الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالى و البحث العلمى

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا والبيئة النباتية

N°...../SNV/**2017**

أطروحة

مقدمة من طرف

مرواني نوال

للحصول على شهادة

دكتـــوراه علـــوم

الفرع: بيولوجيا

تخصـــص: بيولوجيا النبات

الموضوع

دراسة بيولوجية وتشريحية لنبات *Aristolochia longa* L.

نوقشت بتاريخ 19 /2017/

أمام لجنة المناقشـــة

الرئيس : أ. لعور حسين أستاذ جامعة فرحات عباس – سطيف 1

المشرف: أ. بلحطاب رشيد أستاذ جامعة فرحات عباس – سطيف 1

الممتحنـــون

أ. يحي عبد الوهاب أستاذ المركز الجامعي عبد الحفيظ بوصوف ميلة

أ. دحية مصطفى أستاذ جامعة الجلفة

أ. العياضي زيان أستاذ جامعة بسكرة

مخبر الميكروبيولجيا التطبيقية

تشكـــــــــرات

الحمد الله نحمده و نشكره على أن أعاننا على إتمام عملنا و ألهمنا القدرة على ذلك و ما كنا لنفعل لولا أن أعاننا الله. ، وأصلي وأسلم على خاتم أنبيائه ورسله. خير خلق الله وأحب عباده إليه. صلاة وسلام يليقان بمقامه الكريم وصلاة وسلام على سائر إخوانه من النبيين والمرسلين وصلاة وسلام على اله وأصحابه والتابعين وصلاة وسلام على كل من دعا بدعوته إلى يوم الدين وبعد:

أتوجه بأسمى عبارات الشكر والتقدير إلى الأستاذ الدكتور الفاضل بلحطاب رشيد الذي تفضل بالإشراف على هذا البحث، والذي لم يبخل علينا بتوجيهاته و نصائحه لإنجاز هذا العمل.

كما أتقدم بالشكر إلى الأستاذ رئيس اللجنة والأساتذة أعضاء لجنة المناقشة، الذين تفضلوا وقبلوا مناقشة وإثراء هذا البحث:أ.د لعور حسين أستاذ بجامعة فرحات عباس سطيف 1لقبوله ترأس لجنة المناقشة،أ.د يحي عبد الوهاب أستاذ المركز الجامعي عبد الحفيظ بوصوف ميلة ،أ.د دحية مصطفى أستاذ بجامعة الجلفة وأ.د العياضي زيان أستاذ بجامعةبسكرة.

أتقدم بالشكر الجزيل إلى أ.د ساحلي فريدة رئيسة قسم مخبر البكتيريولوجيا بالمستشفى الجامعي بسطيف وأ.د توابتي عبد الرزاق رئيس مخبر التحاليل الطبية بالمستشفى الجامعي بسطيف،كما أشكر أ.د جربوعة وأ.د براق سعاد بمصلحة التشريح المرضي بالمستشفى الجامعي بسطيف. كما لاأنسى أن أشكرالأساتذة الكرام بجامعة فرحات عباس سطيف1على مساعدتهم : أ.د لعور حسين، أ.د دحامنة صليحة، الأستاذة عميرة فطيمة، الأستاذة مرغم منيرة، الأستاذة قادة سوسن، الأستاذة مسعودي دليلة، الأستاذة بوخبتي حبيبة ،الأستاذة حداد ليلى، الأستاذ قطاف سفيان ،الأستاذة عرابة راضية،الأستاذة هاني مريم والأستاذة بشمار سعاد.كما أتقدم بالشكر الخاص إلى العشاب الطاهر، و لا يفوتني أن أشكر كل زميلاتي و زملائي على نصائحهم ومساعداتهم

القيمة. و في الأخير أشكر كل من ساهم من قريب أو من بعيد في إنجاز هذا البحث ولو بكلمـــة طيبة.

الإهداء

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

إلى روح أمي الغالية أسكنها

الله فسيح جناته التي لطالما

أحبت العلم وشجعتني عليه.

و إلى:

أغلى و أعز ما أملك في الوجود أبي أطال الله في عمره

ابني قرة عيني خليل جمال الدين

ابن أختي الحبيب مصطفى عبد المؤمن

أختي الغالية سميرة

إلى كل صديقاتي و أصدقائي الأعزاء.

الملخص

في إطار تثمين الموارد النباتية، إخترنا دراسة نبات.*Aristolochia longa* L (Aristolochiacea) ينمو بالجزائر وتحديدا بولاية سطيف، يستعمل في الطب الشعبي لأغراض متعددة، خاصة لمكافحة مرض السرطان. تخص هذه الدراسة التحليل الكيميائي النوعي لهذا النبات، والكمي الذي يخص تقدير الفينولات الكلية، الفلافونوييدات، ومواد الدباغة، بعد تحضير مستخلصات نباتية من الجزء الهوائي(السيقان والأوراق)، الثماروالدرنات باستعمال مذيبات مختلفة ذات قطبية مختلفة مثل الأسيتون، الميثانول والماء المقطر. تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة مخبريا بثلاث طرق مختلفة: إلتقاط مباشر للجذور الحرة بطريقة إزاحة جذرDPPH ، القدرة على الإرجاع و اختبار ابيضاض المركب الـβ- Carotène. أظهر المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي أكبر قيمة للفينولات الكلية (525,43 ±29,6 µg /مغ)، يليه المستخلص المائي للثمار (518,54 ±14,93 µg /مغ)، في حين حقق المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي أكبر قيمة من الفلافونوييدات (52, 37 ±0,94 µg /مغ)، كماأعطى أيضا أعلى نشاطية مضادة للأكسدة لإزاحة جذرالـ DPPH، وأعلى قدرة إرجاع(55,04 ± 1,29 µg /مع و0,200 ± 0,019 مغ/ملل على الترتيب)، من جهة أخرى المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي كانت له أعلى نسبة (57%) في النشاطيةالمضادة للأكسدة في إختبار ابيضاض الـβ- Carotène. بالنسبة للنشاطية المضادة للبكتيريا فكان المستخلص الميثانولي للثمار فعالا جدا ضد البكتيريا المختبرة*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و*Bacillus cereus* ATTC10876 ، في حين لم نلاحظ أي تأثير لكل المستخلصات على الفطريات المختبرة *Aspergillus flavus* NRRL 391، *Aspergillus niger* 2CA 936 والخميرة *Condida albicans* ATCC1024. أكبرنسبة تثبيط لتخريب البروتينات كانت من طرف المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي(78,35±6,18%) في تركيز 500 µg /ملل مقارنة مع ديكلوفيناك الصوديوم (85,56 ±1,78%) في النشاطية المضادة للإلتهاب.الدراسة التشريحية لكل من جذر ، ساق و ورقة .*Aristolochia longa* L بينت أن لديها تركيب نموذجي لنبات ثنائي الفلقة، وأثبتت أن درنة هذا النبات هي درنة جذر. كما أظهرت دراسة السمية الحادة لكل من المستخلص المائي للدرنات و المستخلص المائي للثمارأنه غيرسام نسبيا بـ DL_{50} تفوق12غ/كغ وDL_{50} أكبرمن 5000 مغ/كغ< لكل من المستخلصين على الترتيب،كما أثبتت التحاليل البيوكيميائية و مقاطع الأنسجة للفئران على تأثر كل من أنسجة الكبد والكلى خاصة عند الجرعات العالية من هذا النبات. أخيرا، ونظرا للنتائج المتحصل عليها فإن نبات .*Aristolochia longa* L لديه نشاطية بيولوجية هامة، مما يدعونا لدراسته بصفة أدق لإمكانية استعماله بشكل أفضل في المجال الطبي.

الكلمات المفتاحية: .*Aristolochia longa* L، دراسة تشريحية، الفينولات الكلية، نشاطية مضادة للأكسدة، نشاطية مضادة للبكتيريا والفطريات، النشاطية المضادة للإلتهاب، السمية الحادة.

Resumé :

L'objectif de cette étude est de valoriser une plante médicinale locale *Aristolochia longa* L. (Aristolochiacea) .Cette plante est utilisée traditionnellement contre beaucoup de maladies et surtout le cancer. Cette étude vise l'analyse phytochimique qualitative et quantitave de la plante(dosage des polyphénols totaux,des flavonoides et des tanins),après préparation des extraits de la partie aérienne de la plante(tiges et feuilles),des fruits et des tubercules, en utilisant des solvants avec polarité différente, comme l'acetone,Methanol et l'eau distillée. L'activité anti-oxydante a été évaluée in vitro par l'utilisation du test DPPH, par le pouvoir réducteur du Fer et par le test du blanchissement du ß-carotène. L'extrait acetonique de la partie aérienne contient une grande quantité de phénols totaux(525,43±29,6µg/mg) suivi par l'extrait aqueux des fruits(518,54±14.93µg/mg). Alors que l'extrait methanolique de la partie aérienne contient la plus grande quantité des flavonoïdes (52,37±0.94µg/mg), il posséde aussi une grande activité antioxydante par le test DPPH et un grand pouvoir réducteur (55,04ug/ml±1,29 et 0,2 mg/ml±0,019 respectivement). D'autre part l'extrait acetonique de la partie aérienne possède l'activité la plus élevée avec un taux de 57% dans l'activité antioxydante du blanchissement du ß-carotène. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, l'extrait méthanolique des fruits est très efficace contre le *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923and *Bacillus cereus* ATTC10876.Mais tous les extraits de la plante n'ont aucune activité antifongique sur *Aspergillus flavus* NRRL 391, *Aspergillus niger* 2CA 936 and *Condida albicans* ATCC1024. Pour l'activité anti-inflammatoire le taux le plus élevé d'inhibition de la dénaturation des protéines a été observé avec l'extrait acetonique de la partie aérienne (78,35±6,18)% pour la concentration500µg/mlcomparativement au diclofenac de sodium avec (85,56±1,78) %.L'étude anatomique de toutes les parties de la plante(racines,tiges et feuilles) a démonté qu'elle a une morphologie typique d'une plante dicotylédone et que le tubercule de cette plante est issu d'une racine. L'étude de la toxicité aigue démontre que les extraits aqueux des tubercules et des fruits sont relativement non toxiques avec des DL_{50} respectives supérieure à 12g/kg et supérieure à 5000mg/kg. Les analyses biochimiques et l'étude histologique des organes des souries ont démontré que les tissus des reins et des foies sont plus affectés surtout à des doses élevées. Enfin, et vu les résultats obtenus, l'*Aristolochia longa* L. a une activité biologique importante, ce qui nous incite à l'étudier d'une façon minutieuse et approfondie pour une meilleure utilisation dans le domaine médical.

Mots clés : *l'Aristolochia longa* L., Etude anatomique, Phenols totaux, Activité antioxydante, Activité antibactérienne et antifongique, Activité anti-inflammatoire, Toxicité aigue.

Abstract

The aim of this study is to evaluate *Aristolochia longa* L. (Aristolochiacea) ,a local medicinal plant. It is used in folk medicine for multiple purposes, especially for the fight against cancer. This study was devoted the qualitative and quantitative phytochemical analysis(the determination of polyphenols, flavonoids, and tannins contents of *Aristolochia longa* L.) after their extraction by using various solvents with different polarities(methanol, acetone and distilled water). These extracts were prepared from aerial parts (stems and leaves), fruits and tubers. The antioxidant activity was determined using three in vitro assays methods**:** scavenging effect on DPPH, the reducing power assay and ß-carotene bleaching inhibition (CBI). The results obtained indicate that the acetone extracts from the aerial parts presented the highest contents of polyphenols(525,43±29,6µg/mg)followed by fruit aqueous extract (518,54±14.93µg/mg). while the aerial parts methanol extract has the highest flavonoids content (52,37±0.94µg/mg).The results of the antioxidant activity showed that all extracts of *Aristolochia longa* L., prepared using different solvent, have diverse antioxidant capacities, however The aerial parts methanol extract exhibited the highest antioxidant capacity of DPPH and reducing power(respectively 55,04ug/ml±1,29 and 0,2 mg/ml±0,019), but the aerial parts acetone extract showed the highest antioxidant capacity in the test of ß-carotene bleaching inhibition with 57%. For antibacterial activity the fruit methanol extract was too efficient against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923and *Bacillus cereus* ATTC10876, but no effect was observed when these extracts were tested on the fungi *Aspergillus flavus* NRRL 391, *Aspergillus niger* 2CA 936, and *Condida albicans* ATCC1024. The inhibition protein denaturation was found in the aerial parts acetone extract to be (78,35±6,18)% at the dose 500µg/ml,with regards to standards Diclofenac sodium (85,56±1,78)% in the anti-inflammatory activity. The anatomical study of root, stem and leaf of *Aristolochia longa* L. showed that it has a typical structure of the dicotyledon plant, and proved that the tuber of this plant is a root tuber. The study of acute toxicity of the aqueous extract of tubers and the Fruit aqueous extract also showed that it was relatively non-toxic, with DL50 superior to 12 g / kg, and DL50 superior than 5000 mg / kg) respectively. Biochemical analyses and tissue sections of mice also showed that both liver and kidney tissues were affected, especially at high doses of this plant. Finally, due to the obtained results, the Aristolochia longa L. plant has an important biological activity, which invites us to study more precisely the possibility of a better use in the medical field.

Key words: *Aristolochia longa* L., Anatomical study, Total phenols, Antioxidant activity, Antibacterial and fungal activity, Anti-inflammatory activity, Acute toxicity.

الفهرس

الجزء النظري

مقدمة.....1

I – النباتات الطبية.....3

II- المركبات الأساسية للنبات.....3

III - طرق تصنيع المستقلبات الثانوية 20

IV- النشاطية البيولوجية 21

IV-1-النشاطية ضد ميكروبية.....21

IV-2- النشاطية المضادة للأكسدة.....22

IV-2-1-الأنواع الأكسجينية النشطة.....22

IV-2-2-آليات الدفاع المضادة للأكسدة.....23

IV-2-2-الإجهاد التأكسدي والعوامل المحدثة له.....24

IV-3-النشاطية المضادة للإلتهاب.....27

IV-4-السمية.....28

IV-4-1- المواد السامة.....28

IV-4-2- أنواع السمية.....29

V- الدراسة النسيجية للنبات 32

V- 1-الأنسجة الميرستيمة(الإنشائية) الإبتدائية.....32

V- 1-1-الأنسجة الإبتدائية (الأساسية).....33

V- 2- المرستيم الثانوي.....39

V- 2- 1-البنية الثانوية.....39

VI- الزهرة.....40

VI- 1- بنية وإنتاش البذرة.....43

VII- العائلة الزراوندية Aristolochiaceae.....44

VII-1- جنس *Aristolochia*.....45

VII-1- 1- تصنيف جنس *Aristolochia*.....48

VII-2-النوع *Aristolochia longa* L.....49

VII-2-1 التسمية المحلية.....50

VII-2-2-التصنيف.....50

VII-2-3-الإستعمال الطبي 51

VIII- حمض الأرستولوشيك Acide aristolochique 51

الجزءالعملي

مواد و طرق العمل.....54

I - المواد.....54

I-1-المواد النباتية.....54

I-2- المواد الكيميائية والأجهزة.....54

I-3-فئران المخبر 54

II-الطرق التجريبية 54

II-1– الدراسة الأثنوطبية لنبات *Aristolochia longa L.* 54

II-2-الدراسة المورفولوجية و التشريحية لنبات *Aristolochia longa L.*.....54

II-2-1-تحضير المقاطع النباتية للدراسة التشريحية.....54

II-3 تحضير المستخلصات.....55

II-3-1تحضير المستخلص المائي.....55

II-3-2 تحضير المستخلص الأسيتوني.....55

II- 3-3 تحضير المستخلص الميثانولي 55

II-4- التحليل الكيميائي للنبات Analyse phytochimique.....56

II-4 -1 التحليل النوعي Analyse qualitative.....56

II-4-2 –التحليل الكمي.....58

II-4-2 -1- تقدير الفينولات الكلية 58

II-4-2 - 2- تقدير الفلافونويدات 58

II-4-2 - 3- تقدير الفلافون والفلافونول.....58

II-4-2 – 4- تقدير مواد الدباغة 59
II-4-2 - 5- تحديد وجود الليكوبين، بيتا كاروتان ، كلوروفيل أ و كلوروفيل ب.....59
II--5 دراسة النشاطية المضادة للأكسدة 60
II-5-1- إختبار إزاحة الجذرالحر DPPH.....60
II-5-2-اختبار إرجاع الحديد(Reducing power) 60
II-5-3-الإختبارالمضاد للأكسدة النوعي باستعمال الـ β- carotène 61
II-5-4- إختبار تبييض β –carotène / acide linoléique 61
II-6 - النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات نبات .*Aristolochia longa* L.....62
II-6-1-سلالات البكتيرية و الفطرية و اوساط الزرع المستعملة.....62
II-6 -2 دراسة النشاطية ضد بكتيرية 62
II-6-2-1 تقنية اللمس المباشر.....62
II-6-2-2طريقة المزج في وسط سائل.....64
II-6 -3 النشاطية الضد فطرية لمستخلصات نبات .*Aristolauche longa* L.....64
II-7- النشاطية المضادة للإلتهاب في المخبر.....65
II -7 - 1-طريقة تثبيط تخريب البروتينات.....65
II-8 - تقييم سمية النبات .*Aristolochia longa* L.....65
II-8 -1- السمية الحادة لدرنات نبات .*Aristolochia longa* L.....66
II-8 -2-تقييم السمية الحادة للجزء الهوائي و ثمار نبات الـ.*Aristolochia longa* L.....67
II-8 -3- أخذ عينات الدم و إنجاز التحاليل البيوكيميائية.....67
II-8 -4- تحضير المقاطع النسيجية 68
III– النتائج و المناقشة.....69

