) Bile duct، اذ اظهر وجود مرحلة بداية للتليف (F) Fibrosis حول قناة الصفراء مع وجود حالة ارتشاح خلوي للخلايا اللمفية، وكما اظهرت النتائج النسجية وجود تنخر (N) Necrosis للخلايا مع ملاحظة تنكس (D) Degeneration في بعض الخلايا الكبدية كما في (الصور 4-5-6-7-8-9).

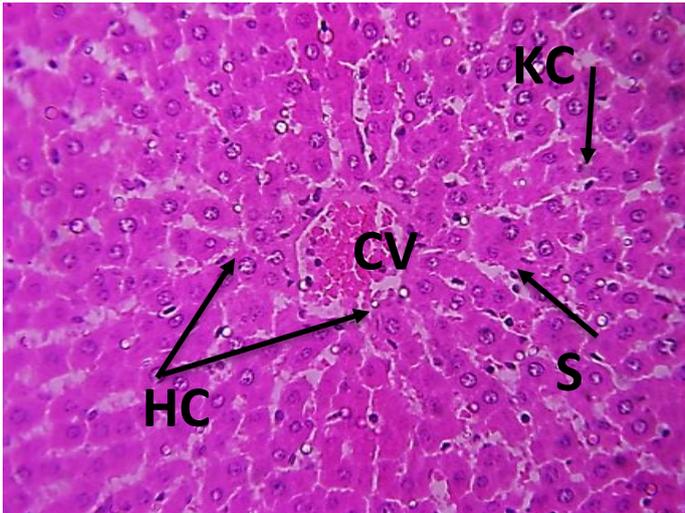
ان ظهور النسق الطبيعي لنسيج الكبد في المجموعة الثانية ربما بسبب امتلاك زيت احادي الخلية على مكونات فسيولوجية مهمة ومنها حوامض دهنية غير مشبعة اسهمت في تعزيز والحفاظ على البناء الطبيعي لمظاهر نسج اكباد هذه الحيوانات مما يؤشر خلوها من التأثيرات السمية وبالتراكم المعاملة ويعزز دورها من خلال امتلاكها لمواد كاسحة للجذور الفعالة وبالتالي مساهمتها في التقليل من بيروكسدة الدهون والحفاظ على حيوية الغشاء الخلوي وتعزيز نشاط مضادات الاكسدة الخلوية (23).

وتبين من نتائج الفحص النسجي وجود ارتشاح للخلايا الالتهابية داخل الجيبانيات في نسيج الكبد الذي يشير الى حصول تغييرات تنكسية في نسيج الكبد أو التي أدت الى افراز عوامل الجذب الكيمياوية لجذب الخلايا الالتهابية لغرض الدفاع عن الجسم، إذ إن الخلايا المتأثرة من فعل التراكيز العالية لزيت احادي الخلية ربما ادى

الى تحفيز عوامل جذب الكيميائي Chemotactic factors لجذب الخلايا المناعية وبالتالي زيادة ارتشاحها في النسيج الكبدي (2).

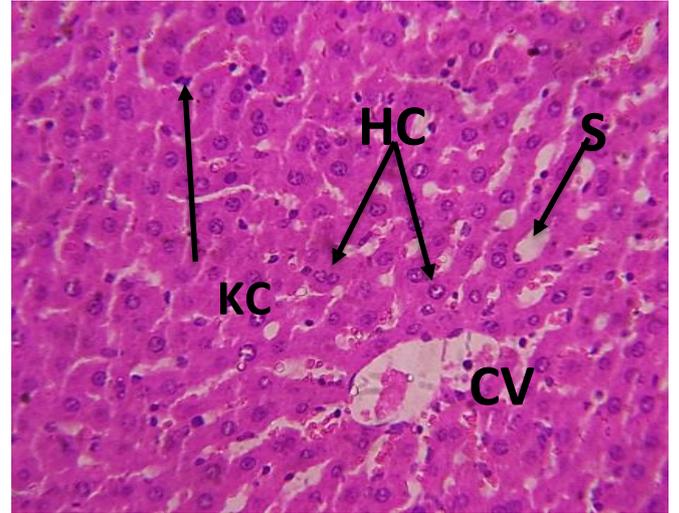
وهنا يجدر الإشارة الى إن نتائج فحص المالوندايالديهيد والكلوتاثيون والتي أشارت الى ارتفاع الـ MDA الذي يعد مؤشرا لبيروكسدة الدهون بسبب تكوين الجذور الحرة مما يجعلنا نستطيع الجزم بأن التأثيرات التأكسدية الناتجة في نسيج الكبد ناجمة عن تكوين الجذور الحرة وارتفاع الـ MDA وانخفاض مستوى الـ GSH، إحدى خصائص هذه الجذور هي قدرتها على التفاعل مع الدهون الفسفورية، مما يؤدي إلى بيروكسيد الدهون. وهذا بدوره يؤدي إلى سلسلة من التفاعلات التي تدمر الأغشية، بما في ذلك غشاء الميتوكوندريا والجسيمات الحالة، مما يؤدي في النهاية إلى نخر الخلية (30).

أثبتت دراسة أن التلف الكبدي يرتبط مع زيادة الـ MDA كعلامة لبيروكسدة الدهن، بينما كان هناك انخفاض في الـ MDA مع زيادة مستوى الـ GSH الكبدي الذي يعد أول مضادات الأكسدة المسؤول عن حماية الخلايا من جهد الأكسدة، إذ ان استنفاد الـ GSH في مايتوكوندريا الخلايا الكبدية نتيجة التعرض لمواد سمية يؤدي الى نشوء حالات مرضية ومنها تلف الأنسجة الكبدية لكون الـ GSH يقلل من التأثيرات السمية من خلال ارتباطه مع معها وتنشيط فعلها السمي (54).



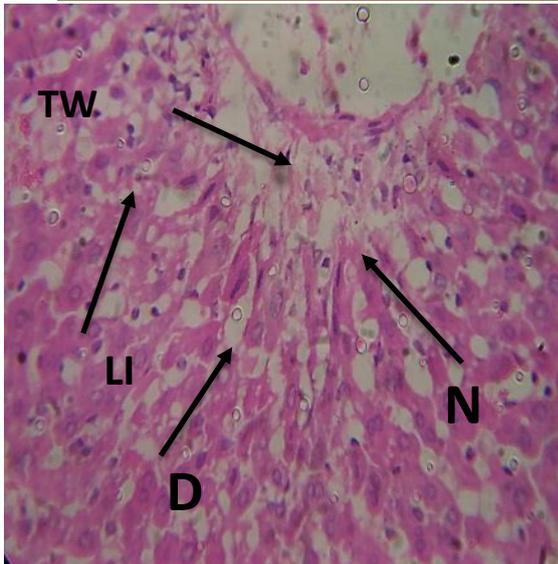
صورة (2): مقطع لكبد المجموعة الثانية يوضح الوريد المركزي (CV)، والخلايا الكبدية (HC) مع وجود جيبانينات (S) الحاوية على خلايا كفر (KC) H&E X400.