III-1– الدراسة الأثنوطبية لنبات *Aristolochia longa* L. 69

III-2 -الدراسةالمورفولوجية و التشريحية لنبات *Aristolochia longa* L. 71

III-2 -1 –الخصائص المورفولوجية 71

III-2–2- تتبع مراحل الإنتاش وتشكل الدرنات 72

III-2 -3 الدراسة التشريحية لجذر فتي 75

III-2 -4 الدراسة التشريحية للساق 77

III-2 -4 -1-السيقان الهوائية 77

III-2 -4 -2-السيقان الترابية الفتية 78

III-2 -4 -3 الدرنات 79

III-2 -4 –4 تطور بنية السيقان الهوائية 82

III-2 -5 -الدراسة التشريحية للأوراق 84

III-2 -6 الدراسة التشريحية لزهرة *Aristolochia longa* L 86

III-3-المستخلصات النباتية 89

III-4 التحليل الكيميائي لنبات *Aristolochia longa* L. 90

III-4-1التحليل النوعي 90

III-4-2التحليل الكمي 91

III-4-2 -1 تقدير الفينولات الكلية 91

III-4-2-2 تقدير الفلافونويدات 93

III-4-2-3 تقدير الفلافون والفلافونول 94

III-4-2-4 تقدير مواد الدباغة 94

III-4-2-5- تحديد وجود الليكوبين، بيتا كاروتان ، كلوروفيل أ و كلوروفيل ب 97

III-5- دراسة النشاطية المضادة للأكسدة 98

III-5-1إختبار إزاحة جذرDPPH 98

III-5-2-اختبار إرجاع الحديد(Reducing power) 102

III-5-3-تقدير النشاط المضاد للأكسدة نوعيا: إبيضاض الـ β- carotène 105

III-5-4- اختبار كمي للـ β- carotène 109

III-6النشاطية المضادة للإلتهاب في المخبر 111

III-6-1 طريقة تثبيط تخريب البروتينات 111

III-7 النشاطية ضد ميكروبية لمستخلصات *Aristolochia longa* L. 113

III-7 -1 النشاطية ضد بكتيرية لمستخلصات *Aristolochia longa* L. 113

III-7 -1 -1- تقنية اللمس المباشر 113

III-7-1-2 طريقة المزج في وسط سائل 119

III-7 -2 النشاطية ضد فطرية لمستخلصات *Aristolochia longa* L. 123

III- 8- تقييم سمية النبات *Aristolochia longa* L. 127

III-8 -1- السمية الحادة لدرنات نبات *Aristolochia longa* L. 127

III-8 -1- 1- تطور الوزن خلال التجربة 127

III-8 -1- 2-الكتلة النسبية للأعضاء 129

III-8 -1- 3- الاختبارات البيوكيميائية 130

- III-**8 -2-** السمية الحادة المستخلص المائي 132

لكل من الجزء الهوائى وثمارنبات *Aristolochia longa* L

III-8 -2- 1- تطور الوزن خلال التجربة 132

III-8 -2- 2- الكتلة النسبية للأعضاء 134

III-8 -2- 3- الاختبارات البيوكيميائية 136

III-8 - 3- دراسة الأنسجة 138

الخاتمة.....147
المراجع.....150
الملاحق

قائمة الأشكال

شكل1. البنية الكيميائية للمركبات الفينولية.....8

شكل 2.أمثلة عن التنينات الذائبة في الماء (tanins hydrolysables).....10

شكل 3.مثال عن التنينات المكثفة(tanin condensé).....11

شكل4. مختلف أنواع الكينون 13

شكل5. البنية الكيميائية للفلافونوييدات.....14

شكل6. هيدروكربير غير حلقي ($C_{40}H_{50}$) مكونة من 8 وحدات إيزوبران(isopréniques).....18

شكل7. أمثلة عن بعض الكاروتنوييدات الطبيعية.....18

شكل8. البنية الكيميائية لليكوبان.....19

شكل9. طرق تصنيع المستقلبات الثانوية.....20

شكل10. إنتاج وإبطال الأنواع الأكسجينية النشطة.....24

شكل 11. مختلف الأمراض الناجمة عن الإجهاد التأكسدي.....25

شكل12. يلخص أصل الأنسجة الميرستيمية الإبتدائية.....33
إنطلاقا من الميرستيم القمي والتي تعطي أنسجة البنية الأولية

شكل13. بعض الأنواع المختلفة للزوائد البشرية.....34

شكل14.توضع كل من الأنسجة الأساسية والناقلة 37
على مستوى الأوراق(أ)، السيقان(ب) والجذور(ج) عند النبات ثنائي الفلقة

شكل15. مقطع عرضي في حزمة وعائية لنبات عشبي ثنائي الفلقة 37

شكل 16. تطورجذرأثناء البنية الثانوية.....40
(أ)، تطور ساق أثناء البنية الثانوية(ب)(ظهور بنية ثانوية مع ظهورالبشرة الثانوية والأشعة)

شكل17. شكل تخطيطي يوضح زهرة نموذجية(تحمل جميع المحيطات الزهرية.....41

شكل 18. تركيب حبوب الطلع.....42

شكل 19. أنواع الأزهار حسب توضع المحيطات الزهرية على التخت.....43

شكل 20. نبات جنس ***Aristolochia*** 45

شكل21. توزيع كل من.....46
A.albida، *A.emberger*i، *A .hockii*، و*A.paucinervis* في إفريقيا*A.longa*

شكل 22 . الشكل المورفولوجي لأزهار الـ *Aristolochia* ..... :.....48

شكل23. الأحماض الأرستولوشية (AI وAII).....53

شكل24. نسب الأمراض المعالجة بواسطة نبات *Aristolochia longa* L.....69

شكل 25. نسب استعمال أجزاء نبات النبات *Aristolochia longa* L. في ولاية سطيف.....70

شكل26. نسب طرق تحضير نبات *Aristolochia longa* L.....71

شكل27. الشكل المورفولوجي لنبات *Aristolochia longa* L. 72

شكل28. مراحل تشكل الدرنات عند نبات *Aristolochia longa* L.....74

شكل 29. (a) بادرة ، **(b)** مقطع عرضي في جذر فتي لـ، **(c)** الأسطوانة المركزية لجذرفتي ، **(d)** الحزم الوعائية لجذرفتي لنبات *Aristolochia longa*L.. 76

شكل30. مقطع عرضي لساق فتي لنبات *Aristolochia longa* L. **a** جزء من المقطع العرضي عرضي كامل للساق الفتي، **c** الحزمة الوعائية.....78

شكل31. ممقطع عرضي لساق فتية تحت التربة.....79

شكل 32.مقطع عرضي لدرنة نبات *Aristolochia longa* L.....80

شكل 33.ظهور إزدواج الحزمة الوعائية بالمقطع العرضي للساق.....82

شكل34 .مراحل تطور عدد الحزم الوعائية و تغير في شكل مقطع الساق الهوائية(أ،ب،ج،د وهـ)..... 83

شكل35. مقطع عرضي لورقة نبات *Aristolochia longa* L.....84

شكل36. الشعيرات الموجودة على سطح السفلي من الورقة.....85

شكل 37. شكل ثغورعلى مستوى بشرة ورقة نبات *Aristolochia longa* L.....86

شكل38. زهرة نبات *Aristolochia longa* L.....87

شكل39. مقطع طولي في زهرة نبات *Aristolochia longa* L. 87

شكل40. مياسم زهرة نبات. *Aristolochia longa* L.....87

شكل 41.مقطع عرضي في مبيض لزهرة نبات. *Aristolochia longa* L.....88

شكل 42. أعضاء التكاثرالذكرية (الأسدية)(أ،ب)، شكل حبة الطلع(ج)

لزهرة نبات.*Aristolochia longa* L. 88

شكل43. ثمار نبات *Aristolochia longa* L...88
شكل44 .بذور نبات *Aristolochia longa* L...89
شكل45. منحنى العيارية لحمض الغاليك لتقدير الفينولات الكلية....................................92
شكل46. منحنى العيارية للكرستين لتقدير الفلافونويدات...93
شكل 47. منحنى العيارية للكرستين لتقدير الفلافون والفلافونول.................................94
شكل 48. منحنى العيارية لحمض التانيك لتقدير مواد الدباغة.......................................95
شكل49 . التأثير الإزاحي لمستخلصات المائية *Aristolochia longa* L.(الجزء الهوائيEAF
،الثمارEAFr والدرناتEAT) على جذر DPPH..98
شكل50 . التأثير الإزاحي لمستخلصات الميثانولية *Aristolochia longa* L.
(الجزء الهوائيEMF ،الثمارEMFr والدرناتEMT) على جذر DPPH..........................99
شكل51 . التأثير الإزاحي لمستخلصات الأسيتونية *Aristolochia longa* L.
(الجزء الهوائيESF ،الثمارESFr والدرناتEST) على جذر DPPH............................99
الشكل52 .التأثير الإزاحي لـ BHT على جذر DPPH...100
شكل53. تركيز مستخلصات.*Aristolochia longa* L المزيحة لـــــــ 50 %من جذرDPP...100
شكل54. قدرة إرجاع مستخلصات *Aristolochia longa* L......................................103
شكل.55. قدرة إرجاع الكرستين(Quercetine) وBHA...104
شكل56. القوة الإرجاعية للمستخلصات المائية، الميثانولية و الأسيتونية ولكل
من BHA وQuercetine عند طول موجة 700 نانومتر...104
شكل57.نتائج الاختبار النوعي للـ β- carotène للمستخلصات المائية،الميثانولية والأسيتونية
والشواهد الموجبة (الكرستين وBHA) والشواهد السالبة الماء،الميثانول والأسيتون.............107

شكل58. مقارنة أقطار الهالات برتقالية اللون حسب تراكيز مختلفة1، 2 و4مغ\ملل للمستخلصات..... 108

شكل 59. مقارنة قطر الهالات برتقالية اللون بتركيز 2 مغ/ملل لكل من المستخلصات و الشواهد الموجبة BHA و Quercètine 109

شكل60. إختبارإبيضاض β-carotene/حمض اللينولييك في وجود مستخلصات نبات.L *A.longa* و الشاهد الموجب (BHA) والسالب (الماء ،الميثانول) 110

الشكل61. نسب النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبات.L *A.longa* و (BHA) والماء،الميثانول) بعد مرور 2 ساعة من بدأ إختبار β-carotene/حمض اللينولييك..... 111

شكل62. النشاطية المضادة للإلتهاب لمستخلصات نبات .*Aristolochia longa* L.....112

شكل 63. النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات الميثانولية.....116

شكل64. النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات الأسيتونية.....117

شكل 65.النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات المائية.....118

شكل66.تأثير الشاهد الموجب Gentamycine على كل من*Bacillus cereus* ، *Staphylococcus aureus* ، *E.coli* و *pseudomonas aeruginosa* 119

شكل67. تأثير الشاهد السالب DMSO على كل من*Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* ، *E.coli* و *pseudomonas aeruginosa* 119

شكل68. النشاطية المضادة للفطريات للمستخلصات المائية والميثانولية والأسيتونية لفطر *A.niger*.....124

شكل69. النشاطية المضادة للفطريات للمستخلصات المائية والميثانولية والأسيتونية لفطر *A.flavus*.....125

شكل70. ظهورالنمو الفطري لكل من *A.flavus A.niger*.....125

شكل71. النشاطية المضادة للفطريات للمستخلصات المائية والميثانولية والأسيتونية لخميرة *Candida albicans*.....126

شكل72. الوزن المكتسب لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة.....128

شكل73.النسب المئوية للزيادة في الوزن لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة.....129

شكل74.تغيرات الكتلة النسبية للكبد والكلى اثناء إختبارالسمية الفورية بالمستخلص المائي لنبات *Aristolochia longa* L. 130

شكل75. الوزن المكتسب لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة.....133

شكل76. النسب المئوية للزيادة في الوزن لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة.....134

شكل77. تغيرات الكتلة النسبية لكبد وكلى الفئران اثناء اختبار السمية الفورية بالمستخلص المائي لنبات *Aristolochia* longa L. 135

شكل 78. تأثير المستخلص المائي لدرنات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكبد للفئران المختبرة.....139

شكل 79. تأثير المستخلص المائي لدرنات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكلى للفئران المختبرة.....140

شكل 80. تأثير المستخلص المائي لثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكبد للفئران المختبرة مدة 14 يوم بجرعة2غ/كغ.....141

شكل 81. تأثير المستخلص المائي لثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكلى للفئران المختبرة بجرعة2 غ/كغ.....142

شكل 82. تأثير المستخلص المائي للثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكبد للفئران المختبرة بجرعة5 غ/كغ.....143

شكل 83. تأثير المستخلص المائي للثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكلى للفئران المختبرة بجرعة5 غ/كغ 144

قائمة الجداول

جدول 1. المصادر الداخلية والخارجية للإجهاد التأكسدي 25

جدول2. أنواع التسمم.....31

جدول3.أصناف السمية: سلم 1943Hodge et Sterner 66

جدول 4. مردود المستخلصات المحضرة من نبات *Aristolochia longa L.*.....90

جدول5.نتائج التحليل الكيميائي النوعي لنبات *Aristolochia longa* L. 90

جدول 6. محتوى المركبات الفينولية في مستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. 96

جدول7. كمية الليكوبين، بيتا كاروتان ، كلوروفيل أ و كلوروفيل ب في المستخلصات.....97

جدول 8. النشاطات المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية.*Aristolochia longa* L.....101

جدول9. النشاطية المضادة للإلتهاب لمستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. 112

جدول 10. النشاطية ضد بكتيرية لمستخلصات *Aristolochia longa* L. 114

جدول 11 . التراكيز الدنيا المثبطة لـمستخلصات نبات.*Aristolochia longa* L. 120

جدول12. تطور وزن الفئران للفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة.....128

جدول 13. الكتلة النسبية لأعضاء الفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي لدرنات نبات *A.longa* L. 129

جدول 14. التحاليل البيوكيميائية للفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي لدرنات نبات *A.longa* L. خلال دراسة السمية الحادة.....131

جدول15. تطور وزن الفئران للفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة.....133

جدول16. الكتلة النسبية لأعضاء الفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي للجزء الهوائي وثمار نبات.*A.longa* L. 135

جدول 17. التحاليل البيوكيميائية للفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي لدرنات نبات *A.longa* L. خلال دراسة السميةالحادة.....137

المقدمة

إن دراسة علم النبات والتعرف على عالم النباتات أمر ضروري للإطلاع على العالم الذي نعيش فيه، ذلك لأن حياة الإنسان أصبحت مرتبطة إرتباطا وثيقا بحياة النباتات باعتبارها المصدر الرئيسي لغذائه وأكسجين تنفسه وملبسه وملجئه وصناعاته وأدويته ومختلف حاجياته اليومية الضرورية(أحمد،1996).
لكن منذ فترة طويلة الإنسان أهمل إستخدام الأعشاب الطبية في العلاج إعتمادا على البديل الصناعي من الأدوية، الذي يكون للكثير منها مضاعفات وآثار جانبية ضارة(حمزة،2006)، دراسة واستعمال طب الأعشاب تخطى مرحلة العلم التجريبي، فرغم تهميشه من طرف الطب الحديث الذي يعتمد على التكنولوجيا والجزيئات المصنعة فإنه وجد مصداقية جديدة، ونفسر هذا بأن الطب الحديث سمح بعزل المركبات الفعالة للنباتات من أجل دراسة خصائصها، إضافة إلى ذلك أن هذه الدراسات أثبتت فعالية العلاج لبعض هذه المركبات في بعض الأمراض. كما لا ننسى أن النباتات الطبية تحتوي على العديد من المركبات التي لم تعرف بعد، وبتفاعل هذه الأخيرة مع المركبات المعروفة فإنها تساهم بفعالية في الشفاء من الأمراض وهذا حسب رأي الباحثين المؤيدين للعلاج بالنباتات(Iburg,2006).
لكن من الخطأ أن نفكر بأن استعمال النباتات الطبية، عكس الأدوية الصيدلانية تكون كليا خالية من الأخطار، بالعكس ينبغي استعمالها بطريقة دقيقة جدا مع احترام الجرعات الموصوفة من أجل تفادي كل أثر غير مرغوب فيه يكون فيه خطر على الصحة. في الواقع قدرة تأثير النبات الطبي على وظائف الجسم، يعتمد كثيرا على طبيعة كل مادة فعالة للنباتات و على الكمية المتناولة(Khothe,2007). حسب Shauenberg(2006) فإن واحد من سبعة فقط من النباتات الموجودة تتضمن خصائص علاجية ويجب أيضا أن تنقى وتحضر بعناية ودقة.
بلاد الجزائر غنية جدا بنباتاتها الطبية المتنوعة لما لها من مساحات واسعة ومناخات عديدة : بحرية، قارية، صحراوية ولما تتمتع به من دفء وسطوع شمسي، طقس جميل، وتربة متنوعة وخصبة للغاية في معظمها. ولا شك أن لهذه المناخات والتربة من أثر بالغ ليس فقط على شدة التنوع النباتي ولكن أيضا على تركيب النباتات وإعطائها المميّزات الخاصة. وقد دلت التجارب أن نباتات المناطق المعتدلة أكثر فعّالية وأغنى في العناصر المفيدة من نباتات المناطق الباردة. كما أثبتت الدراسات العديدة أن بالجزائر ما يقل عن 3500 نوع من النباتات منها ما تعود إلى المناخات الحارة ومنها ما تعود إلى المناخات المعتدلة.ولا يخفى ما لهذه الثروة النباتية من قيمة إقتصادية لا يمكن إهمالها أو الإستهانة بها إذ في ذلك خسارة عظيمة بل يجب المحافظة عليها، تنميتها وتقييمها. إن معرفة النبتة معرفة حقيقية بوصفها وتحديد خصائصها وضبط مميّزاتها و تسميتها يعد أساس البحث العلمي الصحيح (حليمي، 1997).
يعتبرجنس *Aristolochia*، مصدر مهم للنشاط الفيزيولوجي للمركبات النشطة التي تنتمي لفئات كيميائية مختلفة، وهو موضوع البحث للعديد من الدراسات الكيميائية والصيدلانية.

يضم هذا الجنس حوالي 500 نوع موزعة في كل من المناطق الإستوائية، شبه الاستوائية، ومناطق البحر الأبيض المتوسط من العالم. تزرع هذه الأنواع كنباتات تزيينية، تستعمل كمهدئ، مسكن، مضاد للسرطان، مضاد للالتهابات، مضاد للأعصاب، مرخي للعضلات، مضاد للحساسية، مضاد للديدان المعوية، ألم في المعدة و البطن، الروماتيزم، الجروح والأمراض الجلدية، وأيضا مفيدة في علاج أنواع مختلفة من اللدغات السامة واللسعات (Pacheco et al.,2009). أنواع *Aristolochia* معروفة جيدا بتأثيراتها المفيدة، وقد وجدت العديد من الدراسات البيولوجية أن البعض منها يملك نشاطية مضادة للسرطان. علاوة على ذلك فإن كل من حمض الأرستولوشيكI وII يمتلك نشاطية مضادة لتخثر الدم(Alali et al.,2006).

لهذا فقد إرتأينا أن نختار نبات.L *Aristolochia longa* الذي ينتمي إلى عائلة Aristolochiaceae المتوطن في الجزائر والذي ينمو بمنطقة سطيف ويدرس لأول مرة على مستوى جامعة فرحات عباس.

يتضمن بحثنا دراسة إثنوطبية لنبات.L *Aristolochia longa* ودراسة النشاطية البيولوجية لمختلف مستخلصات هذا النبات(مائية، ميثانولية وأسيتونية) لمختلف أجزاء النبات من درنات ،جزء هوائي والثمار، حيث قسم العمل إلى جزأين: جزء نظري يشمل معطيات نظرية على النباتات الطبية والمواد الفعالة التي تحتويها، المشاكل الناجمة عن الجذور الحرة، ودور المركبات الفعالة في النشاطية المضادة الأكسدة والمضادة للميكروبات، كما تطرقنا في هذا الجزء إلى التعريف بالبنية التشرحية للنباتات، كما تطرقنا للخصائص المورفولوجية والصيدلانية للنبات المدروس، أما الجزء العملي فهو مقسم إلى سبعة محاور:(1) دراسة إثنوطبية لهذا النبات والهدف منها مدى معرفة سكان ولاية سطيف لهذا النبات وكيفية استعماله، كذلك دراسة النبات من ناحية الشكل الخارجي و البنية الداخلية أو التشريحية، (2) دراسة كيميائية لهذا النبات. مع تقدير كل من عديدات الفينول، الفلافونوييدات ، الفلافون والفلافونول، مواد الدباغة في المستخلصات المائية، الميثانولية والأسيتونية،(3) دراسة النشاطية المضادة للبكتيريا والفطريات لمستخلصات النبات المدروس، (4) دراسة النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات النبات المدروس باستعمال ثلاث طرق(إختبار DPPH، إختبار إبيضاض الـ β-carotène وإختبار إرجاع الحديد)، (5) النشاطية المضادة للإلتهاب التي تعتمد على تثبيط عملية تخريب البروتينات، (6) وأخيرا دراسة السمية الحادة للمستخلصات المائية لكل من درنات، الجزء الهوائي وثمار .L *Aristolochia longa*، (7) مناقشة النتائج المتحصل عليها.

كان الهدف من هذا العمل هو التعريف بهذا النبات الطبي والكشف عن خصائصه البيولوجية، حيث أنه ينمو بمنطقة سطيف و لم ينتشر استعماله إلا في السنوات القليلة الماضية بهذه المنطقة وانحصر تناوله عند مرضى السرطان. أخيرا، فإن هذه الدراسة تتيح لنا الفرصة لتعزيز معارفنا على النباتات المستوطنة في ولاية سطيف والتي لديها فائدة طبية.

الجزء النظري

I – النباتات الطبية

تعتبر النباتات الطبية كجزء من تطور الرعاية الصحية للإنسان منذ آلاف السنين، حيث تلعب المكونات الطبية الموجودة فيها دورا هاما في الطب الشعبي والحديث(Mickymaray,2016)، وفقا لمنظمة الصحة العالمية (WHO) لسنة 2015 يعتبرطب الأعشاب هو العلاج الطبي الأكثر استخداما في العالم.وحسب هذه المنظمة يوجد أكثرمن 20.000 نبات مستعمل من أجل خصائصه الطبية عبرالعالم. ولم تتم الدراسة العلمية إلا على 2000 إلى 3000 نبات طبي فقط. مع العلم أنه يوجد حوالي 500000 نوع نباتي، لم يتم إدراج سوى النصف منه فقط، حيث في أماكن مثل الأمازون هناك عدد مهم من النباتات التي لم تحصى أوتحدد بعد لحد الآن . وقد استخدمت الأعشاب منذ القدم كمواد غذائية و أيضا لأغراض طبية، مع العلم أن مختلف الأعشاب تحتوي على مجموعة واسعة من المواد الكيميائية النباتية الفعالة تتضمن الفلافونوييدات، التربينوييدات، القلويدات، الكبريتيد، الفينولات المتعددة، الكاروتينوييد، الكومارين، الصابونين والستيرولات(Jayathilake et al., 2016). يعتمد التأثير العلاجي للنباتات على الطبيعة الكيميائية للمواد الفعالة التي تحتويها، حيث أنه نبات طبي واحد نادرا ما يكون له تأثير وحيد ويمكنه في الغالب أن يعالج عدة أمراض، على عكس التأثير العلاجي الذي يتطلب في بعض الأحيان إشتراك عدة نباتات . (Rubin,2004)

II- المركبات الأساسية للنبات

تنتمي المواد الكيميائية التي تتكون منها مختلف أنسجة النبات (الأنسجة الدعامية ، الطلائية،الناقلة والإفرازية) والتي تتدخل في عملية استقلاب النبات إلى فئتين، الفئة الأولى تمثل الجزيئات البسيطة التي تشمل: الماء الذي تتراوح نسبته في الأوراق والثمار بين 60 – 80%، أما في الأنسجة المتخشبة كالسيقان والجذور....فتكون بين 40 إلى 50%، المركبات الأساسية أهمها الكربون، الأكسجين، الهيدروجين و الآزوت وهي تمثل الجزء الأساسي للمادة الجافة للنبات للنبات(حوالي 95%)، والمركبات المعدنية مثل الحديد، الكالسيوم، المغنيزيوم، الزنك، النحاس ...إلخ، أما الفئة الثانية فهي تتضمن المركبات العضوية ذات الجزيئات المعقدة، هذه الفئة تتضمن ثلاث عائلات مهمة وهي الغلوسيدات(السكريات)، الليبيدات و البروتيدات(الأحماض الأمينية، البيبتيدات والبروتينات). إضافة إلى هذه المكونات الأساسية نجد مكونات أخرى حيث البعض منها يتدخل في عملية استقلاب النبات مباشرة ويساهم في إعطاء لكل نبات ميزات خاصة به و هي الزيوت الأساسية والراتنجات. كما توجد مركبات أخرى تصنع من طرف النبات (Baba Aissa,2011) هذه المكونات الأخيرة تنتج من طرف كل نوع نباتي على شكل منتجات ثانوية .(Delilli,2007)

تتميز قدرة الإستقلاب عند الكائنات الحية باستقلاب أولي وثانوي. يرتبط الإستقلاب الأولي بالعمليات الحيوية الأساسية المشتركة في جميع النباتات، مثل عملية التركيب الضوئي، دورة البنتوز، تحلل

السكريات، دورة حمض الستريك، نقل الإلكترونات والفسفرة التأكسدية. تنتج وتحول المستقلبات الأولية إلى المركبات الجزيئية المطلوبة في عمليات بناء وصيانة الخلية. في عمليات الهدم، تزود المستقلبات الأولية (و المنتجات الغذائية) الإنتاج الحيوي (biosynthése) بالطاقة الكيميائية والمحفزات. أما المستقلبات الثانوية فهي مركبات تصنع من طرف النبات لأجل الدفاع عنه، كمثال على ذلك إنتاج النباتات للفيتوألاكسين (phytoalexines) كاستجابة للإصابة بالبكتيريا والفطريات. كما تمثل المستقلبات الثانوية الميزات التي يمكن التعبير عنها من حيث التمايز البيئي، التصنيف والكيمياء الحيوية والتنوع . الإنتاج الحيوي وتراكم المستقلبات الثانوية توفر أساسا التصنيف البيوكيميائي. بالإضافة إلى ذلك،التنوع الجزيئي الواسع للمستقلبات الثانوية في المملكة النباتية يمثل موردا هاما لا يقدر بثمن لاكتشاف أدوية جديدة وتطوير الأدوية المبتكرة (Gurib-Fakim ,2006).

المستقلبات الأولية يمكن تصنيفها على أساس بنيتها الكيميائية :الكربوهيدرات، الليبيدات، الأحماض الأمينية، البيبتيدات، البروتينات، الأنزيمات، مشتقات البيورين والبيريميدين. كماتظهر المركبات الثانوية أكثر تنوع من المركبات الأولية في بنيتها الجزيئية، من بين هذه المستقلبات القلويدات، الفينولات، تربينويدات. معظم المركبات النباتية التي وجدت أن لديها استعمال طبي و مهمة هي مستقلبات ثانوية (Gurib-Fakim ,2006).

المستقلبات المصنعة من طرف النباتات هي أنواع كثيرة مختلفة ،تشمل:

1- الكربوهيدرات

هذه المركبات هي أول منتجات النبات عن طريق التركيب الضوئي إبتداءا من الماء وثاني أكسيد الكربون.ويمكن تقسيمها إلى مجموعتين السكريات البسيطة والسكريات المعقدة (polysaccharides). السكريات البسيطة إما أن تكون سكريات أحادية مثل الغلوكوز، فركتوز، يكون لديها من ثلاث إلى سبع ذرات كربون($c_3 - c_7$)، أوسكريات قليلة تتكون من5- 6 وحدات من السكريات أحادية.أما السكريات المعقدة أو المتعددة تتكون من عدد كبير من السكريات الأحادية.

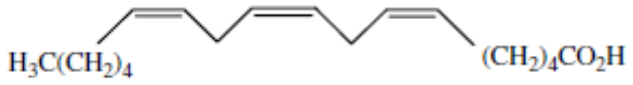
الكربوهيدرات تشكل جزءا كبيرا من الكتلة الحيوية النباتية، السيليلوزهو جزء من الجدار الخلوي ويعتبر النشاء كمدخرات غذائية. تستطيع السكريات أن تتحد مع مجموعة واسعة من المركبات لتعطي الجليكوسيدات،على حسب زيادة ذوبانية هذه المركبات في الماء. تختلف الجليكوسيدات في بنيتها الكيميائية ونشاطيتها الصيدلانية بسبب جزءها اللاسكري (aglycone) (Gurib-Fakim ,2006). حسب حمزة (2006) تقسم الجليكوسيدات تبعا لطبيعة الأجليكون (aglycone) إلى مجموعات عديدة مثل الجليكوسيدات الفينولية البسيطة، الجليكوسيدات الفلافونيدية، الجليكوسيدات الأنتراكينونية، الجليكوسيدات السيانيدية، الجليكوسيدات الكبريتية، الجليكوسيدات الأستيرودية و الجليكوسيدات الصابونية.

كما ذكرتGurib-Fakim (2006) أن للكربوهيدرات خصائص علاجية مفيدة، حيث مختلف السكريات المتعددة تكون مضادة للورم، مضادة للتخثر(مثل الهيبارين)، ولها نشاطية مضادة للفيروسات. مختلف المنتجات الكربوهيدراتية المتداولة تشمل السيليلوز ومشتقاته ، النشاء ومشتقاته، الدكسترين، الفريكتان (متعدد الفركتوز مثل الإينولين Inuline) والأقار أو الجيلوز.

2-الليبيدات

تنتج الليبيدات من ارتباط حمض عضوي(حمض دهني) مع كحول (الغليسيرول ...). تتكون الليبيدات أساسا من الكربون،الهيدروجين و الأكسجين، التي يمكن في الأخير إضافة عناصر أخرى مثل الفوسفور(فوسفو-أمينوليبيدphospho-amino-lipide)، أزوت(سيريبروزيد cérébrosides) ،....الخ لتكوين الليبيدات المعقدة. الليبيدات الثلاثية هي الغليسريدات(الغليسرول أو الغلسرين +حمض عضوي)، الستاريد stérides(الستيرول + حمض عضوي) والسيريدات cérides. كما نذكر من بين الليبيدات المعقدة الليبيدات الفوسفوأمينية (الغليسيرول+حمض الفوسفوريك+ كولامين+ الكولين)،ومن أهمها اللسيتين(lécithine). الدهون تكون كارهة للماء وهذه الميزة خاصة بالغلسريدات التي تتتكون من سلاسل هيدروكربونية-CH3 CH2-CH2- ..... CH3 وهي غير نفاذة للماء. من جهة أخرى اللسيتين(lécithine) تحوي داخل جزئياتها سلاسل محبة للماء(قادرة على امتصاص الماء عن طريق النقع) تكون مرتبطة مع السلاسل الكارهة للماء (Baba Aissa,2011).

الزيت النباتي للفول السوداني ينتج اللسيتين(lécithine) الذي يساعد على هضم الطعام،كما يستخدم lécithine أيضا في المستحضرات الصيدلانية. حديثا وجدت بعض الزيوت النباتية تكون غنية بحمض اللينولييك،الذي يحفزprostaglandines, leucotriènes et thromboxanes. تستخدم الزيوت النباتية في كل من الصناعات الغذائية والدوائية. البعض منها يستعمل كمذيب للأدوية التي تذوب في الدهون مثل المضادات الحيوية والفيتامينات. البعض الأخر مثل زيت اللوز والزيتون تستخدم في مستحضرات التجميل. كما يعرف زيت الخروع بمفعوله الجيد في حالة الإسهال لكن تراجع استعماله نظرا لمذاقه غير المستحب (Gurib-Fakim ,2006) .



γ-Linoleic acid

3-البروتيدات

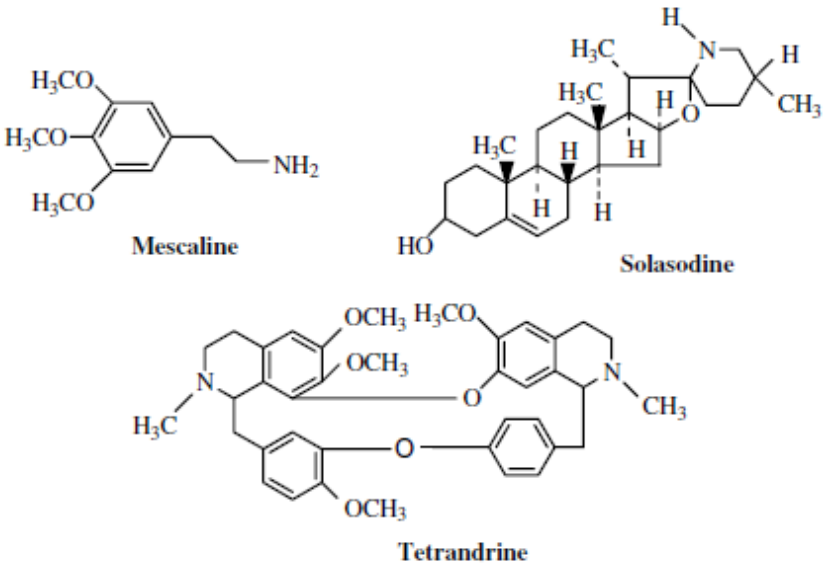
البروتيدات (protides)، protos كلمة يونانية تعني« الأول»، تمثل المركبات الأكثر أهمية في المادة الحية. تعتبر مركبات عضوية آزوتية (C,H ,O,N)،عند إماهتها طبيعيا بفعل أنزيمي فإنها تعطي أحماض أمينية. الفئات الأساسية للبروتيدات هي الأحماض الأمينية، البيبتيدات، والبروتينات، تتمثل هذه الأخيرة في سلاسل جد طويلة ومتفرعة حيث الوحدة البنائية تكون عبارة عن حمض أميني. الأحماض الأمينية الطبيعية تكون تقريبا كلها مصنعة من طرف النباتات. من بين الفئات الأساسية للبروتينات نذكر الألبومينات،الفسفوبروتيد(البروتينات الفوسفورية)، الغليكوبروتيد(تحتوي على هيدرات الكربون) والبروتيدات النووية الموجودة بأنوية الخلايا (Baba Aissa,2011).

4-القلويدات

تتميزالقلويدات بأنها مركبات عضوية قاعدية تحتوي في تركيبها على ذرة أو أكثرمن النيتروجين (حمزة،2006). حسب بنيتها الكيميائية، تنقسم القلويدات إلى عدة مجموعات فرعية: قلويدات حلقية متجانسة، و قلويدات حلقية غير متجانسة التي تنقسم بدورها إلى12مجموعة رئيسية حسب بنية حلقتها القاعدية. نذكربعض الأمثلة عن القلويدات مثل المسكالين(Mescaline)، التتردين(Tetrandrine) والصلازودين(Solasodine) (Gurib-Fakim ,2006). القلويدات عموما مواد قاعدية متبلورة تتحد مع الأحماض لتكون أملاحا، توجد في النبات على حالة حرة أو على هيئة أملاح وطعمها مر(حمزة،2006). القلويدات الحرة تذوب في المذيبات العضوية وتتفاعل مع الأحماض لتشكيل أملاح ذائبة في الماء. هناك استثناءات مثل البربرين، حيث يعتبر قلويد رباعي الأمونيوم. معظم القلويدات تكون صلبة باستثناء النيكوتين الذي يكون على شكل سائل.

للقلويدات عادة تأثير فيزيولوجي ملحوظ على الإنسان والحيوان، تعتبر مصدر للنتروجين. يعتقد أن لها دورا مهما في حماية النبات وإنباته، وأن تكون بمثابة محفزات للإنبات. كما تكون القلويدات أكثر شيوعا عند ثنائيات الفلقة منه عند أحادية الفلقة. من العائلات التي تكون غنية بالقلويدات نذكر العائلة الزنبقية Liliaceae، النرجسية Amaryllidaceae ، الدفلية Apocynaceae، البرباريسية Berberidaceae، القرنيّة أو البقولية Leguminosae، الخشخاشية Papaveraceae، الحوذّانية أو الشقيقيةRanunculaceae ،الفويّة Rubiaceae و الباذنجانية Solanaceae(Gurib-Fakim ,2006).

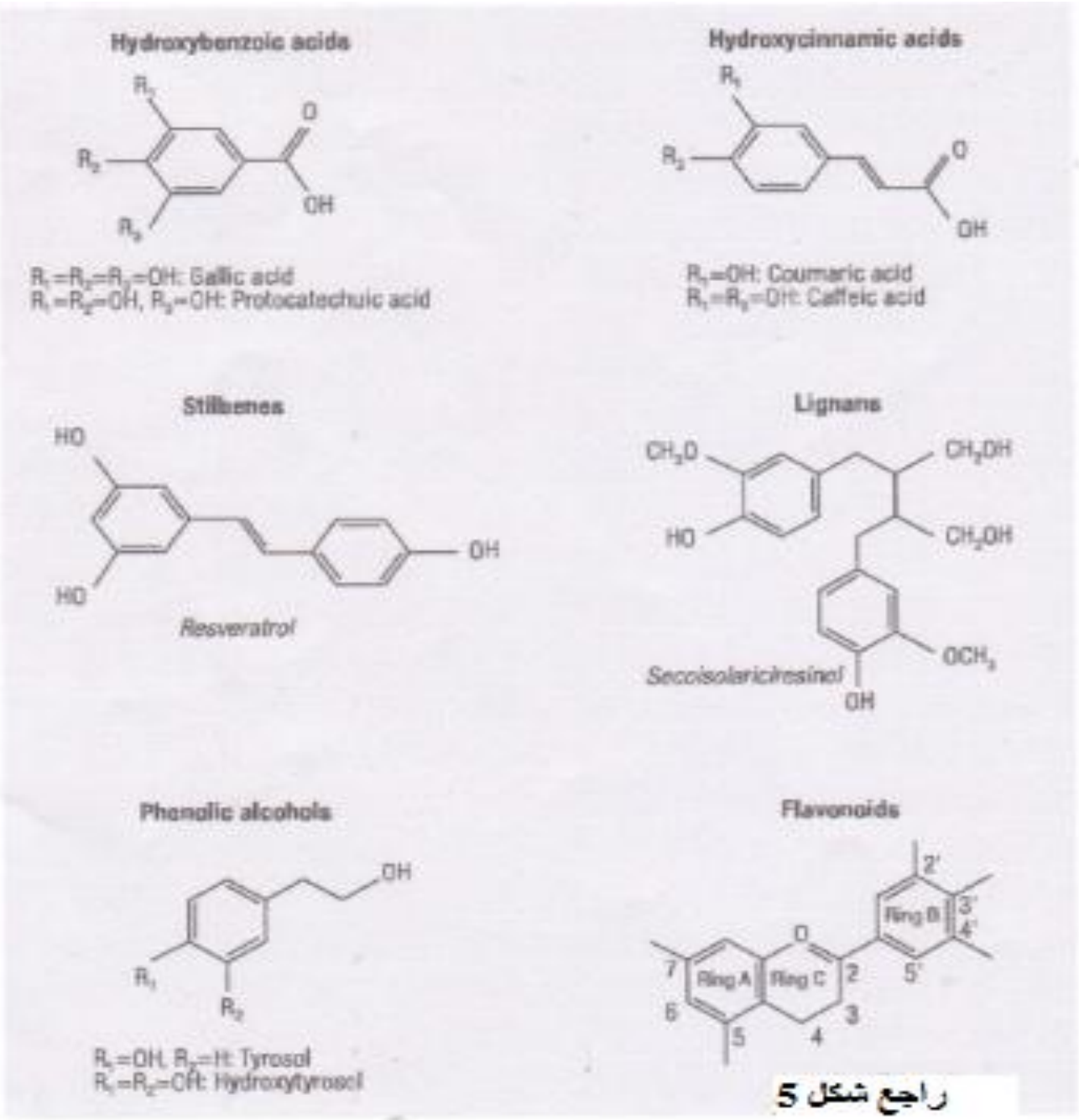
تعتبر القلويدات هامة صيدلانيا، مثل المورفين(morphine) يستعمل كمخدر ومسكن، الكوديين(codéine) يستعمل في علاج السعال، الكولشسين (Colchicine) في علاج مرض النقرس، الكينين كدواء مضاد للملاريا، الكينيدين (quinidine) بمثابة منظم لضربات القلب، ل- هيسيامين (L-hyoscyamine)(المعروف باسم الأتروبينAtropine) كمضاد للألم ومن أجل اتساع حدقة العين (Gurib-Fakim, 2006) .