Image (2): A section of the liver of the second group showing the central vein (CV), hepatocytes (HC) and sinusoids (S) containing H&E X400 KC cells



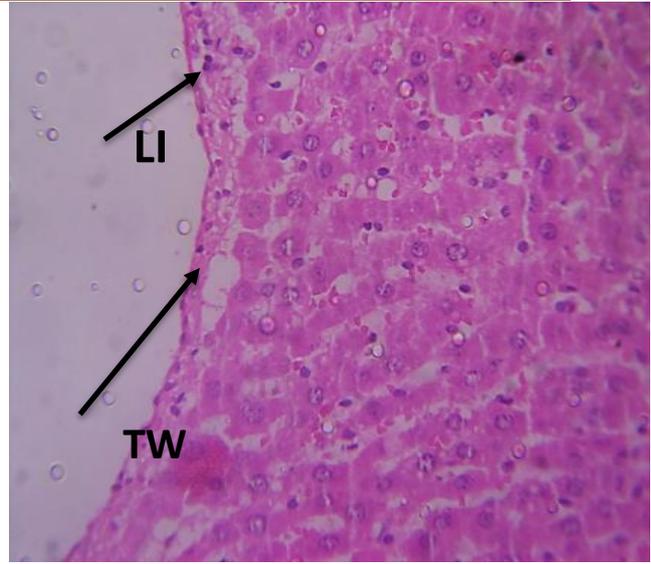
صورة (1): مقطع لكبد مجموعة السيطرة يوضح الشكل الطبيعي للوريد المركزي (CV)، والخلايا الكبدية (HC) مع وجود جيبانينات (S) ذات احجام طبيعية وحاولية على خلايا كفر (KC) H&E X400.

Image (1): A section of the liver of the control group showing the normal shape of the central vein (CV), and hepatocytes (HC) with the presence of sinusoids (S) of normal size and containing KC cells (KC) H&E X400



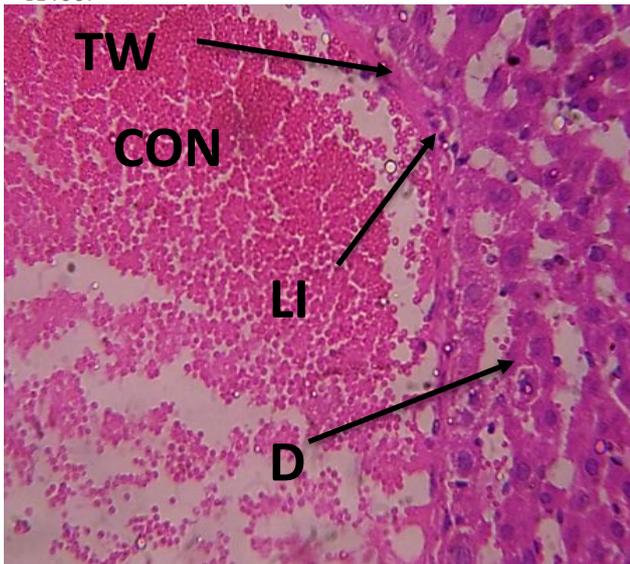
صورة (4): مقطع لكبد المجموعة الرابعة يوضح تثخن جدار الوريد المركزي (TW), وتتكس (D) مع تنخر (N) الخلايا الكبدية مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Picture (4): Section of the liver of the fourth group showing thickening of the wall of the central vein (TW), degeneration (D) with necrosis (N) of hepatocytes with lymphocyte infiltration (LI) H&E X400.



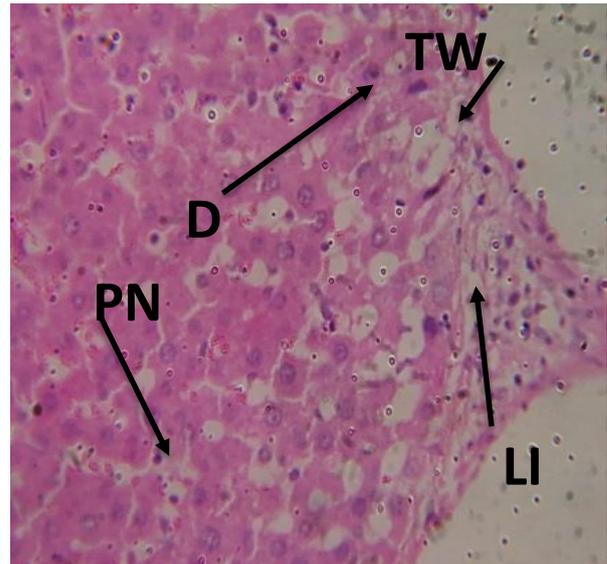
صورة (3): مقطع لكبد المجموعة الثالثة يوضح تثخن جدار الوريد المركزي (TW) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Image (3): Sectional image of the liver of the third group showing thickening of the wall of the central vein (TW) with lymphocytic infiltration (LI) H&E X400.



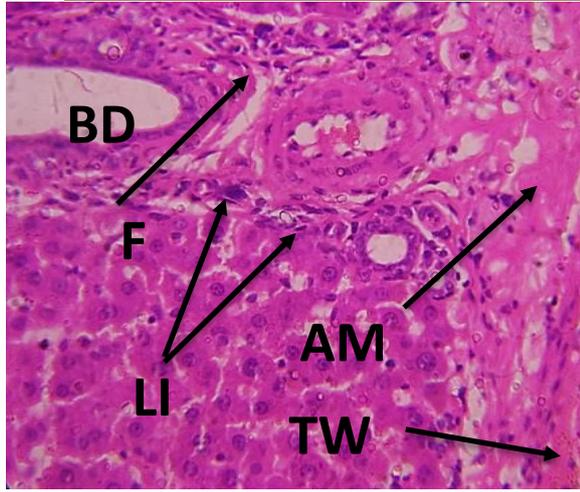
صورة (6): مقطع لكبد المجموعة الرابعة يوضح تثخن جدار الوريد المركزي (TW), و احتقان دموي (CON) و تنكس (D) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

image (6): Section of the liver of the fourth group showing thickening of the wall of the central vein (TW), degeneration (D) and hyperemia (CON) with lymphocytic infiltration (LI) H&E X400.