5الفينولات الكلية

تعتبر الفينولات الكلية مجموعة كبيرة من الجزيئات الصغيرة الطبيعية والاصطناعية التي تتكون من واحدة أو أكثر من الحلقات العطرية الفينولية (شكل1). الفينولات الكلية الطبيعية هي فئة من المواد الكيميائية النباتية توجد بتراكيز عالية في الشاي، المكسرات، ،الكاكاو وفي مجموعة واسعة ومتنوعة من النباتات. أكثر من 8000 مركب من الفينولات قد تم تحديدها، ترتبط وظيفتها الطبيعية بحماية النباتات من الأمراض والأشعة فوق البنفسجية ووقاية البذور من التلف حتى تنبت. تضم الفينولات الكلية الطبيعية عدة فئات منها الفيتامينات (مثل الـ β- كاروتين، α-توكوفيرول، فيتامين A وفيتامين C)، الأحماض الفينولية (مثل حمض بنزويك (acide benzoique)، حمض فينيل أسيتيك(acide phenylacétique)، حمض السينامك(acide cinnamique) ،ومشتقاتها) و الفلافونويد (الأنتوسيانيدين، فلافانول، فلافونون، فلافون، فلافونول،إيزوفلافون ومشتقاتها وكذلك أوجينول(eugenol)، تيمول (thymol) الخ ...). أما الإصطناعية منها فتستعمل عادة كمؤشر لدرجة الحموضة pH في أوساط زرع الخلايا وأيضا كمضافات غذائية إصطناعية (مثل فينولسلفوفتاليين phenolsulfonphthaleine، بيتيلايتدهيدروكسيلانزول Butylated hydroxylanisole(BHA)، و بيتيلايتدهيدروكسيتولوينButylated hydroxytoluene (BHT)) (Kim et lee, 2004).

الفوائد العلاجية لهذه المركبات معروفة جدا، مثلا الحماية من عدة أمراض (السرطان، مرض فقدان الذاكرة(Alzheimer)، مرض القلب،...) ترجع إلى خصائصها المضادة للأكسدة(kabran et al.,2014) .



شكل1. البنية الكيميائية للمركبات الفينولية (Archivo et al.,2007)

تتنوع الفينولات الكلية مابين البنية البسيطة بحلقة عطرية واحدة إلى مركبات معقدة مثل مواد الدباغة ومادة الخشبين(lignines). نذكر أمثلة على المركبات الفينولية التي لديها أهمية صيدلانية:

5-1- المركبات الفينولية البسيطة

تملك هذه المركبات حلقة عطرية واحدة مع مجموعة كحولية، ألدهيدية، أوكربوكسيلية. قد يكون لديها سلسلة هيدروكربونية قصيرة. مثل الأوجينول(Eugénol) الذي يستعمل بشكل واسع في طب الأسنان نظرا لنشاطيته المضادة للبكتيريا والمضادة للإلتهاب ويستعمل كمخدرموضعي(Gurib-Fakim ,2006) .

5-2- التنينات أو مواد الدباغة(Tannins)

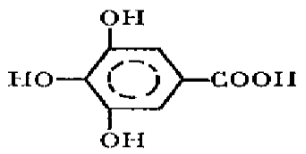
تعتبر مواد الدباغة بصفة عامة مركبات فينولية متواجدة في الطبيعة على شكل مبلمر، يتراوح وزنها الجزيئ بين 500 إلى 3000. إضافة إلى أن لديها الخصائص الكلاسيكية للفينولات، فإنها تستعمل في دباغة الجلود.

تنقسم التنينات إلى فئتين:

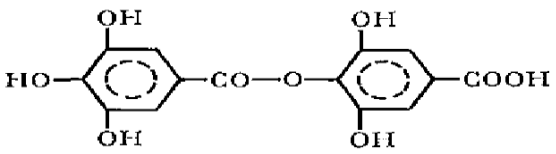
- فئة البيروقاليك (pyrogalliques) (المنحلة في الماء hydrolysables)
- فئة الكاتيشيك (catéchique)(مكثفة غير منحلة في الماء condensés non hydrolysable)

1-التنينات الذائبة في الماء(hydrolysables)

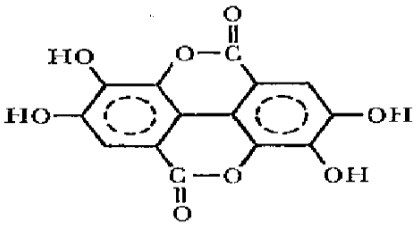
التي تعطي بالإماهة مع التسخين في وجود محلول حمضي مخفف، جزء سكري (غلوكوز) وجزء فينولي (حمض الغاليك (gallique) و حمض ثنائي الغاليك (digallique) أو إيلاجيك (ellagique).



Acide gallique



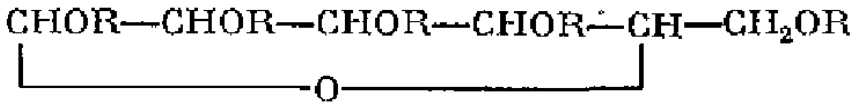
Acide digallique



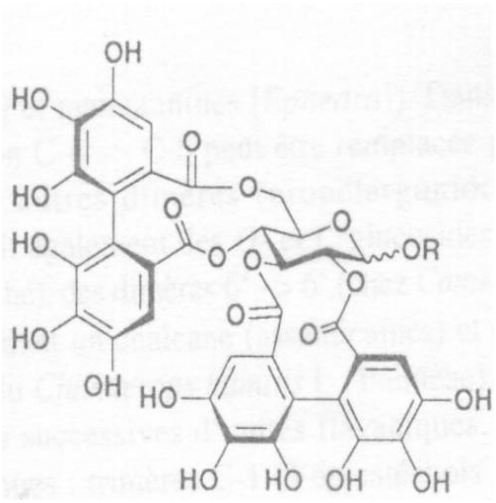
Acide ellagique

الإماهة يمكن أن تكون أنزيمية أيضا بواسطة دياستاز(diastase) مفرزة من طرف الفطر *Aspergillus niger* (أنزيم التاناز tanase).

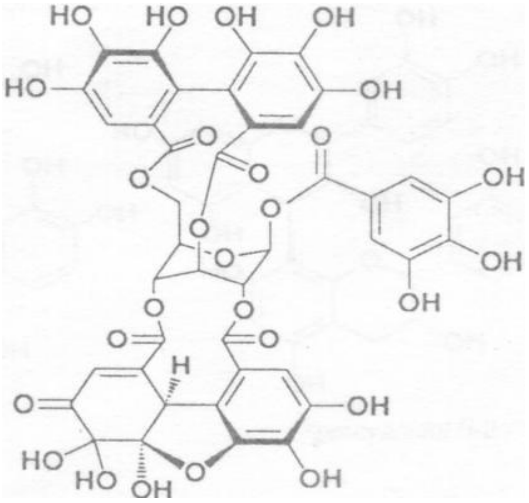
الصيغة الكلية والعامة لهذا النوع من التنينات يكون كالأتي حيث R يمثل حمض الغاليك (gallique) أو إيلاجيك(ellagique).



الشكل رقم 2 يوضح أمثلة عن التنينات الذائبة في الماء



Pédunculagine (R = H)



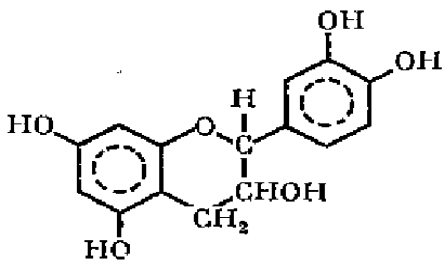
Géraniine

شكل 2.أمثلة عن التنينات الذائبة في الماء (tanins hydrolysables) (Sereme et al., 2010)

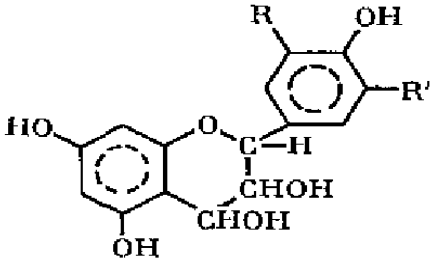
2-التنينات غير الذائبة في الماء (الكاتيكول catéchiques)

تكون هذه المركبات معقدة ذات تركيب غير معروف جيدا، تعطي مع المحاليل الحمضية المخففة مركبات جد معقدة بدلا من مركبات بسيطة. تكون هذه المركبات نتيجة لبلمرة جزيئات فلافانول3(flavanols3) (catéchine))، وفلافانديول 3،4 (flavanediols3,4) (leucoanthocyanidines).

التركيب الكيميائي للـ catéchines و leucoanthocyanidines تكون كالأتي:

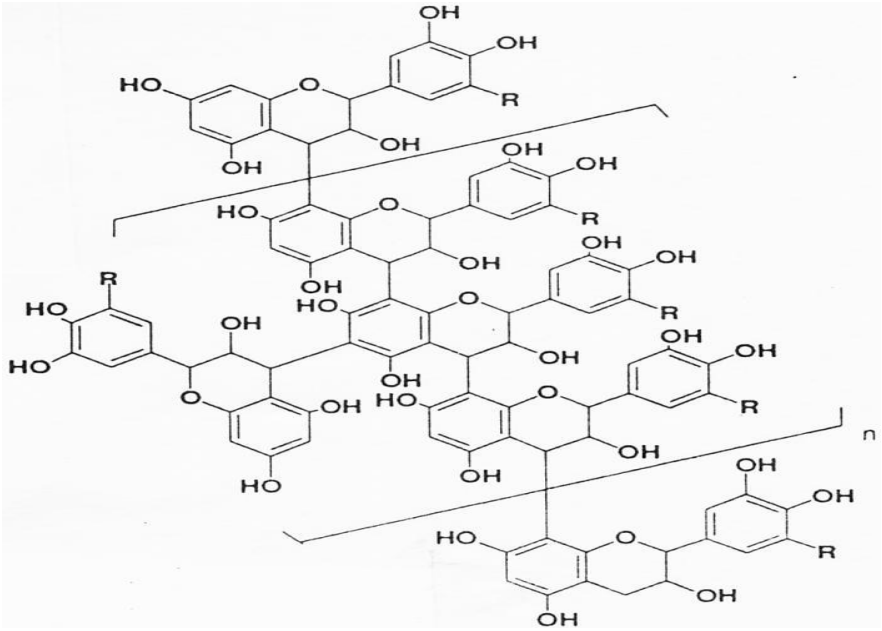


Catéchine



Leucoanthocyanidine

يوضح الشكل3 مثال عن التنينات المكثفة.



Polymère proanthocyanidolique

شكل 3.مثال عن التنينات المكثفة(tanin condensé) (Sereme et al.,2010)

ترتبط الخصائص العامة للتنينات من الناحية الكيميائية بتركيبها الكيميائي. وبالتالي فإنها تعطي كل تفاعلات الفينولات :الذوبان في الماء، التلون بواسطة أملاح الحديد. كذلك تتميز التنينات بدباغة الجلود، وتعود هذه الخاصية إلى إمكانية الإرتباط بالقلويدات، الجيلاتين وبروتينات أخرى، كذلك مركبات متنوعة مثل السيليلوز والبكتين. يتشكل أثناء الدباغة إندماج بين التنينات وكولاجين الجلد الذي يعطي الجلد المدبوغ. هذا الإرتباط يرجع إلى ثلاث روابط: روابط هيدروجينية، روابط أيونية وروابط تكافؤية وهذه الأخيرة تعطي ثبات لهذا الإرتباط.

يستعمل النبات كمصدر للتنينات من الناحية الإقتصادية إلا إذا احتوى على 10% من المستخلص (Doat,1978 ; Saxena et al.,2013).

عند إضافة محلول كلوريد الحديديك إلى المحلول الذي يوجد به التنينات فإنه يعطي لونا أزرق مسود في حالة التنينات المشتقة من البيروقاليك ولون أخضر بني في حالة ما إذا كانت مشتقة من الكاتيكول (حمزة،2006).

وقد أكد Sereme et al. (2008) في دراستهم أن التنينات تلعب دور مهم بين المستقلبات، حيث تمنح هذه المواد النباتات التي تحتويها خصائص علاجية ضد أمراض الجهاز الهضمي (عسر الهضم، الإسهال، القرحة والبواسير)، إرتفاع ضغط الدم، أمراض الجهاز التناسلي والأمراض الجلدية. تعتبرأيضا مضادة

للإلتهاب،مضادة للأكسدة ،مطهرة ومفيدة في تخثر الدم، كما ذكرت الدراسات مؤخرا أن للتنينات نشاطية مضادة للسرطان ومضادة للـ HIV أي لمرض السيدا (AIDS)

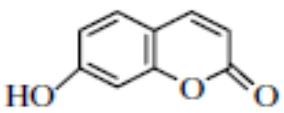
(Gurib-Fakim ,2006 ; Saxena et al.,2013)

حسب دراسة .Sereme et al (2010) استنتج أن أنواع النباتات الغنية بالتنينات تتشابه كثيرا من الناحية التشريحية، حيث يتم تصنيع التنينات في الخلايا المعزولة في الأنسجة الادخارية، وأيضا من طرف الخلايا الغدية التي تحيط بالقنوات الموجودة خاصة في اللحاء الإبتدائي (phloèmeI)، وأحيانا في أنسجة أخرى. وتجدرالإشارة إلى أن الدراسات النسيجية والخلوية لتحديد أماكن التصنيع الحيوي للتنينات تكون مختلفة حسب أنواع النباتات وتقنيات الدراسة المستعملة، وهذا ما لايسمح بتوضيح هذه الظاهرة بصفة كاملة.

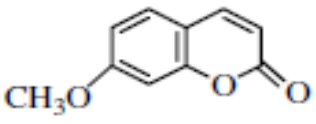
3-5-الكومارين Coumarine

يرجع اسم الكومارين إلى «coumarou»، هو الاسم المحلي لفول شجرة التونكا.*Dipteryx odorata* Willd من العائلة البقولية (Fabaceae)، من أين عزلت مادة الكومارين نفسها في1820(Bruneton,1999). الكومارين موزعة على نطاق واسع في المملكة النباتية، تعتبر مواد طبيعية ،عضوية وعطرية تتكون من 9 ذرات من الكربون تتميز بنواة 2H-1- Benzopyrane-2-one (Mpondo et al.,2015).

أسفرت دراسة .Mpondo et al (2015) أن النباتات الغنية بالكومارين لها رائحة تذكرنا بالفانيليا وهذه النباتات تنتمي إلى عدة عائلات أهمها خيمية (Apiaceae)، البقولية (Fabaceae) وسذابية (Rutaceae). للكومارين وظائف بيئية عديدة وتعطي للنباتات التي تصنعها ميزة التكيف. كما لهذه المركبات القدرة على منع أكسدة الليبيدات الغشائية وإلتقاط الجذور الهيدروكسيلية، ومافوق التأكسدية والبيروكسيل. تملك الكومارين خصائص خافضة للحرارة، مسكنة،مهدئة، مضادة للإنتفاخ ومضادة للتشنج، كما لديها القدرة على طرد غازات الأمعاء التي تؤدي إلى نقص في انتفاخ البطن. كما لديها تأثير مضاد للألم (Mpondo et al.,2015). من مشتقات الكومارين الشائعة umbelliférone، herniarine، esculétine، Scopoletin ، fraxine وChicorée. البعض من الكومارين تصنع من طرف النبات في حالة الإصابة بالبكتيريا والفطريات، نذكر كمثال Scopoletin وهو نوع من الكومارين الذي يصنعه نبات البطاطا (Solanum tuberosum) عند الإصابة بالفطريات(Gurib-Fakim ,2006) .



Umbelliferone

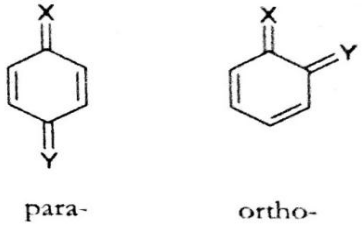


Herniarine

4-5- الكينونات les Quinones

كلمة كينون (Quinone) تمثل مجموعة من المركبات لها نفس القاعدة: حلقة سداسية تشمل رابطتين مزدوجتين خارج الحلقة شكل(4):

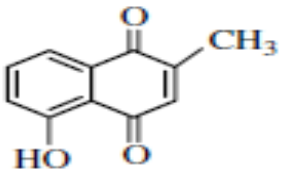
X	Y	Nom
O	O	Quinone
O	CR2	Quinmethane
CR2	CR2	Quinodiméthane
O	NR	Quinone imine
NR2	NR	Quinone diimine



شكل4. مختلف أنواع الكينون (Rمجموعة الذرات مهما يكون نوعها)

(Bearnais-Barbry ,2001)

نستطيع تمييز عدة مركبات من الكينون حسب طبيعة البدائل X، Yالموضحة في شكل 4، كل واحد من هذه المجموعات مكون من تحت مجموعات :الـ Ortho- (*-o*)، para- (*-p*). كلمة الكينون تطلق في نفس الوقت على مجموع هذه المركبات، وأيضا على المركبات التي لديها مجموعة كربونيل موجودة بالرابطة المزدوجة الخارجية للحلقة. الخاصية الأساسية للكينونات هي الطبيعة المؤكسدة وهي قادرة على إكتساب إلكترونين وبروتونين لتشكيل على التوالي anionique،semiquinone أومتعادل وhydroquinone (Bearnais-Barbry ,2001)، التحول بين ثنائي الفينول (diphenol) أو(هيدروكينون hydroquinone) وثنائي الكيتون (diketone) (أو الكينون) يحدث بسهولة عن طريق تفاعلات الأكسدة والإرجاع (Cowan,1999) .الكينونات تكون طبيعيا إما بنزوكينون (benzoquinones) أو مركب مكثف من الحلقات العطرية مثل naphtalène (naphtoquinones)، anthracène (antraquinones)، 1,2-benzanthacene (anthracyclinones)، naphthodianthrene (naphtodianthrone)، pyrelene، phénanthrène و abiétane-quinone. مع العلم أن Naphtoquinones وanthraquinones لها أهمية طبية. يعتبر الكينون (Lawsone) المعزول من الحناء (*Lawsonia inermis* L.) كمبيد فطري قوي ومعروف في صبغ الشعر، Plumbagineالمعزول من أنواع نبات Plumbago له خصائص مضادة للبكتيريا و سامة للخلايا (Gurib-Fakim, 2006). كذلك هذه المركبات مسؤولة عن ظهور اللون البني عند قطع الفواكه والخضر، كما تعمل هذه المركبات كوسيط في عملية تصنيع الميلانين في الجلد البشري (Cowan, 1999).



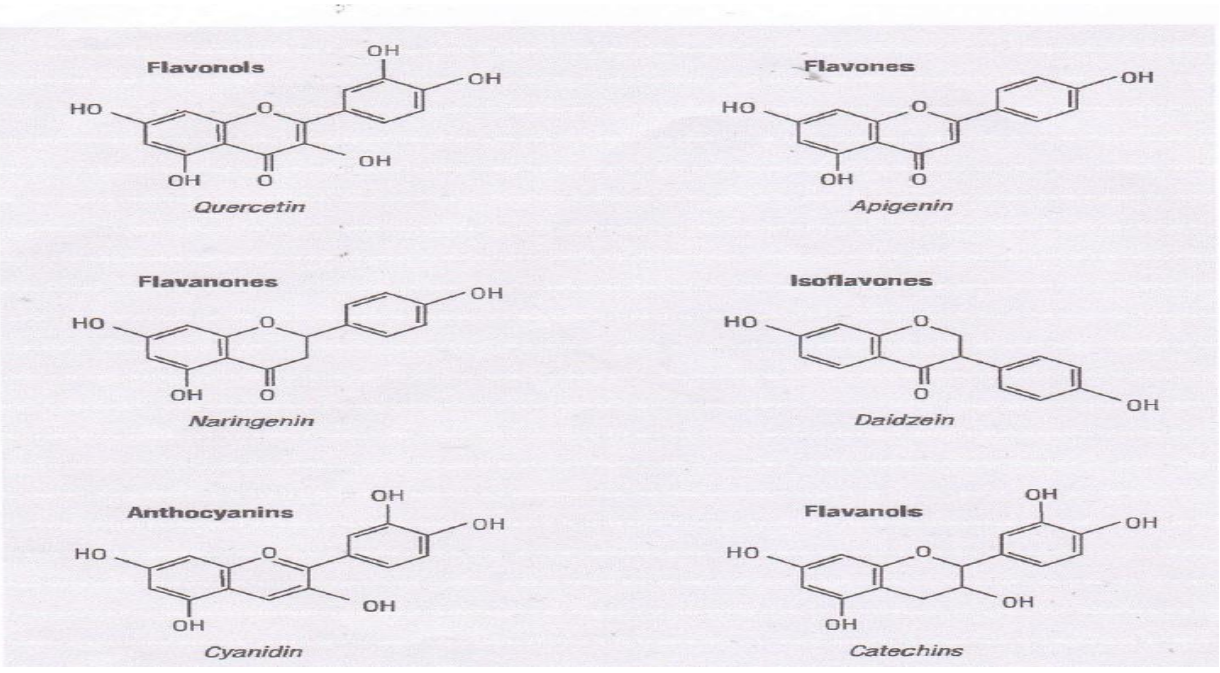
Plumbagin

5-5 الفلافونوييدات

الفلافونويدات هي مستقلبات ثانوية للنباتات لديه بنية عديدات الفينول (Ghasemzadeh and ,2011 Ghasemzadeh)، الفلافونوييدات هي المركبات المسؤولة عن لون الأزهار، الثمار وفي بعض الأحيان الأوراق(وجودالأنتوسيانينanthocyanines). يرجع هذا الاسم إلى الكلمة اللاتينية flavus والتي تعني الأصفر، الفلافونويدات تحمي النباتات من تأثير الأشعة فوق البنفسجية، كما تلعب دور في التلقيح بجذب الحشرات بواسطة ألوانها(Gurib-Fakim ,2006).

يتم تصنيعها بطريقة عديد البروبانويد و تعتبر جزيئة الفينيل ألانين هي مركب البداية. لديهاتأثير بيولوجي متنوع، كل الفلافونوييدات لديها بنية C6-C3-C6، تتكون من حلقتين عطريتين بـ C6 (BوA) ،وحلقة غيرمتجانسة (C) التي تتكون من ذرة أكسجين واحدة (شكل 1). صنفت الفلافونوييدات إلى 6 تحت مجموعات (شكل5) (Archivo et al.,2007).

1- فلافون (Flavones) مثل luteonin، apigenin، tangeritin.
2- فلافونول(Flavonols) مثل Quercetine ، kaemferol، myricetin، isorhamnetin، pachypodol.
3- فلافانون(Flavanones) مثل hesteretin، naringenin، eriodictyol
4- فلافان-3- أول(Flavan-3-ols): catechins وepicatechins
5- إيزوفلافون مثل genistein ، daidzein، glycitein
6- مركبات أنتوسيانيدين مثل cyanidin، delphinidin، malvidin، pelargonidin، peonidin، petunidin



شكل5. البنية الكيميائية للفلافونوييدات (Archivo et al.,2007)

كما تشكل مركبات الفلافونويد مجموعة واسعة من المواد التي تلعب دورا مهما في حماية النظم البيولوجية ضد الآثار الضارة الناجمة عن عمليات أكسدة الجزيئات، مثل الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والحمض النووي(ADN) (Ghasemzadeh and Ghasemzadeh ,2011).

في الآونة الأخيرة لفتت الفلافونوييدات الانتباه وهذا يرجع إلى اكتشاف نشاطيتها الصيدلانية كما تعتبرمن المركبات الأساسية الموجودة في النبات والمفيدة صحيا. مثل المركبات الفينولولية، تستطيع هذه المركبات أن تعمل كمضادات قوية للأكسدة، كما يكون لديها نشاطية مضادة للالتهاب، مسكنة، مضادة للأورام، مضادة لفيروس السيدا HIV، مضادة للإسهال، مضادة للفطريات، مضادة لتسمم الكبد، مضادة لتحلل الدهون، مضادة لتقرح المعدة، مضادة للحساسية، مضاد لتخثرالدم، كما لديها القدرة على استخلاب المعادن. نذكر من بين الفلافونويدات النشطة بيولوجيا الهسبيريدين (hesperidine) و الروتين(rutine) تستعمل ضد ضعف الشعيرات الدموية، و الكرستين (quercetine) لنشاطيته ضد الإسهال (Gurib-Fakim ,2006 ;Tapas et al.,2008).

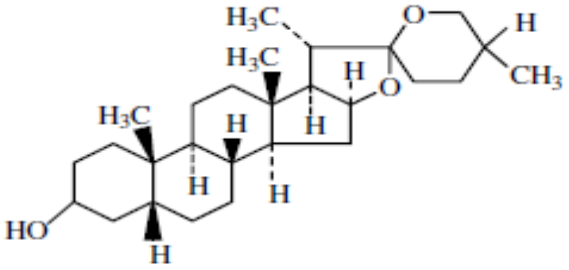
6-الصابونينsaponine

تشتق كلمة «saponine» من الكلمة اليونانية sapo، والتي تعني صابون (savon)، حيث تشكل جزيئات الصابونين مع الماء محلول رغوي (Bruneton, 2009).

الصابونين هي مجموعة متنوعة من المركبات الطبيعية الموجودة في مجموعة واسعة من النباتات، المواد الغذائية و بعض الحيوانات البحرية. يتم تصنيفها إلى فئتين الصبونينات الستيروييدية(saponines stéroïdiens) والصابونينات ثلاثية التربنوييد(saponines triterpénoïdes) حسب طبيعة الجزء غير السكري(aglycone) (Sparg et al., 2004)، سمية هذه المواد عند أخذها عن طريق الفم ضعيفة عند الثدييات، لكنها جد سامة عند الحيوانات ذات الدم البارد خاصة السمك لأن العديد من الصابونين لها خصائص انحلال الدم (Dini et al., 2001; Gurib-Fakim ,2006).

يعرف الصابونين بأنه مركب طافي طبيعي. إضافة إلى هذه الخاصية الفيزيائية، تظهرلديه مجموعة متنوعة من الخصائص البيولوجية قد تمت دراستها لإثبات فعالية الطب التقليدي بالنباتات، كما تستعمل الصابونينات في الأغذية ومواد التجميل (Waller et yamazaki,1996).

أظهرت مختلف الصابونينات نشاطية ضد أمراض ذات مصدر بكتيري، فيروسي، فطري وسرطاني وهي أمراض مزمنة وعلاجها باهض الثمن(Ben hadda et al.,2011) ، وهكذا أصبحت النباتات التي تحتوي على الصابونين محور الأبحاث في جميع أنحاء العالم(Shuang-Li et al., 2012) . نذكر بعض الأمثلة على الصابونين الستيروييدية مثل diosgenin لنبات *Dioscorea*، hecogenin لنبات *Agave* و smilagenin من نبات *Smilax*، أما بالنسبة لصابونينات ثلاثية التربنوييد فنجد ginsenosides الذي يوجد بنبات الجينستغginseng والأنواع المستخرجة من نبات liquorice (Gurib-Fakim ,2006).



Smilagin

7-التربنوييد Terpénoide

تمثل التربنوييدات مجموعة كبيرة من المركبات الطبيعية و العديد من المنتجات المثيرة للإهتمام وتستعمل على نطاق واسع في المجال الصناعي كصناعة النكهات، العطور، التوابل ومستحضرات التجميل. العديد من التربنوييد لها نشاطية بيولوجية حيث تستخدم أيضا لأغراض طبية (Singh et Sharma,2015). تسمى التربنوييدات أيضا«isoprénoïdes» وهي من المستقلبات الثانوية التي تنتج في معظم الكائنات الحية وخاصة النباتات. كما تمثل واحدة من أكبر مجموعات المركبات الطبيعية وتضم أكثر من 40.000 مركب (Thoppil et Bishayee, 2011).

معظم التربنوييدات ذات أصل نباتي، لكنها تصنع أيضا من طرف كائنات حية أخرى مثل البكتيريا والخمائر كجزء من عملية الإستقلاب الأولي والثانوي، كما تتشكل التربنوييد من وحدتين بنائيتين من خمس ذرات كربون أي وحدات الإيزوبرنوييد«isoprénoïdes». حسب عدد الوحدات البنائية، تصنف التربنوييدات إلى عدة فئات منها التربينات الأحادية C_{10} (monoterpènes) مثل الكارفون(carvone)، جيرانيول (géraniol)، د-ليمونان(*d*- limonene)، كحول البيريليك(alcool périllylique) والتربينات ثنائية C_{20} (diterpènes) مثل الريتنول (retinol) و حمض ترانس – رتنوييك(l'acide trans-rétinoïque)، التربينات ثلاثيةC_{30} (triterpènes) مثل حمض بيتلينيك (acide bétulinique)، لبيول(le lupéol)، حمض أوليانيك (l'acide oléanique) وحمض أورزليك (l'acide ursolique)، والتربينات الرباعية C_{40} tétraterpènes مثل α-كاروتين (α-carotene)، β-كاروتين (β-carotene)، اللوتيين (la lutéine)، والليكوبان (lycopène)، كما توجد أيضاC_5 hémiterpènes، C_{15}sesquiterpènes، sesterpènes، Polyterpènes> C_{40}،C_{25} (Rabi et Bishayee,2009 ; Singh et Sharma,2015).

فئة التربينات الثلاثية (triterpènes) تحتوي على التربنوييدات الثلاثية(triterpénoïdes) وستيروئيدات (stéroïdes) التي يمكن تصنيعها بنفس طريقة الصابونين بكمية كافية في النبات (Sparg et al., 2004).

قد ثبت أن التربنوييدات مهمة في الوقاية وعلاج مختلف الأمراض بما فيها مرض السرطان وأيضا تكون مضادة للميكروبات، مضادة للفطريات، مضادة للفيروسات، مضادة للطفيليات، مضادة للحساسية، مضاد للألم، مضاد للإلتهاب، خافض للسكر في الدم، ولهم خصائص مناعية (Shah et al.,2009 ; Rabi et Bishayee,2009)، كما تكون لهذه المركبات خصائص مضادة للحشرات وبذلك يمكن أن نستعملها كمواد واقية عند تخزين المنتجات الزراعية(Theis et Lerdau,2003).

يظهرعدد كبيرمن التربنوييدات سمية خلوية اتجاه مختلف الخلايا السرطانية وتعتبركمواد وقائية ضد مرض السرطان، وقد أثبت هذه النظرية كل من Thoppil et Bishayee (2011) حيث تشيرالدراسات التي قاما بها مخبريا، أو سريريا إلى أن التربنوييدات هي من المواد الجديدة المرشحة في استراتجية الوقاية الكيميائية والعلاج الكيميائي لمحاربة مرض سرطان الكبد.

1-7-الكاروتنوييد les caroténoïdes

تشكل الكاروتنوييدات مجموعة كبيرة من الأصبغة الذائبة في الدهن من طبيعة تربينوييد، يتراوح لونها بين الأصفر والأحمرالبرتقالي(إمتصاص الضوء يكون بين طول موجة 400 و550 نانومتر)، يتم تصنيعها من طرف النباتات والكائنات الحية الدقيقة التي تقوم بعملية التركيب الضوئي. كما تكون هذه المركبات عرضة لعمليات الأيض والتخزين في جسم حيواني. كما تلتقط الفوتونات الضوئية وتنقل الطاقة إلى الكلوروفيل، زيادة على ذلك فهي تضمن حماية الخلايا ضد جزيئات الأكسجين المضرة الناتجة عن الإشعاع. تكون واسعة الإنتشار حيث يتم الحصول عليها عن طريق الأغذية من طرف العديد من الأنواع الحيوانية كالحشرات، القشريات، الأسماك والثدييات (Choubert,1986 ;Nicol et Maudet,2000).

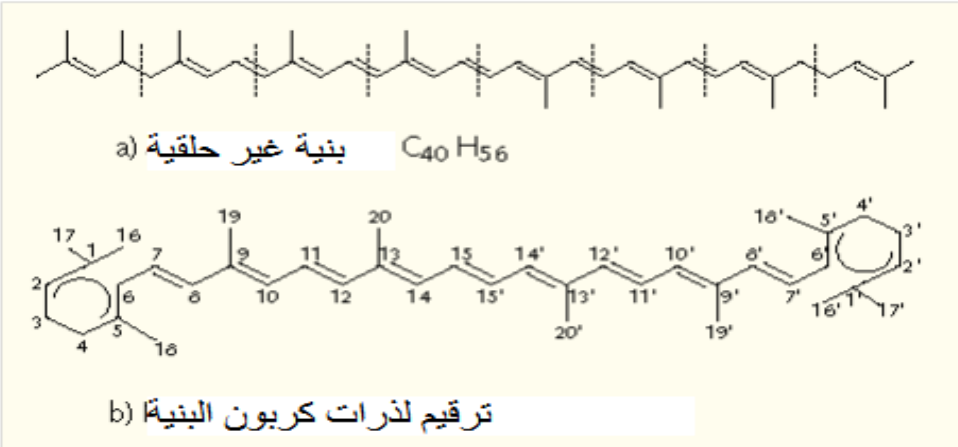
الكاروتنوييدات واسعة الإنتشار في الخضر والفواكه، كيميائيا تنقسم الكاروتونوييدات إلى فئتين كبيرتين. تتضمن الفئة الأولى الكاروتنوييدات الهيدروكربونية غير المشبعة بصفة عالية مثل الليكوبان، α-كاروتين ، β-كاروتين، γ-كاروتين، ε-كاروتين، لاتحتوي على الأكسجين، وعادة ما تكون برتقالية وحمراء اللون.

أما كاروتنوييدات الفئة الثانية هي الكزانتوفيل(les xanthophylles)مثل β-كريبتوكزنتين (β-cryptoxanthine)، لوتيين(lutéine) وزياكزنتين (zéaxanthine)، و هي عبارة عن مشتقات أكسيجينية، حيث تحتوي على واحدة أو أكثر من بدائل المجموعة الأكسجينية في مواقع خاصة على نهاية الحلقات.

تشترك هاتين الفئتين من الكاروتنوييدات في البنية مثل متعدد إيزوبرونويد(polyisoprénoïde) وسلاسل من الروابط المزدوجة المترافقة والمتسلسلة (Shi et Maguer,2000).

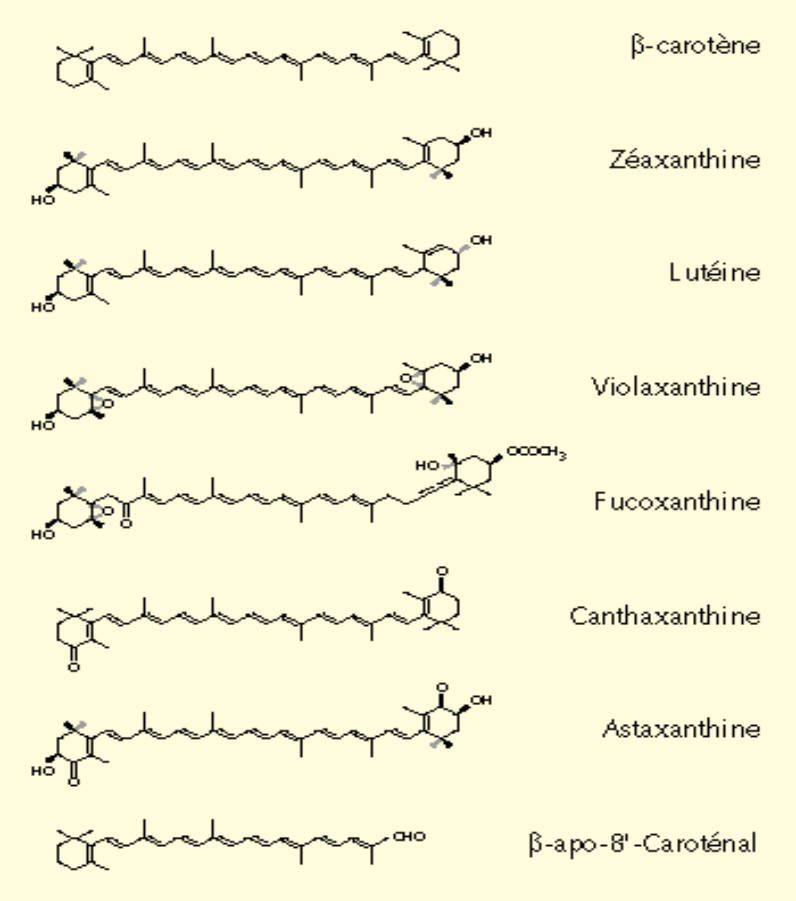
حاليا تم تحديد 600 كاروتونييد، من بينها حوالي ستون تمتلك قابلية التحول إلى الفيتامين أ (provitaminique A)، خاصة ألفا، بيتا والقاما كاروتين وكذلك كريبتوكزنتين(cryptoxanthine).

عند الإنسان، 34 شكل من الكاروتنوييد تم عزلها من الأنسجة، البلازما، والإفرازات(شكل7). كيميائيا تشتق من تسلسل 8 وحدات إيزوبرينيك التي تنتظم في هيدروكربير غير حلقي ($C_{40}H_{50}$) الموضح في الشكل(6) (Nicol et Maudet,2000).



شكل6. هيدروكربير غير حلقي ($C_{40}H_{50}$) مكونة من 8 وحدات إيزوبران(isopréniques)

(Nicol et Maudet,2000)



شكل7. أمثلة عن بعض الكاروتنوييدات الطبيعية (Nicol et Maudet,2000)

دلت دراسات عديدة على أن هذه الجزيئات تمتلك خصائص مفيدة للصحة، حيث إضافة إلى دور الكاروتنوييدات كمحفزات لإنتاج الفيتامين أ، فإن لها دورفي الوقاية من مرض الضمور البقعي للعين نتيجة التقدم في السن عن طريق اللوتيين(lutéine)، أو الوقاية من مرض سرطان البروستات عن طريق الليكوبان(lycopène)(Maiani et al., 2009) .