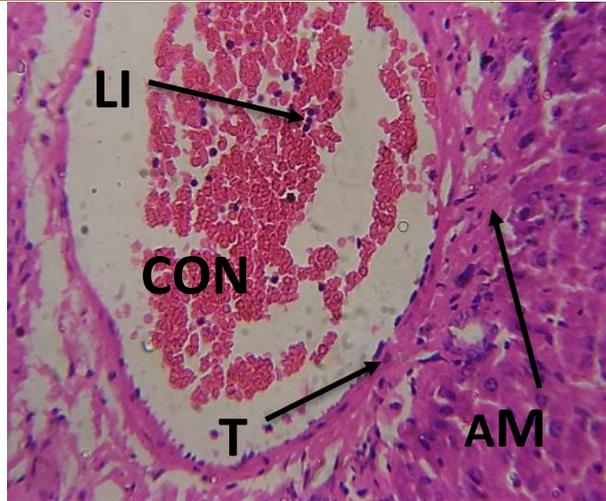
صورة (5): مقطع لكبد المجموعة الرابعة يوضح تثخن جدار الوريد المركزي (TW), وتتكس (D) مع تكثف انوية (PN) بعض الخلايا الكبدية مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Picture (5): A section of the liver of the fourth group showing thickening of the wall of the central vein (TW), degeneration (D) with condensation of the nuclei (PN) of some hepatocytes with lymphocyte infiltration (LI) H&E X400.



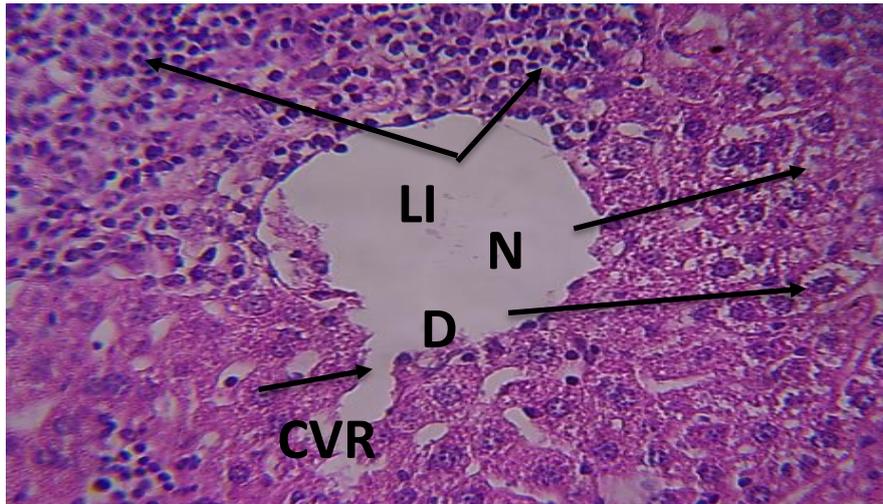
صورة (8): مقطع لكبد المجموعة الرابعة يوضح تتخن جدار الوريد المركزي (TW), وترسب الامايلويد (AM) مع تصلب القناة الصفراوية (BD) والمتمثل بوجود تليف (F) حولها وارتشاح الخلايا اللمفية (LI). H&E X400

Image (8): A section of the liver of the fourth group showing thickening of the wall of the central vein (TW), amyloid deposition (AM), with hardening of the bile duct (BD), represented by the presence of fibrosis (F) around it, and infiltration of lymphocytes (LI). H&E X400



صورة (7): مقطع لكبد المجموعة الرابعة يوضح تتخن جدار الوريد المركزي (TW), واحتقان دموي (CON) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) وترسب الامايلويد (AM). H&E X400

Image (7): Section of the liver of the fourth group showing thickening of the wall of the central vein (TW), blood congestion (CON) with lymphocytic infiltration (LI) and amyloid deposition (AM). H&E X400



صورة (9): مقطع لكبد المجموعة الرابعة يوضح تمزق جدار الوريد المركزي (CVR), وتتكس (D) مع تنخر (N) الخلايا الكبدية وارتشاح الخلايا اللمفية (LI). H&E X400

Image (9): A section of the liver of the fourth group showing rupture of the wall of the central vein (CVR), degeneration (D) with necrosis (N) of hepatocytes and lymphocytic infiltration (LI). H&E X400

الفحص النسيجي والخلوي للكلية: في المجموعة الضابطة، كشف الفحص النسيجي للكلية عن الكبيبات الكلوية داخل القشرة الكلوية. وشملت هذه الكبيبات الكبيبة المفصصة جزئياً (G)، والتي كانت محاطة بمساحة المحفظة ومحفظة بومان (BC)، والتي كانت مبطنة بخلايا حرشفية بسيطة. ظهرت شبكة من الأنابيب المتوتية (CT) التي تبطن الكبيبات القريبة. في (الشكل 10)، لدينا خلايا هرمية تبطن لمعة أنبوبية صغيرة، بينما في (الشكل 11)،

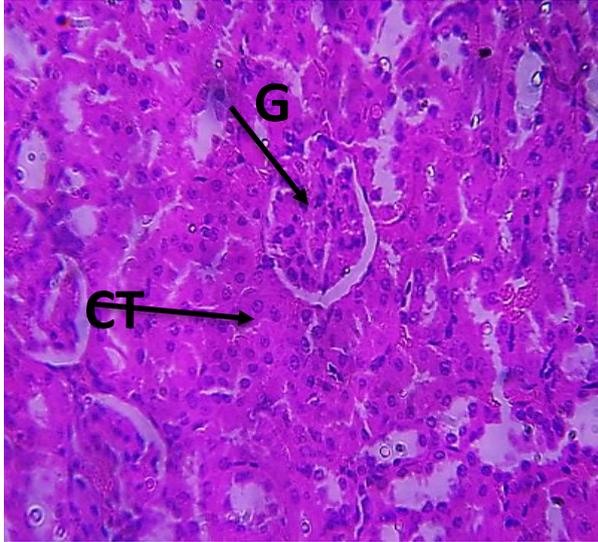
نرى الأنابيب الملتفة البعيدة تصطف على جانبيها خلايا مكعبة بسيطة ذات تجويف كبير. توضح هذه النتائج دور الكلى في التحكم في توازن السوائل والتخلص من المنتجات الثانوية الأيضية مثل اليوريا والكرياتين.