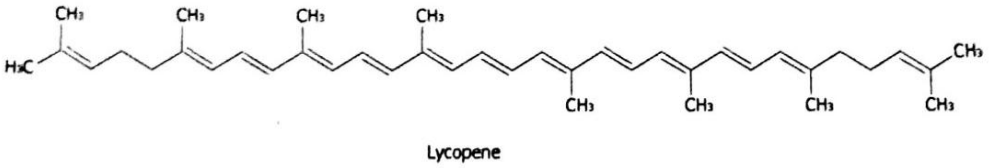
7-2-الليكوبين

الليكوبين هو مركب طبيعي يوجد بكميات كبيرة في الفواكه الحمراء، خاصة الطماطم. حسب Allen et al. (2002) لا يستطيع جسم الإنسان أن يصنع الليكوبين. يعتبر الليكوبين صبغة طبيعية تصنع بشكل خاص من طرف النباتات والكائنات الحية الدقيقة، وهوعبارة عن كاروتنويد متعدد الهيدروكربون غير حلقي ذو سلسلة مفتوحة غير مشبعة، يحتوي على 13 رابطة مزدوجة منها 11رابطة مزدوجة مترافقة مرتبة في سلسلة خطية، صيغته الكيميائية $C_{40}H_{56}$ (شكل8)، في بعض الأحيان يغطى لون الليكوبان بواسطة الأصبغة الخضراء للكلوروفيل (مثل الخضر ذات اللون الأخضر والأوراق).

في العديد من الحالات إنخفاض محتوى الكلوروفيل في النباتات الناضجة، يترك الليكوبان وكاروتنويدات أخرى تكون مسؤولة عن الألوان الزاهية لمعظم الفواكه (الأناناس، البرتقال، الليمون، الفراولة،الطماطم، العنب)، وعدة أزهارمثل النرجس. كما تساهم الكاروتنويدات أيضا في ألوان بعض الطيور(الفلامنغو والكناري)، الحشرات والحيوانات البحرية(الجمبري، سرطان البحر والسلمون). وزنه الجزيئي 536,85 غ/مول، نقطة الذوبان 172-175م°، وبما أن الليكوبان يذوب في الدهن، فإنه دائما يستخلص بالمذيبات العضوية مثل الكلوروفورم، هكسان، أسيتون، بنزان، الكربون ثنائي الكبريت، أثير البترول ولا تذوب في الماء ،الإيثانول والميثانول، كما تكون حساسة للضوء،الأكسجين، درجة الحرارة العالية والأحماض (Shi et Maguer,2000).

ذكر Levy et al. (1995) أن الليكوبين قادر على تثبيط سرطان الرحم، سرطان الثدي، سرطان الرئة في مزارع الخلايا بنشاطية أكبر من نشاطية α و β-كاروتين. كما أنه قادر على تثبيط بيروكسيد الهيدروجين، بيروكسيد النيتروجين (Bohm et al., 1995).

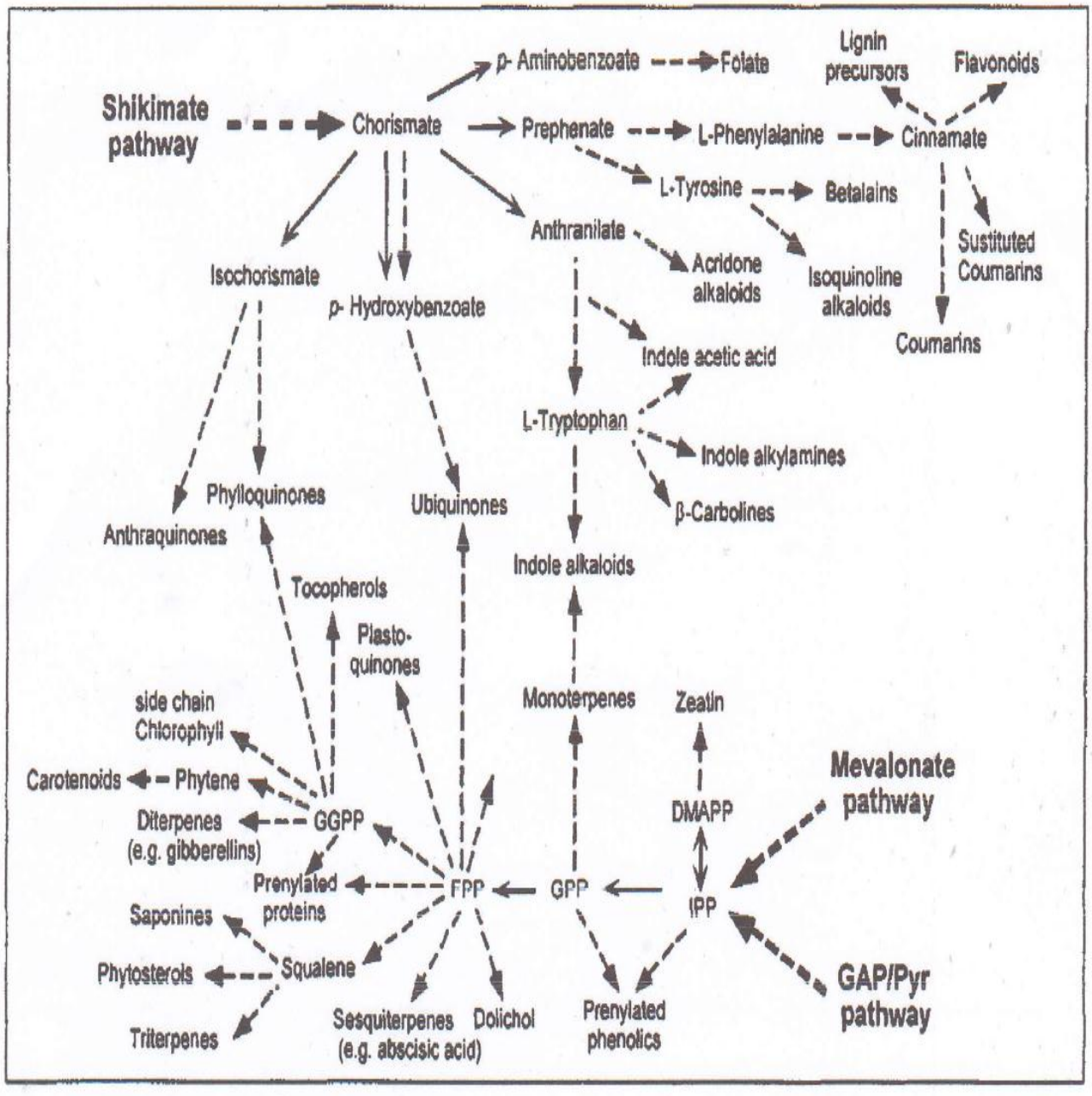
كما أشار Matulka et al. (2004) أن الدراسات التجريبية والإحصائية تدل أن استهلاك منتجات الطماطم التي تحتوي على كمية عالية من الليكوبان يرتبط مع انخفاض خطر الاصابة بالسرطان، وقد تعود تأثيراته الواقية إلى قدرته المضادة للأكسدة.



شكل8. البنية الكيميائية لليكوبان (lycopène) (Thoppil et Bishayee,2011)

III - طرق تصنيع المستقلبات الثانوية

المستقلبات الثانوية تنتج عموما عن طريق ثلاث مسارات للتصنيع الحيوي وهي كالآتي: مسارشيكيمات (voie de shikimate)، مسار ميفالونات(mevalonate) ومسار بيريفات (pyruvate) وهي موضحة في شكل(9) (Verpoote et Alfermann,2000).



شكل9. طرق تصنيع المستقلبات الثانوية (Verpoote et Alfermann,2000)

IV- النشاطية البيولوجية

IV-1-النشاطية ضد ميكروبية

أصبح العلاج بالأعشاب بشكل متزايد المحور الأساسي للعديد من الأبحاث مع الغرض من استخدامها للعناية بالصحة. لذلك أين يكون نقص في الأدوية الحديثة، أو نقص في الموارد المالية، فإن النباتات الطبية تشكل مصدر طبيعي هام. وقد بينت الدراسات أن الاستعمال التقليدي للنباتات الطبية يمكن تفسيره بوجود مركبات علاجية عند هذه النباتات(LE Grand,1989).

تستعمل الأعشاب الطبية بشكل واسع في الأمراض الميكروبية نظرا لكونها مصدر غني بالمركبات ذات النشاطية ضد الميكروبية وتكون بأقل تكلفة. يتم الاستخلاص من مختلف أجزاء النبات مثل البذور، الثمار،الجذور، السيقان، الأوراق وحتى من النبات بأكمله باستعمال مختلف المذيبات مثل الإيثانول، الميثانول، الكلوروفورم، الأسيتون، الإيثربترول، الكحول وأثيل أسيتات، ويتم اختبار هذه المستخلصات بطريقة الانتشار في وسط صلب ضد البكتيريا الموجبة والسالبة لغرام والفطريات لتقييم نشاطيتها الضد ميكروبية. تحتوي معظم النباتات على مختلف المركبات ذات الخصائص المضادة للميكروبات من أجل الحماية من العوامل المضرة خاصة الكائنات الحية الدقيقة. مع تطور تقنيات كيمياء النبات، مختلف المركبات الأساسية النشطة للعديد من النباتات الطبية قد تم عزلها وأدرجت كأدوية ذات قيمة في أنظمة الطب الحديثة (Hemalatha et al.,2013). أهم هذه المركبات النشطة بيولوجيا هي القلويدات، الفلافونوييدات، التنينات والمركبات الفينولية (Purkayastha et Dahiya,2012).

تعتبر مواقع وعدد مجاميع الهيدروكسيل الموجودة على مجموعة الفينول هي التي لها علاقة بسمية هذه المركبات على الكائنات الحية الدقيقة، حيث كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل تزداد السمية. بالإضافة إلى أن بعض الباحثين وجدوا أنه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل عند الفينولات كلما كان لديها أثر تثبيطي أكثر. كما يعتقد أن الآلية المسؤولة عن سمية الفينولات للكائنات الحية الدقيقة هي تثبيط الأنزيمات بواسطة المركبات المؤكسدة، إمكانية التفاعل مع المجاميع الهيدروكبريتية أو من خلال التفاعلات الكثيرة غير النوعية مع البروتينات. تصنف المركبات الفينولية التي تمتلك في C_3 رابطة جانبية بمستوى أكسدة ضعيف ولا تمتلك ذرة أكسجين على أنها زيوت أساسية ويذكر دائما أنها مضادة للميكروبات كذلك، مثل الأجينول (eugenol) الموجود في الزيت الأساسي للقرنفل الذي يعتبر مثبط للبكتيريا والفطريات. كل من نبات الزعيترة(le thym) ونبات الشيح الطرخوني (*Artemisia dracunculus* أو Estragan)يمتلكان حمض الكافييك الذي يكون فعال ضد الفيروسات، الفطريات والبكتيريا. كذلك الكاتشول (catéchol) والبيروقالول (pyrogallol) تكون سامة للكائنات الدقيقة.

تعرف الكينونات بأنها قادرة على تكوين معقدات غير عكسية مع الأحماض الأمينية في البروتينات، التي تؤدي بالبروتين إلى فقدان نشاطيته ووظيفته، ولهذا السبب النشاطية المضادة للبكتيريا للكينونات تكون

كبيرة. المواقع المستهدفة في الخلية الميكروبية هي الأديزين، عديدات بيبتيد الجداروالأنزيمات المرتبطة بالغشاء. كذلك الكومارين تثبط الـ *Candida albicans*، أما فيتوألكزين(les phytoalexines) المشتقة من الكومارين والمنتجة في الجزر كاستجابة لإصابة فطرية يفترض أن لديها نشاطية ضد ميكروبية. أحماض هيدروسيناميك hydroxycinnamiques (Les acide) المرتبطة بالكومارين يكون لديها تأثير مثبط للبكتيريا غرام موجب. كما يمكن للتنينات أو مواد الدباغة أن تكون سامة للفطريات الخيطية، الخمائروالبكتيريا، وقد ترجع نشاطيتها ضد ميكروبية (كما تم وصفها عند الكينونات) إلى قدرتها على تثبيط الأدزين الميكروبية، الأنزيمات،بروتينات النقل في خلايا المحفظة،الخ...، كما أنها تشكل معقد مع السكريات المتعددة. أيضا تكون للتربينات أوالتربينوييدات نشاطية ضد البكتيريا ،الفطريات والفيروسات، لكن آلية تأثير التربينات ليست مفهومة بشكل كامل، ويفترض أن تكون لها دخل في حدوث اضطراب على مستوى الغشاء بواسطة المركبات المحبة للدهن. في حين فإن للقلويدات تأثير قاتل للميكروبات، على سبيل المثال القلويدات المعزولة من نباتات العائلة الشقيقية Ranunculaceae تكون لديها عادة خصائص مضادة للميكروبات(Cowan,1999).

IV-2- النشاطية المضادة للأكسدة

تنتج الجذور الحرة عن تفاعلات الأكسدة الضرورية للحياة، تقريبا 4% من هذه الجذورالحرة المصنعة من طرف الجسم و المتهمة بأنها سبب كل الأمراض تعتبر ضرورية للحياة، حيث أنها تدعم الجهاز المناعي، تحفزعملية التئام الجراح ،تصنيع مختلف الهرمونات....إلخ، كل الأنشطة العضوية تولد الجذور الحرة، لكن الإفراط في إنتاج هذه الجذور الحرة يكون ضار، إذن للجذور الحرة دور ضروري في العمل الجيد لجسم الإنسان إذا كانت بكميات قليلة، لكن إذا كانت بكميات كبيرة فإنها تصبح ضارة (Genest,2013).

أصبحت الآثار الضارة للإجهاد التأكسدي على صحة الإنسان مسألة خطيرة. حسب المنظمة العالمية للصحة (WHO) تشيرالتقديرات إلى أن 80% من سكان الأرض تعتمد على الطب التقليدي من أجل الرعاية الصحية ويعتمد هذا العلاج على استخدام مستخلصات النباتات ومركباتها النشطة (Winston, 1999).

IV-2-1-الأنواع الأكسجينية النشطة

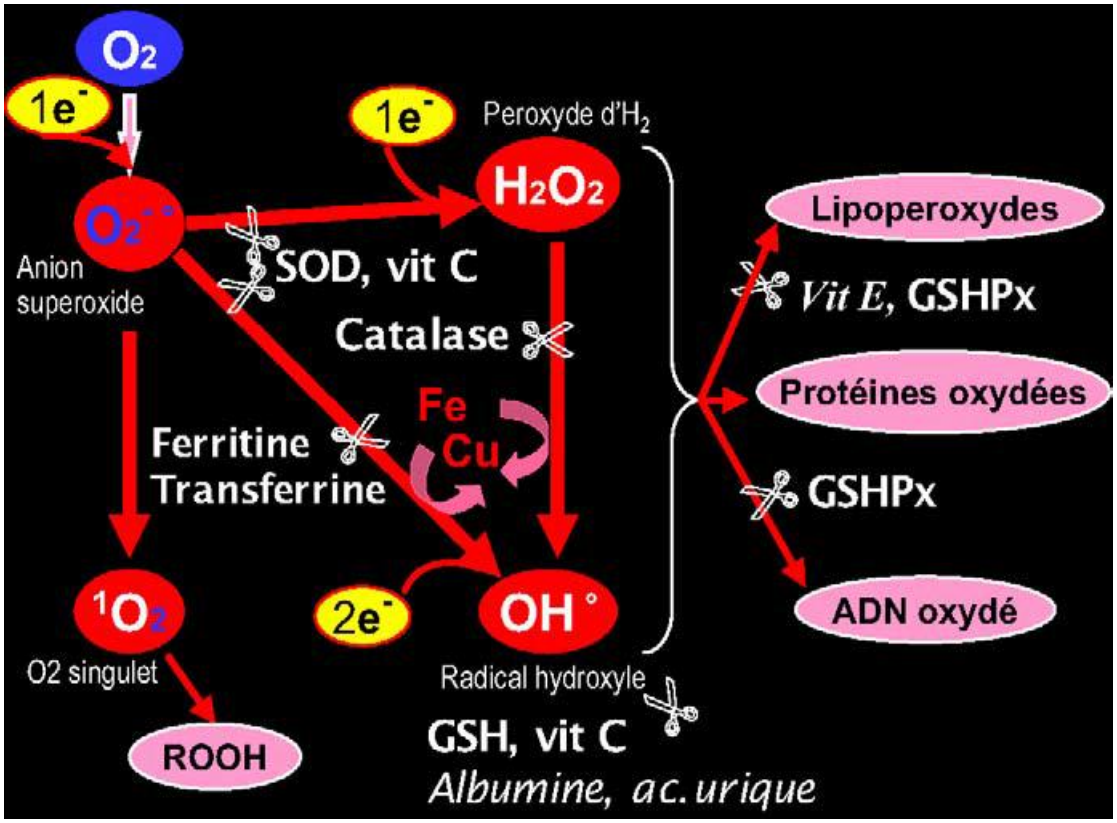
السلسلة التنفسية للميتوكندري، التي عن طريقها تحصل الكائنات الهوائية على طاقتها، تلعب دور أساسي في الخلية بإقتران أكسدة مرافقات الأنزيم الناقلة للهيدروجين أو الإلكترونات مع فسفرة الـ ADP (أدينوزين ثنائي الفوسفات) إلى ATP (أدينوزين ثلاثي الفوسفات). لهذه النشاطية الخاصة بالميتوكندري نتيجتين متعاكستين. من جهة الميتوكندري توفر للخلية مصدر مهم للطاقة بما أن 36 جزيئة ATP ذات جهد طاقوي عالي يتم إنتاجها خلال إرجاع جزيئة الأكسجين. و لكن من جهة أخرى في الشروط الفيزيولوجية، حوالي 0,4 حتى 4% من الإلكترونات التي تتحرر و تتفاعل مباشرة مع الأكسجين المنحل

في السيتوبلازم تؤدي إلى انتاج الأنواع الأكسجينية الحرة (EOAأوROS) هذه الأخيرة تكون إما عبارة عن الجذور الحرة مثل أيون فوق الأكسيد ($O_2^{\bullet-}$)أو جذر الهيدروكسيل ($OH^{\bullet}$)، أو تكون عبارة عن جزيئات مثل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) أو الأكسجين المفرد($^1O_2$)،وفي هذه التفاعل الكيميائي الخاص تلعب Fe^{2+} وCu^{2+} دورالمحفزات في عملية تشكيل جذر الهيدروكسيل (Haleng et al., 2007).

حسب Krishnaiah et al. (2011) تحت ظروف الإجهاد، تنتج أجسامنا الأنواع الأكسيجينية النشطة (ROS) أكثر من مضادات الأكسدة الأنزيمية (مثل سبيرأكسيد ديسمتازSuperoxide dismutase (SOD) ،قليتاتيون بيروكسيد(GPx) (glutathione peroxidase) والكاتالاز(Catalase) ، و مضادات الأكسدة غير الأنزيمية(مثل حمض الأسكوربيك(فيتامين C)، التوكوفيرول (فيتامين E)، القليتاتيون(glutathione)، الكاروتنويد والفلافونويد). اختلال التوازن هذا يؤدي إلى تلف الخلايا ومشاكل صحية. عدم وجود المواد المضادة للأكسدة التي يمكن أن تزيح الجذور الحرة تسهل تطور الأمراض الخطيرة من ضمنها أمراض القلب والأوعية الدموية ، أمراض السرطان، أمراض الأعصاب، مرض الزهايمر والأمراض الالتهابية.

IV-2-2-آليات الدفاع المضادة للأكسدة

من أجل الحماية من الآثار الضارة الناجمة عن الأنواع الأكسجينية الحرة(ROS)، يكون لدى الجسم نظام دفاع مضاد للأكسدة(شكل 10). حيث نميز مصدرين مضادين للأكسدة : الأول يكون عن طريق الأغذية مثل الفواكه والخضر الغنية بالفيتامين C، E، الكاروتينوييدات،الإبيكينون (ubiquinone)، الفلافونويد و الغليتاتيون (glutathion و هو عبارة عن ثلاثي التربين يتكون من حمض الغليتاميك - سيستيين – غليسين) أوحمض ليبوييك(acide lipoïque)، أما المصدرالثاني فيكون داخلي ويتكون من أنزيمات (Catalase، glutathion peroxydase، superoxyde dismutase) والبروتينات (albumine، céruléoplasmine، transferrine، ferritine) وأنظمة إصلاح الأضرارالناتجة عن الأكسدة مثل الأندونكلياز(les endonucléases)، إضافة إلى بعض العناصر المعدنية مثل السيلينسوم، النحاس والزنك التي تعتبر العوامل المساعدة للأنزيمات المضادة للأكسدة (Haleng et al., 2007).



شكل10. إنتاج وإبطال الأنواع الأكسجينية النشطة (Berger, 2006)

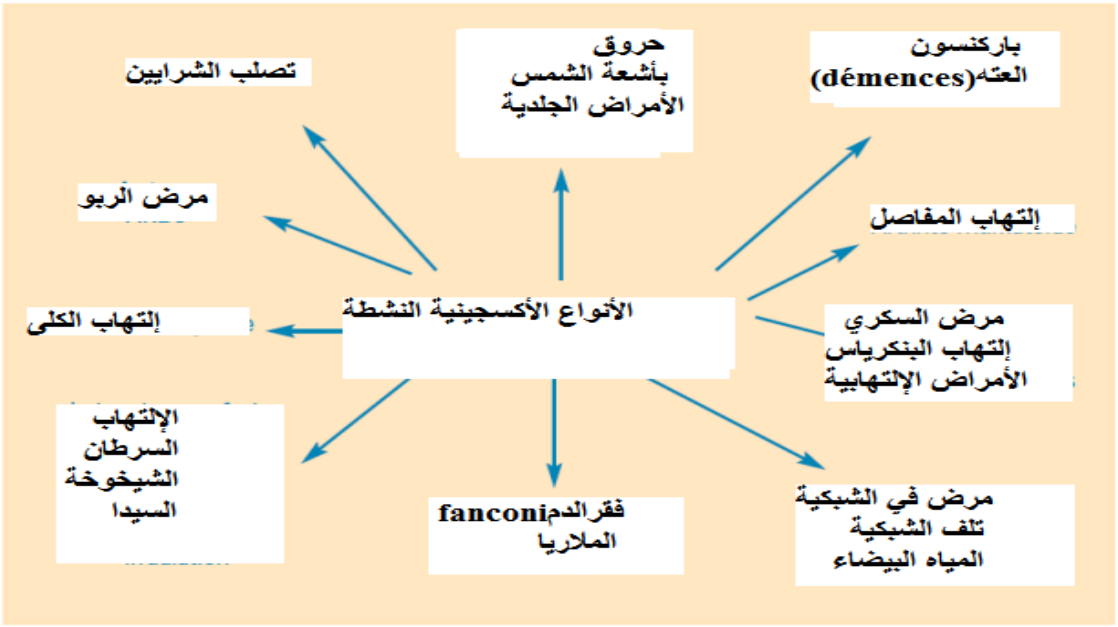
IV-3-2-الإجهاد التأكسدي والعوامل المحدثة له

في الشروط الفيزيولوجية، يتحكم نظام الدفاع الخاص بالجسم بطريقة جيدة في إنتاج الأنواع الأكسجينية النشطة (ROS) حيث يكون هناك توازن بين المواد المضادة للأكسدة والأنواع الأكسجينية النشطة (ROS). لكن ينتج الإجهاد التأكسدي في مرحلة أين الجسم لا يتحكم في الإنتاج المفرط للجذور الأكسجينية السامة مما يؤدي إلى اختلال التوازن الذي كان بين المواد المضادة للأكسدة والأنواع الأكسجينية النشطة (ROS) الأمر الذي يؤدي إلى تلف الخلايا في كثير من الأحيان. يمكن أن يكون للإجهاد التأكسدي مصادر مختلفة قد تكون داخلية تحدث داخل الجسم وخارجية نتيجة للظروف البيئية(جدول1).كما يعتبر الإجهاد التأكسدي من أسباب ظهور أكثر من 200 حالة مرضية البعض منها موضحة في شكل (11)

(Pincemail et al.,2001 ; Haleng et al., 2007)

جدول 1. المصادر الداخلية والخارجية للإجهاد التأكسدي حسب (Haleng et al., 2007)

نمط الحياة	البيئة	الآليات البيوكيميائية
التدخين استهلاك ضعيف للخضر والفواكه الكحول الأدوية حبوب منع الحمل التعرض لأشعة الشمس نشاط رياضي عشوائي	التلوث طبقة الأوزون معدن الأميونت(Amiante) الإشعاعات التعرض للمواد المسببة للسرطان	تخريب عملية نقل الإلكترونات في السلسلة التنفسية للميتوكندري (ischémie-reperfusion) الإلتهاب تخريب وظيفة بطانة الأوعية الدموية الكمية الزائدة من الحديد أكسدة الهيموغلوبين تخليق البروستاجلاندين (Prostaglandines) العمليات الجراحية عمليات الزرع



شكل 11. مختلف الأمراض الناجمة عن الإجهاد التأكسدي(Pincemail et al.,2001)

كما ذكرنا سابقا تعتبر عديدات الفينول من الأنظمة غير الأنزيمية المضادة للأكسدة، وهي تمثل عائلة مهمة من مضادات الأكسدة الموجودة في النباتات. التغذية توفر حوالي 1غ من عديدات الفينول يوميا عن طريق الفواكه أساسا وبدرجة أقل الخضر والنجيليات. تعتبر عموما عوامل ممتازة لإلتقاط الأنواع الأكسيجنية النشطة(ROS) وأيضا عوامل جيدة لإستخلاب المعادن مثل الحديد والنحاس (Haleng et al., 2007) وهذا بفضل بنيتها الكيميائية (Amiot et al.,2009).

يرجع التأثير الوقائي لعديدات الفينول إلى خصائصها المضادة للأكسدة، قادرة على الوقاية من الضرر التأكسدي على مستوى الجزيئات أو الخلايا الذي يؤدي إلى عدة أمراض. من جهة أخرى، تقترح عدة أبحاث أن عديدات الفينول لديها القدرة على تعديل عدة آليات جزيئية وخلوية بواسطة التفاعل مع المستقبلات البروتينية(بروتينات أنزيمية، بروتينات الإشارة بين الخلايا والمستقبلات النووية...)، وذلك يمنح خصائص مضادة لتصلب الشرايين، مضادة للإلتهاب، مضادة لتخثر الدم، مضادة للسرطان وتحمي الأعصاب. عديدات الفينول قادرة أيضا على الحد من عوامل أخرى كخطر الإصابة بأمراض الأوعية والقلب المتسببة في أعراض الأيض(زيادة في نسبة السكر في الدم، زيادة في نسبة الدهون، السمنة و ضغط الدم المرتفع) (Amiot et al.,2009).

أما بالنسبة للفلافونوييدات فإن خاصيتها المعروفة جيدا هي خاصيتها المضادة للأكسدة وقدرتها على التقاط الجذور الحرة: جذور الهيدروكسيل(**OH·**)، الشحنات السالبة فائقة التأكسد ($O_2^{\cdot -}$) والجذور البيروكسيليبيدية (radicaux peroxylipidiques)، حسب المعادلة التالية:

$$\textbf{Flavonoïde (OH) + R}^{\cdot} \rightarrow \textbf{flavonoïde (O}^{\cdot}\textbf{) + RH}$$

تظهر الجذور الحرة في العديد من الحالات مثل:

- نقص الأكسجين(anoxie) : الذي يؤدي إلى انتاج الأنيون فائق التأكسد ($\mathbf{02^{\cdot -}}$)
- الإلتهاب: الذي يوافق إنتاج أنيون فائق التأكسد ($\mathbf{02^{\cdot -}}$) من طرف NADPH – أوكسيداز الغشائية لكريات البيضاء الدموية النشطة، وبواسطة التطافر (dismutation) ينتج جذر الهيدروكسيل شديد التفاعل (**OH·**)
- التأكسد الذاتي لليبيدات :أثناء الإجهاد التأكسدي تهاجم الجذور الحرة الأهداف النشطة مثل البروتينات حيث تخرب المستقبلات الغشائية والأنزيمات، والأحماض النووية(تحدث طفرات مؤذية تؤدي إلى مرض السرطان) والليبيدات خاصة جزيئاتLDL للبطانة الوعائية،وهي المرحلة التي تعتبرالسبب الرئيسي في تصلب الشرايين (Ghedira,2005).

الفلافونوييدات تثبط وتثبت الجذور الحرة بفضل مجموعة الهيدروكسيل (C_3-OH) شديدة التفاعل. حيث تكون قادرة على استخلاب الأيونات المعدنية (المحررة من البروتينات الخاصة بتثبيتها أو نقلها) التي تستطيع أن تقوي من الأثار الضارة بواسطة إنتاج الجذور الهيدروكسيلية(**OH·**). كمواد مضادة للأكسدة، الفلافونوييدات قادرة على تثبيط الإنقسام العشوائي وانتشار الخلايا السرطانية. و قد حددت نشاطيتها كمواد ملتقطة للجذور الحرة، وتقترح الدراسات الحديثة أن الفلافونوييدات تعتبرمن أقوى ملتقطات

الجذرأول أكسيد النيتروجين(• NO)(Le monoxyde d'azote)، هذا الأخير يصنع من طرف العديد من أنواع الخلايا، خاصة الخلايا البطانية والخلايا البلعمية، وأيضا تحرير NO عن طريق نشاطية أنزيم NO synthase تكون مهمة في التحكم في اتساع الأوعية الدموية (Ghedira,2005).

من جهة أخرى، استخدام النباتات التي تحتوي على الفلافونوييدات أحادية أو مركبة تكون في تزايد من طرف المستهلكين نظرا لأهمية هذه المركبات في الوقاية من أمراض القلب والأوعية الدموية والسرطان(Ghedira,2005).

IV-3-النشاطية المضادة للإلتهاب

الالتهاب هو رد فعل دفاع الجسم عن مختلف الهجمات التي يمكن أن تكون فيزيائية، كيميائية، بيولوجية (استجابة مناعية) أو معدية (Ndiaye et al., 2006)، كما يعتبر الإلتهاب آلية معقدة ترتبط عادة بالألم وعدة حوادث مثل الزيادة في عملية تخريب البروتينات، تلف الأغشية والزيادة في نفاذية الأوعية الدموية و التدفق الدموي، التي تسمح للأجسام المضادة وسيتوكسينات (cytoxines) باجتياز بطانة الأوعية الدموية وهجرة الكريات الدموية البيضاء نحو الأنسجة المتضررة من أجل إصلاح التلف (Umapathy et al., 2010 ; Yougbaré-Ziébrou et al 2015)،

مما يؤدي إلى ظهور الإحمرار، الإنتفاخ، الحمى، الألم وفقدان الوظيفة. تستعمل الأدوية الستيرودية المضادة للإلتهاب، وغير ستيرودية حاليا لعلاج الالتهاب الحاد، لكنها لم تستطيع علاج الإلتهابات المزمنة مثل التهاب المفاصل (la polyarthrite)، والتهاب الجلد(dermatite atopique)، أما المركبات الطبيعية فقد اكتسبت أهمية كبيرة كعوامل حماية ذات نشاطية عالية(Ait El Cadi et al., 2012) .

تتطلب الاستجابة الإلتهابية تدخل عدة أنزيمات من بينها الليبوأكسيجيناز(les lipoxygénases) و السيكلوأكسيجيناز COX 1 et COX2 (les cycloxygénases) التي تصنع وسائط إبتدائية للإلتهاب مثل لوكوتريان(les leucotriènes)، بروستغلوندين (les prostaglandines) إنطلاقا من حمض أراشيدونيك (acide arachidonique).

الأنواع الأكسيجينية النشطة (ROS) تتدخل في فيزيولوجيا الأمراض ذات الطابع الالتهابي (السرطان، مرض السكري، تصلب الشرايين، التهاب المفاصل والأمراض المعدية)، حيث تتسبب في تحرير السيتوكينات(cytokines) (TNF α, IL 1β, IL 6) وتحرير أنزيمات الإلتهاب الإبتدائي (سيكلوأكسيجيناز(cyclo-oxygénases)، ليبوأكسيجيناز(lipoxygénase)، أحادي أكسيد الأزوت سنتاز (monoxyde d’azote synthase) التي تتدخل في عملية الإلتهاب. الليبوأكسيجيناز يحفز تصنيع اللوكوتريان التي تعتبر وسائط الإلتهاب الإبتدائي والحساسية. كما تأكسد الأنواع الأكسيجينية النشطة (ROS) الليبيدات غير مشبعة للغشاء الخلوي مما يؤدي إلى تكوين البيروكسيدات الليبيدية التي تعتبر سامة للخلايا و تتدخل في عملية الإلتهاب(Yougbaré-Ziébrou et al., 2015).

الالتهابات الحادة يمكن أن تشفى بطريقة تلقائية أو بواسطة استخدام مضادات الالتهاب الستيروئيدية (الغليكوكورتيكوييد (glucocorticoïdes)) وغير الستيروئيدية.

رغم فعالية هذه الأدوية فإن لديها آثار جانبية مثل الضرر في الجهاز الهضمي(القرحة المعدية)، تسمم كلوي(فشل كلوي حاد). بسبب هذه المشاكل، لابد من البحث عن عوامل جديدة للعلاج مثل النباتات الطبية التي تمثل مصدر مهم للجزيئات الطبيعية المضادة للالتهاب. وجود مجاميع كيميائية أساسية مثل مواد الدباغة، الفلافونوييدات، الستيرولات، التربينات الثلاثية، الكومارين والصابونيزيدات تكون مسؤولة عن النشاطية العلاجية المضادة للإلتهاب(Yougbaré-Ziébrou et al., 2015). كما أفادت الدراسات أن الفلافونوييدات التي تعتبر مضادات أكسدة طبيعية، تلعب دور مهم جدا في علاج الالتهاب، الأورام والإصابات البكتيرية(Epa et al.,2015). النباتات الطبية المستعملة في الطب التقليدي لعلاج الأمراض الناتجة عن الإلتهاب قد تكون بديل مضمون ومنطقي للبحث عن عوامل مضادة للالتهاب مضمونة وفعالة (Alhakmani et al. ,2013).

IV-4-السمية

تعتبر دراسة السمية مهمة جدا في تطوير الأدوية، من المعروف أن استخدام الأعشاب الطبية يكون بصفة عشوائية ودون الأخذ بعين الاعتبار الآثار الجانبية التي يمكن أن تكون خفيفة، متوسطة إلى شديدة قد تؤدي إلى الموت (Akindele et al., 2014). إختبار السمية يمكن أن يكشف عن بعض المخاطر التي قد تظهر عند استعمال الأعشاب، وتجنب الآثار الضارة المحتملة عند استخدامها كدواء. بالإضافة إلى أن بعض النباتات تنتج المركبات الثانوية السامة كوسيلة دفاع في الظروف البيئية الصعبة وتكون هذه المستقلبات مخزنة في خلايا متخصصة.

الهدف الأساسي من تقييم سمية أي دواء عشبي هو تحديد الآثار السلبية وتحديد حدود مستوى التعرض الذي يتسبب في مثل هذه الآثار. إثنين من العوامل المهمة التي يجب أخذها بعين الاعتبار في تقييم سلامة أي دواء عشبي وهي طبيعة وأهمية الأثر السلبي بالإضافة إلى مستوى التعرض الذي يؤدي إلى هذا التأثير (Ifeoma et Oluwakanyinsola,2013) .

ترتبط السمية أساسا بكيفية تحضير وطرق تناول الأعشاب الطبية (Hobou et al., 2011) ، كما تعتمد التأثيرات السمية للمادة على مكوناتها الكيميائية(Nakavuma et al., 2016) ، حسب Ouedraogo et al. (2001) يمكن أن ينجم عن تناول النباتات الغنية بالصابونين بجرعات عالية لفترة طويلة آثار غيرمرغوب فيها وضارة، وبذلك يصبح النبات سام.

IV-4-1- المواد السامة

تعرف السموم على أنها مواد قادرة على إحداث خلل في وظائف الجسم العادية على المستوى الجزيئي، الخلوي والعضوي عن طريق اللمس(تأثير موضعي) أو داخل الجسم(تأثير عن طريق الدم)،حيث تكون

الطرق الرئيسية لامتصاص هذه المواد هي الإستنشاق(طريق تنفسي)، عن طريق الجلد (طريق جلدي) والهضم (الجهاز الهضمي). قد تكون هذه المواد ذات مصدر طبيعي مثل الغبار، حبوب الطلع، أو إصطناعي مثل اليوريا والفورمألدهيد، أو ذات طبيعة كيميائية مثل الأسيتون،أو بيولوجية مثل الأفلاتوكسين.

التأثير السمي هونتيجة لآلية معقدة قد تسبب سلسلة من التفاعلات الفيزيولوجية والإستقلابية. كما يرتبط التأثير الضار بالجرعة، طريقة الإمتصاص، نوع وشدة الإصابة والوقت اللازم لظهور هذه الإصابة (Viau et tardif,2003 ;Gilles, 2004).

يظهر التأثير الحاد في مدة زمنية نسبيا قصيرة(دقائق، ساعات، أيام)، في حين لا يظهر التأثير المزمن إلا بعد وقت طويل نسبيا من التعرض ويكون بشكل دائم(أسابيع، أشهر، سنوات). كما يحدث التأثير الموضعي في نقطة التلامس، في حين التأثير عن طريق الدم يظهر في مكان بعيد عن مكان التعرض الأول (Gilles, 2004).

أنواع إختبار الحساسية المتبعة دائما من طرف مصنعي المنتجات الصيدلانية في دراسة دواء جديد تتضمن السمية الحادة، شبه حادة والمزمنة، السمية الحادة تتطلب تقديرLD50 (وهي الجرعة القاتلة لـ 50% من مجموعة الحيوانات المختبرة). تحديد السمية الحادة عن طريق الفم يمثل دائما الخطوة الأولى لتقييم وتقدير الخصائص السامة لكل المركبات (Akhila et al., 2007) أولتقييم مادة غير معروفة (Mridula et al., 2011).