في الشكل 11، كشف التحليل النسيجي للمجموعة الثانية المُجرعة بـ 2 مل/كجم من زيت الخلية الواحدة (SCO) عن الأنابيب الملتفة (CT) على المستويين القريب والبعيد، بالإضافة إلى الكبيبات الكلوية المفصصة جزئياً (G) المحاطة بمساحة المحفظة. وكبسولة بومان. عادة، بما يتماشى مع ما أشارت إليه النتائج النسيجية للمجموعة الضابطة، بينما أظهرت نتائج الفحص المجهرى لنسيج الكلى في المجموعة الثالثة (تركيز 4 مل/كغم) (صورة 12) ظهور النسق الطبيعي المشابه لمجموعة السيطرة مع ظهور تغيرات نسجية بسيطة تمثلت بوجود تنكس Degeneration (D) في بعض خلايا النبيبات البولية فضلا عن ظهور احتقان دموي Congestion (CON) في بعض خلايا النبيب البولي، بينما أظهرت نتائج الفحص النسيجي للمجموعة الرابعة (تركيز 8 مل/كغم) ظهور تغيرات نسجية شديدة تمثلت بتحطم الكبيبات (DG) Damage of Glomerulus مع انسلاخ في بطانة بعض النبيبات البولية (DE) Desquamation، فضلا عن ملاحظة نزف دموي (H) Hemorrhage وارتشاح للخلايا اللمفية (LI) وتكس (D) في بعض خلايا النبيبات، وكما أظهرت التغيرات حدوث تنخن في جدار الأوعية الدموية (TW) Thickness Wall كما في (الصور 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19).

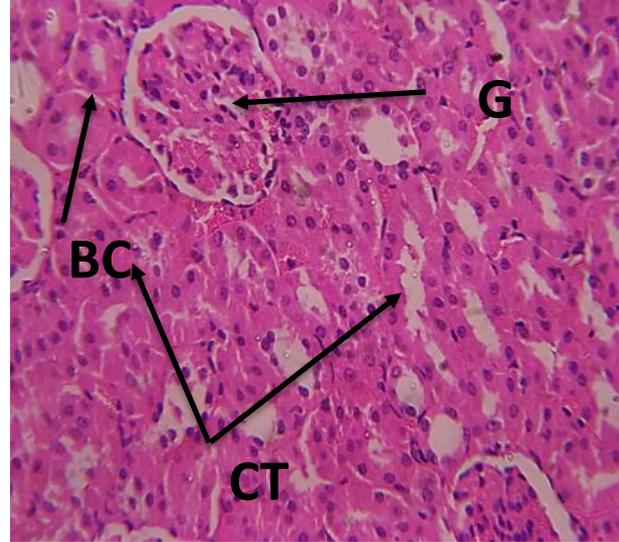
من الممكن أن يكون تكوين أنسجة الكلى الصحي بشكل عام للمجموعة الثانية يرجع إلى وجود الأحماض الدهنية الأحادية غير المشبعة (MUFA)، والتي تساعد على خفض أكسدة LDL ومنع بيروكسيد الدهون على أغشية الخلايا (7 و 25)، بينما في المجموعة الثالثة كانت هناك تغيرات بسيطة في التركيب النسيجي وهذا ربما يعود إلى وجود بعض المركبات ضمن زيت احادي الخلية له تأثيرات سلبية تجاه الانسجة او ربما كان التركيز الذي اعطي للجردان يحتوي على نسبة عالية من هذه المركبات ولا سيما الاحماض الدهنية المشبعة (33 و 59). أما أسباب نخر النبيبات ربما هو أن مناطق التخرن تكون مواد أو مجموعة من المركبات لها الفه خاصه نحو الكالسيوم واقترح بأن حامض الفوسفوريك والحوامض الدهنية لها دور في ذلك، إذ إن اغلب الكالسيوم المتكلس في خلايا الكلية وجد بشكل فوسفات الكالسيوم (36)، يمكن أن يحدث النخر أيضًا بسبب التسمم وموت الخلايا في الأنابيب بسبب المستويات العالية من الزيت أحادي الخلية. وهذا يعني أن الخلايا الموجودة في النبيب لا تحصل على كمية كافية من الأكسجين لأن كفاءتها الأيضية تعتمد على الأكسجين الذي تحمله الأوعية الدموية إليها. إن تلف الأوعية الدموية، كما هو الحال في ورم الكلى أو تضيق الشريان الكلوي، يعني أن الخلايا الموجودة في الكلى لن تحصل على ما يكفي من الأكسجين (50).

وان حدوث النزف الحاد والاحتقان في أنسجة الكلى للجردان المعاملة بزيت احادي الخلية ربما ادى إلى التحطم المباشر للظهارية المبطننة للأوعية الدموية (61)، اذ اثبتت نتائج دراستنا الحالية ان ارتفاع اليوريا والكرياتين يقلل معدل الترشيح الكبيبي ويزيد من بيروكسيده الدهن ومنه الـ MDA وانخفاض مستوى مضادات الاكسدة ولا سيما الكلوتاثايون المختزل بسبب الإنتاج المفرط للجذور الحرة الناتجة ربما من التراكم العالية لزيت احادي الخلية، كل هذه المتغيرات تؤدي الى حدوث تغيرات نسجية تنكسية وضرر تأكسدي لأنسجة الكلى وقد تؤدي الى الفشل الكلوي الحاد (46).

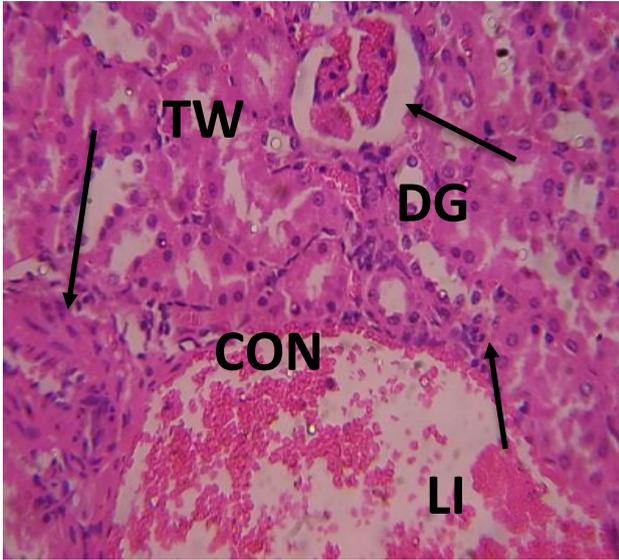
نستنتج من هذه الدراسة أن زيت الخلية الواحدة (SCO) الذي أنتجناه من بكتيريا *Bacillus subtilis* له تأثيرات سلبية للغاية على المستويين النسيجي والوظيفي لحيوانات التجربة عند استخدامه بتركيز عالية.



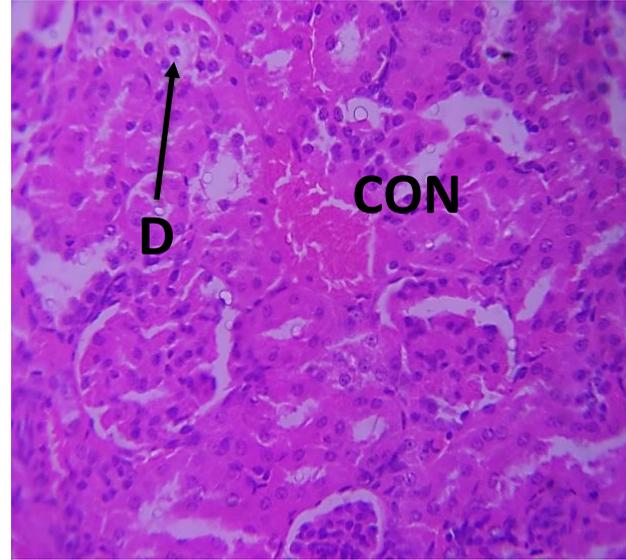
صورة (11): مقطع مستعرض لكلى المجموعة الثانية يوضح الكبيبات (G) والنيبيات البولية (CT), H&E X400.
Image (11): A cross section of the kidneys of the second group showing the glomeruli (G) and the urinary tubules (CT), H&E X400.



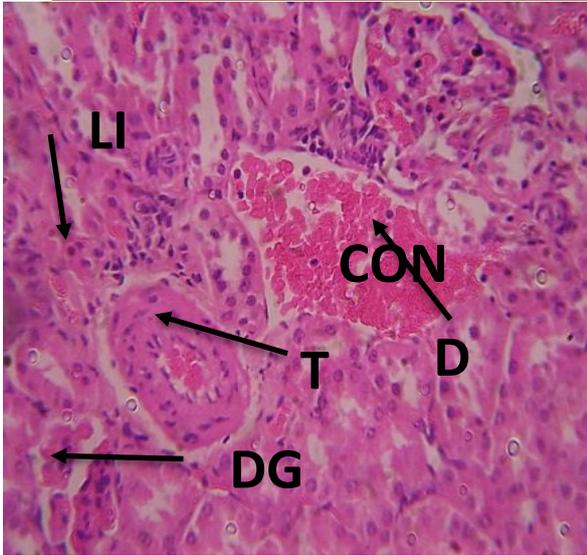
صورة (10): مقطع مستعرض لكلى مجموعة السيطرة يوضح الشكل الطبيعي الكبيبات (G) محاطة بمحفظة بومان (BC) والنيبيات البولية (CT), H&E X400.
Image (10): A cross-sectional view of the kidneys of a control group showing the normal shape of glomeruli (G) surrounded by Bowman's capsule (BC) and urinary tubules (CT), H&E X400



صورة 13 مقطع مستعرض لكلى مجموعة الرابعة يوضح تحطم الكبيبات (DG) وتثخن جدار الأوعية الدموية (TW), واحتقان دموي (CON) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.
Image (13) Cross-sectional view of group 4 kidneys showing breakdown of glomeruli (DG), thickening of the vascular wall (TW), and hyperemia (CON) with lymphocytic infiltration (LI) H&E X400.

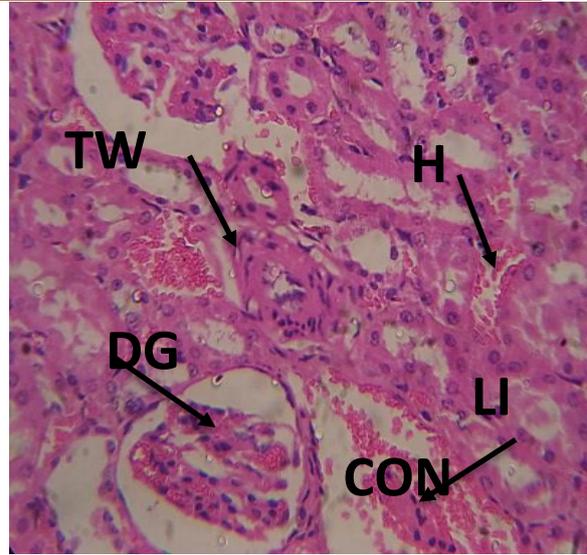


صورة (12) مقطع مستعرض لكلى مجموعة الثالثة يوضح تنكس (D) بعض خلايا النبيبات البولية واحتقان دموي (CON) H&E X400.
Image (12) Cross-sectional a view of the kidneys of the third group, showing degeneration (D) of some cells of the urinary tubules and blood congestion (CON) H&E X400



صورة (15) مقطع مستعرض لكلى مجموعة الرابعة يوضح تحطم الكبيبات (DG) مع تنكس (D) خلايا النبيبات البولية وتثخن جدار الاوعية الدموية (TW), واحتقان دموي (CON) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Image (15) cross-sectional view of the kidneys of the fourth group showing the destruction of glomeruli (DG) with degeneration (D) of the cells of the urinary tubules, thickening of the vascular wall (TW), and blood congestion (CON) with infiltration of lymphocytes (LI) H&E X400.



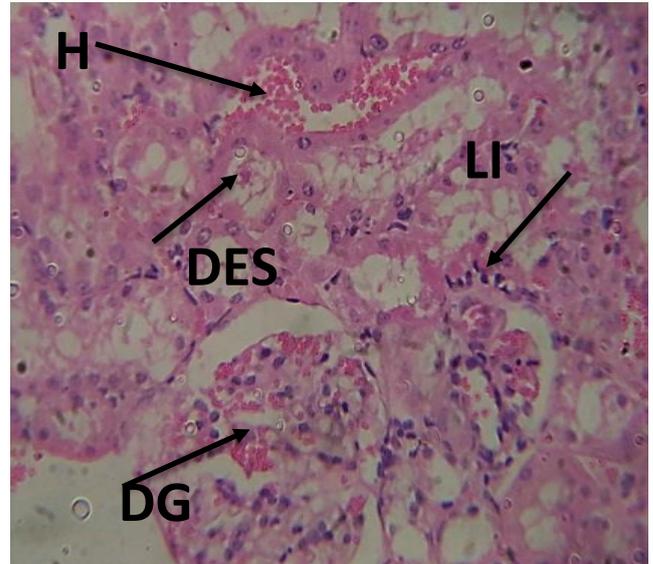
صورة (14) مقطع مستعرض لكلى مجموعة الرابعة يوضح تحطم الكبيبات (DG) وتثخن جدار الاوعية الدموية (TW), وتنكس (D) مع نزف دموي (H) واحتقان دموي (CON) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Image (14) A cross-section of the kidneys of the fourth group showing the breakdown of glomeruli (DG), thickening of the vascular wall (TW), degeneration (D) with hemorrhage (H) and congestion (CON) with lymphocyte infiltration (LI) H&E X400.



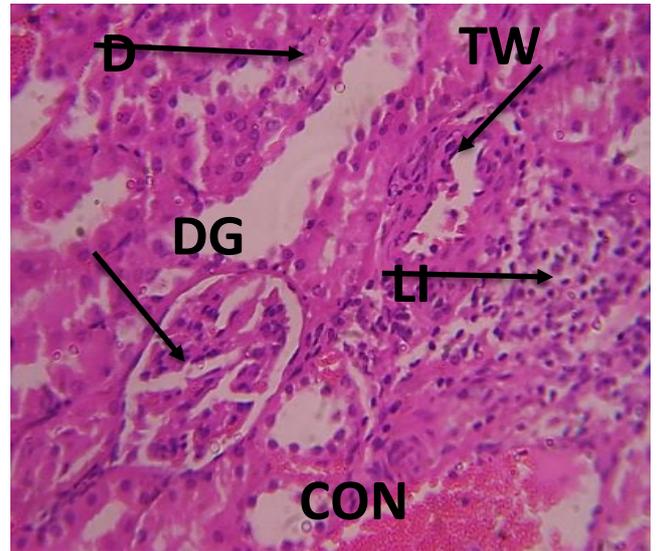
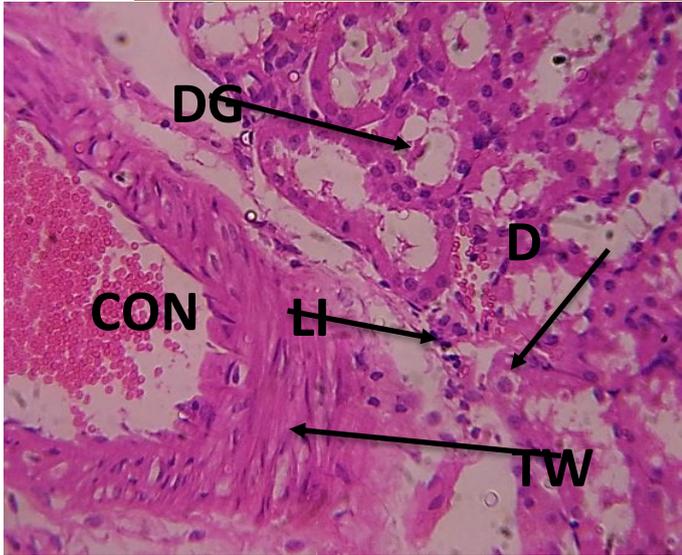
صورة (17) مقطع مستعرض لكلى مجموعة الرابعة يوضح تحطم الكبيبات (DG) مع نزيف دموي (H) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Image (17) a cross-sectional view of the kidneys of the fourth group showing the destruction of glomeruli (DG) with hemorrhage (H) with lymphocytic infiltration (LI) H&E X400.



صورة (16) مقطع مستعرض لكلى مجموعة الرابعة يوضح تحطم الكبيبات (DG) مع انسلاخ بطانة النبيبات البولية ونزيف دموي (H) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Image (16) a cross section of the kidneys of the fourth group showing the destruction of the glomeruli (DG) with desquamation (DES) of the urinary tubules and hemorrhage (H) with lymphocytic infiltration (LI) H&E X400.



صورة (19): مقطع مستعرض لكلي مجموعة الرابعة يوضح تحطم الكبيبات (DG) مع تنكس (D) خلايا النبيبات البولية وتثخن جدار الاوعية الدموية (TW), واحتقان دموي (CON) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Image (19): A cross-sectional view of the kidneys of the fourth group showing the destruction of glomeruli (DG) with degeneration (D) of the cells of the urinary tubules, thickening of the vascular wall (TW), and congestion (CON) with lymphocyte infiltration (LI) H&E X400.

صورة (18) مقطع مستعرض لكلي مجموعة الرابعة يوضح تحطم الكبيبات (DG) مع تنكس (D) خلايا النبيبات البولية وتثخن جدار الاوعية الدموية (TW), واحتقان دموي (CON) مع ارتشاح الخلايا اللمفية (LI) H&E X400.

Image (18) a cross section of the kidneys of the fourth group showing the destruction of the glomeruli (DG) with degeneration (D) of the cells of the urinary tubules, thickening of the vascular wall (TW), and blood congestion (CON) with lymphocyte infiltration (LI) H&E X400.

الاستنتاجات

نستنتج من هذه الدراسة أن زيت احادي الخلية (SCO) المنتج من بكتيريا *Bacillus subtilis* له تأثيرات سلبية على المستويين النسيجي والوظيفي في ذكور الجرذان المختبرية عند استخدامه بتركيز عالية.

Supplementary Materials:

No Supplementary Materials.

Author Contributions:

Wassan D. M. Al-Obeidi; methodology, writing—original draft preparation, L. H. Ali and Dh. F. Al-Rawi writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding:

This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement:

Non.

Informed Consent Statement:

No Informed Consent Statement.

Data Availability Statement:

No Data Availability Statement.

Conflicts of Interest:

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments:

We would like to express our deep gratitude and appreciation to the research funded by Anbar University, College of Education for Pure Sciences, Department of Life Sciences for their significant support and provision of resources necessary for the completion of this research. Their valuable contributions were essential in achieving the objectives of this study.

Disclaimer/Journal's Note:

The statements, opinions, and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of AJAS and/or the editor(s). AJAS and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions, or products referred to in the content.

المصادر

1. Abdalla, O. A., Gadalla, H. A., and Abd-Elhamid, G. M. (2019). Selective Hematological, Serum Biochemical, Oxidant and Antioxidant Profile in Chronic Toxicity of Albino Rats with Lead Acetate and treated with α -Linolenic Acid. Alexandria Journal for Veterinary Sciences, 63(1): 18-25. DOI: 10.5455/ajvs.45504.
2. Aboonabi, A., Rahmat, A., and Othman, F. (2014). Effect of pomegranate on histopathology of liver and kidney on generated oxidative stress diabetic induced rats. J Cytol Histol, 6(1): 2-5. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7099.1000294>.
3. Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. In Methods in enzymology, 105: 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
4. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S., Richmond, W. F. P. C., and Fu, P. C. (1974). Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clinical chemistry, 20(4): 470-475. <https://doi.org/10.1093/clinchem/20.4.470>.
5. Al-Obeidi, W. D. M., Al-Rawi, D. F., and Ali, L. H. (2023). Production of Single-Cell Oil from a Local Isolate Bacillus subtilis Using Palm Fronds. International Journal of Biomaterials, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/8882842>.
6. Alvarez, H., and Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. Applied microbiology and biotechnology, 60: 367-376. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1135-0>.
7. Armenta, R. E., and Valentine, M. C. (2013). Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. Journal of the American Oil Chemists' Society, 90(2): 167-182. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2154-3>.
8. Bajwa, K., Bishnoi, N., Toor, M., Gupta, S., Sharma, P., Kirrolia, A., ... and Selvan, S. (2018). Isolation, screening, characterization of indigenous oleaginous bacteria: evaluation of various carbon and nitrogen sources as substrates for single celled oil producing bacteria. Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology, 3(1): 1-12. <https://doi.org/10.9734/AJB2T/2018/39260>.
9. Bancroft, J. D., and Stevens, A. (1990). Theory and practice of histological techniques.
10. Basuny, A. M., and Fatemah, A. H. (2022). Production of single cell oil from algae. Eurasian Journal of Medical and Health Sciences, 1(1): 33-38.
11. Burgstaller, L., Oliver, L., Dietrich, T., and Neureiter, M. (2023). Pilot scale production of single cell oil by Apiotrichum brassicae and Pichia kudriavzevii

- from acetic acid and propionic acid. *Applied Sciences*, 13(8): 4674. <https://doi.org/10.3390/app13084674>.
12. Chalima, A., Taxeidis, G., and Topakas, E. (2020). Optimization of the production of docosahexaenoic fatty acid by the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* utilizing a dark fermentation effluent. *Renewable energy*, 152: 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.041>.
 13. Chaney, A. L., and Marbach, E. P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry*, 8(2): 130-132. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>.
 14. Di Meo, S., and Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>.
 15. Diwan, B., and Gupta, P. (2018). Broth recycling in high carbon demanding single cell oil fermentation increased the product to effluent generation ratio. *Process biochemistry*, 75: 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.008>.
 16. Domínguez, R., Pateiro, M., Purriños, L., Munekata, P. E. S., Echegaray, N., and Lorenzo, J. M. (2022). Introduction and classification of lipids. In *Food Lipids*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823371-9.00018-6>.
 17. Egert, S., Lindenmeier, M., Harnack, K., Krome, K., Erbersdobler, H. F., Wahrburg, U., and Somoza, V. (2012). Margarines fortified with α -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, or docosahexaenoic acid alter the fatty acid composition of erythrocytes but do not affect the antioxidant status of healthy adults. *The Journal of nutrition*, 142(9): 1638-1644. <https://doi.org/10.3945/jn.112.161802>.
 18. Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., and Ichii, H. (2021). The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes. *International journal of molecular sciences*, 22(4): 1509. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>.
 19. Fortin, É., Blouin, R., Lapointe, J., Petit, H. V., and Palin, M. F. (2017). Linoleic acid, α -linolenic acid and enterolactone affect lipid oxidation and expression of lipid metabolism and antioxidant-related genes in hepatic tissue of dairy cows. *British journal of nutrition*, 117(9): 1199-1211. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000976>.
 20. Fossati, P., and Prencipe, L. (1982). The determination of triglyceride using enzymatic methods. *Clin. Chem*, 28: 2077-2080.
 21. Galmessa, U., Kimoth, S. P., Mohammed, S., and Dang, A. K. (2017). Changes occurring in some biochemical markers of fat supplemented dairy cows during transition period under tropical conditions. *Journal of Science and Sustainable Development*, 5(2): 1-17. <https://doi.org/10.20372/au.jssd.5.2.2017.070>.
 22. Gao, X., Chang, S., Liu, S., Peng, L., Xie, J., Dong, W., ... and Sheng, J. (2020). Correlations between α -linolenic acid-improved multitissue homeostasis and gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *Msystems*, 5(6): 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msystems.00391-20>.
 23. Gavahian, M., Khaneghah, A. M., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Garcia-Mantrana, I., Collado, M. C., ... and Barba, F. J. (2019). Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and

- prevention of noncommunicable diseases. Trends in food science and technology, 88: 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.008>.
24. Ghazani, S. M., and Marangoni, A. G. (2022). Microbial lipids for foods. Trends in Food Science and Technology, 119: 593-607. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.014>.
 25. Ghnimi, S., Budilarto, E., and Kamal-Eldin, A. (2017). The new paradigm for lipid oxidation and insights to microencapsulation of omega-3 fatty acids. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16(6): 1206-1218. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12300>.
 26. Gonçalves, N. B., Bannitz, R. F., Silva, B. R., Becari, D. D., Poloni, C., Gomes, P. M., ... and Foss-Freitas, M. C. (2018). α -Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet. Clinics, 73.
 27. Gorte, O., Hollenbach, R., Papachristou, I., Steinweg, C., Silve, A., Frey, W., ... and Ochsenreither, K. (2020). Evaluation of downstream processing, extraction, and quantification strategies for single cell oil produced by the oleaginous yeasts *Saitozyma podzolica* DSM 27192 and *Apiotrichum porosum* DSM 27194. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8: 355. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00355>.
 28. Granado-Casas, M., and Mauricio, D. (2019). Oleic acid in the diet and what it does: Implications for diabetes and its complications. In Bioactive food as dietary interventions for diabetes, 211-229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813822-9.00014-X>.
 29. Helvacı, M. R., Abyad, A., and Pocock, L. (2020). The safest upper limit of triglycerides in the plasma. Middle East Journal of Family Medicine, 7(10): 16.
 30. Heshmati, J., Morvaridzadeh, M., Maroufizadeh, S., Akbari, A., Yavari, M., Amirinejad, A., ... and Sepidarkish, M. (2019). Omega-3 fatty acids supplementation and oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. Pharmacological research, 149, 104462. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104462>.
 31. Jones, A. D., Boundy-Mills, K. L., Barla, G. F., Kumar, S., Ubanwa, B., and Balan, V. (2019). Microbial lipid alternatives to plant lipids. Microbial lipid production: methods and protocols, 1-32. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9484-7_1.
 32. Kei, S. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clinica chimica acta, 90(1): 37-43. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(78\)90081-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(78)90081-5).
 33. Lagus, T. P., and Edd, J. F. (2013). A review of the theory, methods and recent applications of high-throughput single-cell droplet microfluidics. Journal of Physics D: Applied Physics, 46(11): 114005. DOI 10.1088/0022-3727/46/11/114005.
 34. Lee, S. A., Whenham, N., and Bedford, M. R. (2019). Review on docosahexaenoic acid in poultry and swine nutrition: Consequence of enriched animal products on performance and health characteristics. Animal Nutrition, 5(1): 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.09.001>.
 35. Li, X., Lin, Y., Chang, M., Jin, Q., and Wang, X. (2015). Efficient production of arachidonic acid by *Mortierella alpina* through integrating fed-batch culture with

- a two-stage pH control strategy. *Bioresource Technology*, 181: 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.009>.
36. Liang, F., and Yan, B. (2020). Oxidative damage in the liver and kidney induced by dermal exposure to diisononyl phthalate in Balb/c mice. *Toxicology and Industrial Health*, 36(1): 30-40. <https://doi.org/10.1177/0748233719900861>.
 37. Maghsoud-Nia, L., Asle-Rousta, M., Rahnama, M., and Amini, R. (2021). Sesame oil and its component oleic acid ameliorate behavioral and biochemical alterations in socially isolated rats. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 45: 1155-1163. <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01098-0>.
 38. Manuel, C. R., Charron, M. J., Ashby Jr, C. R., and Reznik, S. E. (2018). Saturated and unsaturated fatty acids differentially regulate in vitro and ex vivo placental antioxidant capacity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(3): e12868. <https://doi.org/10.1111/aji.12868>.
 39. Miranda, C., Bettencourt, S., Pozdniakova, T., Pereira, J., Sampaio, P., Franco-Duarte, R., and Pais, C. (2020). Modified high-throughput Nile red fluorescence assay for the rapid screening of oleaginous yeasts using acetic acid as carbon source. *BMC microbiology*, 20: 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01742-6>.
 40. Nakamura, H., Tsujiguchi, H., Kambayashi, Y., Hara, A., Miyagi, S., Yamada, Y., ... and Nakamura, H. (2019). Relationship between saturated fatty acid intake and hypertension and oxidative stress. *Nutrition*, 61: 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.10.020>.
 41. Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., and Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, 7: 209534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01539>.
 42. Osman, M. E., Abdel-Razik, A. B., Zaki, K. I., Mamdouh, N., and El-Sayed, H. (2022). Isolation, molecular identification of lipid-producing *Rhodotorula diobovata*: optimization of lipid accumulation for biodiesel production. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1): 32. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00304-9>.
 43. Palomino, O. M., Giordani, V., Chowen, J., Fernández-Alfonso, M. S., and Goya, L. (2022). Physiological doses of oleic and palmitic acids protect human endothelial cells from oxidative stress. *Molecules*, 27(16): 5217. <https://doi.org/10.3390/molecules27165217>.
 44. Panth, N., Abbott, K. A., Dias, C. B., Wynne, K., and Garg, M. L. (2018). Differential effects of medium-and long-chain saturated fatty acids on blood lipid profile: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 108(4): 675-687. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy167>.
 45. Pastor, R., Bouzas, C., and Tur, J. A. (2021). Beneficial effects of dietary supplementation with olive oil, oleic acid, or hydroxytyrosol in metabolic syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Free Radical Biology and Medicine*, 172: 372-385. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.017>.
 46. Rašić, D., Micek, V., Klarić, M. S., and Peraica, M. (2019). Oxidative stress as a mechanism of combined OTA and CTN toxicity in rat plasma, liver and kidney.

- Human and experimental toxicology, 38(4): 434-445. <https://doi.org/10.1177/0960327118819049>.
47. Reitman, S., and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. American journal of clinical pathology, 28(1): 56-63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>.
48. Ren, X., Liu, Y., Fan, C., Hong, H., Wu, W., Zhang, W., and Wang, Y. (2022). Production, processing, and protection of microalgal n-3 pufa-rich oil. Foods, 11(9): 1215. <https://doi.org/10.3390/foods11091215>.
49. Ruan, X., Sun, Y., Du, W., Tang, Y., Liu, Q., Zhang, Z., ... and Tsang, D. C. (2019). Formation, characteristics, and applications of environmentally persistent free radicals in biochars: a review. Bioresource technology, 281: 457-468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.105>.
50. Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T., and Samini, F. (2017). Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. Biomedicine and Pharmacotherapy, 87: 223-229. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.105>.
51. Searcy, R. L., Wilding, P., and Berk, J. E. (1967). An appraisal of methods for serum amylase determination. Clinica Chimica Acta, 15(2): 189-197. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(67)90053-8).
52. Sedlak, J., and Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Analytical biochemistry, 25: 192-205.
53. Suanarunsawat, T., Anantasomboon, G., and Piewbang, C. (2016). Anti-diabetic and anti-oxidative activity of fixed oil extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in diabetic rats. Experimental and therapeutic medicine, 11(3): 832-840. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.2991>.
54. Tamer, F., Ulug, E., Akyol, A., and Nergiz-Unal, R. (2020). The potential efficacy of dietary fatty acids and fructose induced inflammation and oxidative stress on the insulin signaling and fat accumulation in mice. Food and chemical toxicology, 135: 110914. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110914>.
55. Tan, B. L., and Norhaizan, M. E. (2019). Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. Nutrients, 11(11): 2579. <https://doi.org/10.3390/nu11112579>.
56. Tietz, N. W. (1995). Clinical guide to laboratory tests. In Clinical guide to laboratory tests, pp. 1096-1096.
57. Umesh, S. S., and Naidu, K. A. (2012). Vegetable oil blends with α -linolenic acid rich Garden cress oil modulate lipid metabolism in experimental rats. Food Chemistry, 135(4): 2845-2851. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.118>.
58. Vicente, G., Bautista, L. F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F. J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R. M., ... and Garre, V. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. Biochemical Engineering Journal, 48(1): 22-27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.014>.
59. Vodošek Hojs, N., Bevc, S., Ekart, R., and Hojs, R. (2020). Oxidative stress markers in chronic kidney disease with emphasis on diabetic nephropathy. Antioxidants, 9(10): 925 <https://doi.org/10.3390/antiox9100925>.

60. Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J., and Cotter, P. D. (2016). Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *Msystems*, 1(5): 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msystems.00052-16>.
61. Wang, J., Zhang, H. J., Xu, L., Long, C., Samuel, K. G., Yue, H. Y., ... and Qi, G. H. (2016). Dietary supplementation of pyrroloquinoline quinone disodium protects against oxidative stress and liver damage in laying hens fed an oxidized sunflower oil-added diet. *Animal*, 10(7): 1129-1136. <https://doi.org/10.1017/S175173111600001X>.
62. Yamagata, K. (2023). Docosahexaenoic acid inhibits ischemic stroke to reduce vascular dementia and Alzheimer's disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 106733. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2023.106733>.
63. Yu, L., Yuan, M., and Wang, L. (2017). The effect of omega-3 unsaturated fatty acids on non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Pakistan journal of medical sciences*, 33(4): 1022. <https://doi.org/10.12669%2Fpjms.334.12315>.
64. Yue, H., Qiu, B., Jia, M., Liu, W., Guo, X. F., Li, N., ... and Li, D. (2021). Effects of α -linolenic acid intake on blood lipid profiles : a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(17): 2894-2910. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1790496>.
65. Zhang, Q., Xu, F., Li, Y., Zheng, M., Xi, X., and Han, C. (2018). Silybum marianum seeds oil attenuates CCl4-induced hepatic fibrosis via regulation of inflammatory response and oxidative stress. *Current Nutrition and Food Science*, 14(3): 197-203. <https://doi.org/10.2174/1573401313666170609100551>.
66. Zheng, Y. Z., Fu, Z. M., Deng, G., Guo, R., and Chen, D. F. (2020). Free radical scavenging potency of ellagic acid and its derivatives in multiple H⁺/e⁻-processes. *Phytochemistry*, 180: 112517. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112517>.