IV-4-2- أنواع السمية

نميزثلاث أنواع من السمية كماهي موضحة في جدول (2) :

1- السمية الحادة

يمكن دراسة سمية النباتات الطبية بإجراء اختبارات السمية على الحيوانات مثل الفئران، الجرذان والأرانب، بعد تحضير مستخلصات خام أو تنقية مركبات بعد فصلها من النباتات الطبية. هذا الإختبار يقيس الإستجابة النسبية لتسمم كائن حي تجريبي أثناء تعرض وحيد وقصير لمادة مختبرة. الطرق المستعملة خلال هذا الإختبار الأخذ عن طريق الفم، الجلد ، الإستنشاق، الحقن في الوريد، البطن والعضلة،.بعد تقديم المستخلص تلاحظ الفئران مرة كل 30 دقيقة لمدة 24 ساعة، مع إعطاء الأهمية للأربع ساعات الأولى ثم كل يوم لمدة 14يوم.

اختبار السمية الحادة يستعمل لحساب LD50 للمادة، باستعمال طرق نموذجية مثل طرق لورك (Lorke) (Ifeoma et Oluwakanyinsola,2013)، طرق كاربر (Karber) وطرق جديدة معتمدة من طرف منظمة التعاون الإقتصادي والتنمية(Organisation de coopération et de développement économiques) (OCDE)أو (OECD) (Chinedu et al.,2013)، وقد أفاد هذا الأخير في دراسته أن معظم الطرق

المستعملة لتقييم السمية الحادة لها سلبياتها، وأنه من المهم حاليا تطوير أفضل طريقة لاختبار الحساسية الحادة، حيث إذا اعتمدت فإنها ستعطي نتائج أكثر دقة باستعمال عدد قليل من الحيوانات وتكون بأقل تكلفة وفي وقت أقل.

حاليا الطرق الأكثر استعمال لدراسة السمية الحادة عن طريق الفم هي الطرق الخاصة باختبار المواد الكيميائية المعتمدة من طرف منظمة التعاون الإقتصادي والتنمية (OCDE) رقم 423 (2001) ورقم 425 (2008).

الهدف من دراسة السمية الحادة هو تحديد الجرعة التي تسبب أثار ضارة كبيرة وتقدير أدنى جرعة التي تسبب الوفاة (Sathya et al.,2012).

2-السمية شبه-حادة/ السمية شبه-مزمنة

تتم هذه الدراسة باستعمال جرعات مكررة من المادة المختبرة للكشف عن التغيرات الضارة التي تحدث على مستوى الأعضاء، المؤشرات البيوكيميائية والدموية الناتجة عن هذا الأخذ المتكرر للمادة، الذي يمتد دائما من أسابيع إلى أشهر.

الفرق ين مصطلح السمية شبه-حادة و السمية شبه-مزمنة يكمن في مدة أخذ الجرعات حيث تتراوح الأولى بين (28 - 30 يوم)، والأخيرة تتراوح بين شهرين إلى ثلاثة أشهر(60-90يوم)، حيث تأخذ الفئران المادة المختبرة طيلة مدة الإختبار. المعطيات المدروسة تشمل الغذاءاليومي المستهلك، قياس كمية الماء المأخوذة و قياس وزن جسم الفئران. النقاط الأخيرة والمميزة لتقييم السمية تتضمن العوامل الكيميائية (الليبدات، البروتينات، اليوريا، الكرياتينين، ترانس أمياز (transaminase) والفوسفتاز(phosphatase) الكبد) والعوامل الدموية (الخلايا الدموية البيضاء، الحمراء، الهيموغلوبين، الهيماتوكريت ، الصفائح الدموية وكريا ت الدم البيضاءlymphocytes).

نقوم بفحص مختلف الأعضاء من أجل ملاحظة التغيرات المرضية الكبيرة، حيث نقوم بعمل مقاطع نسيجية في الأعضاء المدروسة من أجل فحص نسيجي دقيق. نتائج العديد من اختبارات السمية شبه مزمنة لمختلف مستخلصات النبات تأكد أن الأعضاء الرئيسية التي عادة ما تتأثر هي الكبد والكلى. أي تسمم الكبد والكلى هي من التأثيرات الأكثر توقع، حيث الكبد يلعب دور العضو الرئيسي لإزالة سموم المركبات الكيميائية، في حين تعتبر الكلى الطريق الرئيسي لطرح العديد من المركبات الكيميائية في أشكالها النشطة و/أو غير النشطة(Ifeoma et Oluwakanyinsola, 2013)

3-السمية المزمنة

إختبار السمية المزمنة يشبه دراسة السمية شبه مزمنة باستثناء أنها تستعمل عدد أكبر من الحيوانات للكشف عن التسمم الذي يمكن أن يحدث أثناء التعرض لمادة لمدة 24 شهر أو مدى الحياة. الطرق الرئيسية المستعملة خلال هذا الاختبار تكون عن طريق الفم، الجلد أو الاستنشاق.

تستطيع أن تكشف هذه الدراسات على المدى الطويل خصائص المواد المختبرة المسببة للطفرات الوراثية والسرطان وكذلك الكشف عن الأعضاء المحتمل التكدس بها هذه المواد. النقاط المدروسة أثناء هذه السمية هي حدود جرعة السمية، وهذا يعني معرفة أضعف جرعة التي لايحدث عندها أي تسمم أو لا يلاحظ عندها أي مستوى من التأثير الضار، الوفيات، كمية الغذاء والماء المستهلكة، التحاليل البيوكيميائية والدموية، التشريح و الدراسة النسيجية للأعضاء (Ifeoma et Oluwakanyinsola, 2013).

جدول2. أنواع التسمم(Gilles., 2004)

نوع التسمم	عدد الجرعات	مدة التعرض
حاد	وحيدة	24< ساعة
شبه-حاد	متكررة	> أو يساوي شهر واحد
شبه-مزمن	متكررة	من 1إلى 3أشهر
مزمن	متكررة	3<أشهر

كما ذكرنا سابقا تعتبر الدراسة النسيجية العامل الجد حساس والحاسم في تحديد التغيرات الخلوية التي تحدث على مستوى الأعضاء المستهدفة مثل الكبد(Abdel-Warith et al., 2011). كما قد تكون التغيرات النسيجية داخل خلايا الكبد نتيجة للعديد من التغيرات البيوكيميائية (Gathwan et al., 2012)**.** أما التحاليل البيوكيميائية والدموية فلديها دور معنوي في تحديد السمية التي تسببها الأدوية، حيث تعتبر أنزيمات الترانس أميناز(Transaminases)(SGOT وSGPT)

(Sérum Glutamopyruvate Transférase،Sérum Glutamooxaloacétate Transférase) كما تسمى أيضا على الترتيب(ASAT وALAT) مؤشرات جيدة لوظائف الكبد ومؤشرات حيوية التي تنبؤ بالسمية المحتملة للأدوية، حيث أي إرتفاع متعلق بهذه الأنزيمات يدل على تسربها في الدم بسبب الضرر الموجود بالخلايا البرانشيمية للكبد مثل وجود نخر يؤدي إلى هشاشة على مستوى الغشاء التي تسمح بتسرب هذه الأنزيمات في الدم، يكون هذا الضرر نتيجة لتثبيط عملية التنفس بالميتوكندري وتوليد الأنواع الأكسيجينية النشطة (Archana et Madhulika,2010 ; Amala Hazel,2016) .

لكن أي انخفاض في مستوى هذه الأنزيمات(ALT،AST وALP) يدل على أن المستخلص ليس لديه أي آثار سامة على أنسجة الكبد والقلب (Alamgeer et al.,2013).

الأمينوترانسفيراز (Aminotransferases)هي مجموعة من الأنزيمات التي تحفز التحويل العكسي لمجموعة من الأحماض الأمينية من α – حمض أميني إلى حمض أكسو(oxo acid).

توجد كمية كبيرة منALT(Alanine transaminase) في العصارة الخلوية للخلايا البرانشيمية للكبد، في حين توجد الـ AST (Aspartate transaminase) في العصارة الخلوية و ميتوكوندري الخلايا الكبدية كما يوجد أيضا في عضلة القلب، عضلات الهيكل العظمي، البنكرياس والكلى. لذلك قياس ALT هو مميز للكبد لتحديد تلف الخلايا الكبدية، مع ذلك يبقى الـ AST يستعمل لتقدير وظيفة الكبد نظرا لكونه يعتبر مؤشر حساس لتلف الميتوكندري خاصة في المناطق المركزية للكبد(Archana et Madhulika,2010).

V- الدراسة النسيجية للنبات

الخليةهي الوحدة الأساسية للحياة، كما تعتبر أيضا الكيان البيولوجي الأكثر بساطة القادر على العيش بمفرده. عند الكائن أحادي الخلية، تقوم الخلية بكل العمليات الحيوية، أما الكائن متعدد الخلايا، فإن هذه الخلايا تميل إلى التخصص، حيث تعتمد على بعضها البعض، و تكون كل خلية مكلفة بوظائف خاصة. المقاطع المنجزة على سيقان وأوراق النباتات الزهرية، خاصة عندما تكون ملونة تظهر عدة مجموعات خلوية يمكن تحديدها بسهولة تمثل الأنسجة التي تتكون من خلايا متشابهة في الأحجام، سمك وتركيب جدران الخلايا (Laberche,2010)، حسب Bossard et cuisance (1977) عرف النسيج على أنه مجموعة الخلايا التي لها نفس الشكل، التركيب ونفس الوظيفة.

الأنسجة التي تتكون من نوع واحد من الخلايا هي أنسجة بسيطة، أما الأنسجة التي تتكون من إثنين أو عدة أنماط من الخلايا فهي عبارة عن أنسجة مركبة. الأنسجة الأساسية البرانشيمية ،الكولنشيمية والسكليرنشيمية هي كلها أنسجة بسيطة، أما الخشب، اللحاء والبشرة فهي أنسجة مركبة (Raven et al.,2000).

التلوين باستعمال أخضراليود/أحمر الكارمن تعتبر طريقة كلاسيكية تتم حسب المراحل التالية:

- إفراغ الخلايا بواسطة ماء جافيل (hypochlorite de sodium)
- تحميض بواسطة حمض الخل (acide acétique)
- التلوين المضاعف بواسطة أخضر اليود وأحمر الكارمن حسب طريقة ميراند (Mirande)
- الغسل بالماء

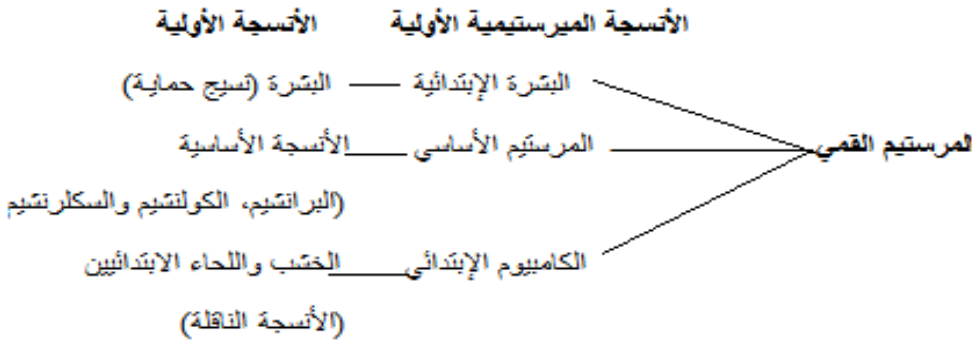
الأنسجة التي لم تتخشب تظهر باللون الأحمر أما الأخرى فتتلون باللون الأخضر (Laberche,2010).

V- 1-الأنسجة الميرستيمة (الإنشائية) الإبتدائية Méristèmes primaires

يحتوي جنين النباتات الزهرية على أجزاء من الخلايا الميرستيمية الخاصة بالجذر وأيضا الساق، وتعني كلمة مرستيم باليونانية *meris*: جزء و *stêma* : خيط.

عند النباتات الزهرية، توجد هذه الخلايا الإنشائية الأولية التي هي في الأصل من أنسجة النبات في الريشة والجذير، وهي بدورها تضمن إستطالة السيقان و الجذور من مرحلة إنتاش النبات حتى موته، كما يمكن التعرف عليها بكل سهولة في النبات. تعطي هذه الخلايا الإنشائية الأولية الأنسجة التي يطلق عليها

الأنسجة الابتدائية(شكل12) لكي نفرقها عن الأنسجة الثانوية التي تظهر عند النبات لاحقا. الخلايا الإنشائية الأولية تدخل في تكوين الأعضاء الفتية للنباتات الزهرية، والأعضاء الفتية والمسنة للنباتات أحادية الفلقة (Laberche,2010).



شكل12. يلخص أصل الأنسجة الميرستيمية الإبتدائية إنطلاقا من الميرستيم القمي والتي تعطي أنسجة البنية الأولية(Raven et al.,2000)

V- 1-1-الأنسجة الإبتدائية (الأساسية)

الأنسجة الإبتدائية عديدة، ومع ذلك فمن الممكن تجميعها في 5 فئات حسب Laberche(2010):

الأنسجة البرانشمية، أنسجة الحماية، الأنسجة الناقلة، أنسجة الدعم والأنسجة لإفرازية وسنتطرق إلى كل فئة كالأتي:

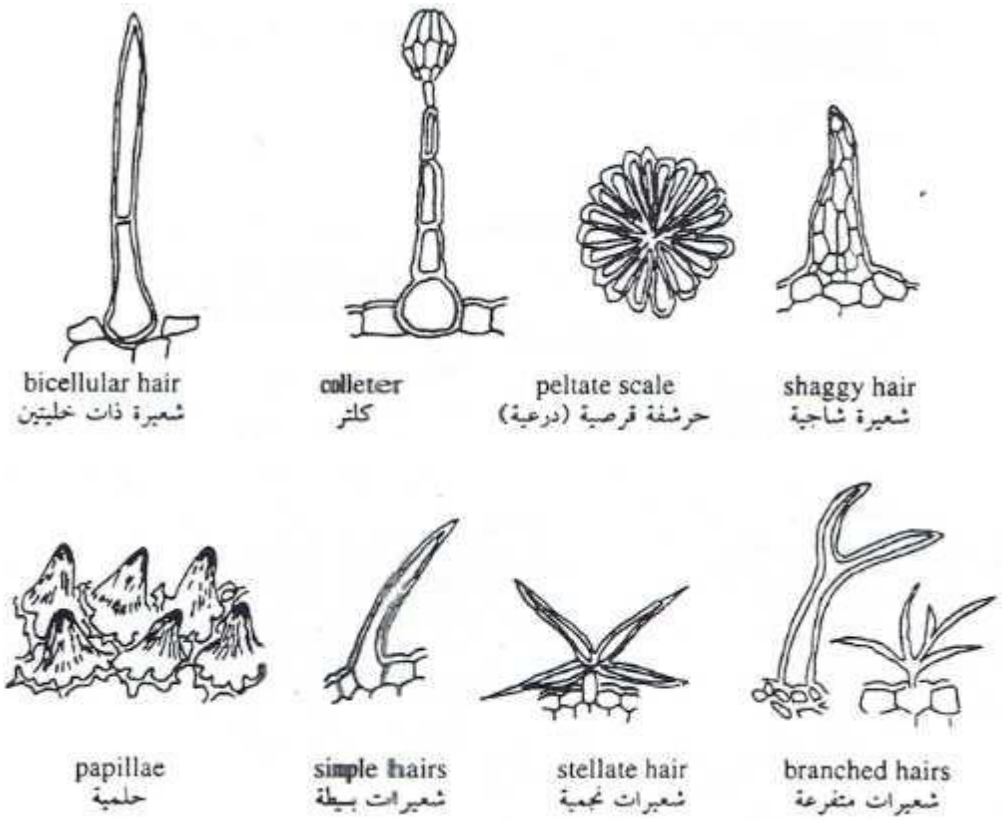
أ-النسيج البرانشيمي Tissu parenchyme

يكون هذا النسيج نسبيا بسيط من الناحية الخلوية، لا يضمن الوظائف الأساسية للنبات مثل التركيب الضوئي وتخزين المدخرات. الخلايا البرانشيمية لها تركيب يمثل التركيب النموذجي للخلية النباتية، كل خلية تحتوي على فجوة يفوق حجمها 80% من حجم الخلية. النواة والعضيات السيتوبلازمية العادية (ديكتيوزوم،الشبكة الأندوبلازمية المحببة.....الخ) تكون موجودة لكن بدون صفات خاصة، كما نجد قطرات من الليبيدات وبلورات بروتينية في الهيولى. جدران الخلايا البرانشيمية تكون رقيقة وبها العديد من البلازمودازم (Le plasmodesme). التبادلات الغازية تكون قوية وبواسطة فتحات متطورة(البرانشيم الفراغي أو الإسفنجي)،حيث يكون عدد الميتوكندري كبير. كما يعتمد تخصص الأنسجة أساسا على تطور البلاستيدات، نميزوجود النسيج البرانشيمي الكلوروفيلي في الأعضاء الهوائية خاصة نصل الأوراق والتي تكون ملونة بالأخضر لوفرة الصانعات الخضراء الكبيرة وعدسية الشكل. أما النسيج البرانشيمي النشوي أو البرانشيم الإدخاري يوجد بكثرة في الأعضاء الترابية (الجذر،الجذمورأو الريزوم)، كما يتكون نخاع السيقان عموما من برانشيم إدخاري، البلاستيدات بهذا البرنشيم تكون غير ملونة و نظامها الغشائي غير متطور، تنتج حبيبات النشاء في الستروما إنطلاقا من منتجات التمثيل الضوئي للأجزاء الهوائية.

في برانشيم الثمار و الأزهار، تخضع البلاستيدات غالبا لتطور خاص وتراكم صبغات الكاروتينوييدات (البلاستيدات الملونة أي كروموبلاست) التي تلون الأعضاء بالأصفر والبرتقالي. كما توجد أيضا خلايا برانشيمية ترتبط بالأنسجة الناقلة (برانشيم وعائي،برانشيم لحائي)(Roland et al., 2008).

ب - البشرة Épiderme

البشرة هي طبقة مستمرة من الخلايا التي تغطي السيقان والأوراق وتوفر الحماية ضد الجفاف وكل أنواع الهجومات الخارجية (الطفيليات....) في الوقت الذي تسمح فيه بتنظيم وتبادل الغازات مع الوسط الخارجي. تتضمن البشرة خلايا الحماية وخلايا ثغرية. في كثيرمن الحالات توجد أيضا إستطالات أحادية ومتعددة الخلايا لتكوين شعيرات (trichomes) تكون إما وقائية أوإفرازية(شكل13). عدد، شكل وتوفر هذه العناصر الأخيرة يكون متغير حسب الظروف البيئية وهي تمثل خاصية مميزة. كما تكون كثافة الثغور عادة قصوى في طبقة البشرة المتواجدة في الجهة السفلية للورقة أين يمكن أن تصل من 200 إلى 300 ثغر في مم^2.



شكل13. بعض الأنواع المختلفة للزوائد البشرية (جبروآخرون،2001)

يكون أصل البشرة طبقة من الخلايا الميريستيمية والتي تسمى بالبشرة الإبتدائية (protoderme) التي تغطي الأعضاء التي تكون في طور التشكل والتي يتم على مستواها الإنقسام الخيطي المتساوي أوالميتوزي الذي يتم بشكل عمودي على سطح الخلايا.

تفرز خلايا البشرة على الجهة الخارجية، من ناحية الوسط ، غطاء أوأدمة(الكيوتيكل) (cuticule) التي تحتوي على المشتقات الليبيدية الكارهة للماء، خاصة الشمع الذي يشكل طبقة بلورية التي تجعل السطح غيرنفوذ للماء. سمك الكيوتيكل يتكون من شبكة من الكيوتين (متعدد حمض الهيدروكسيد ذو سلاسل طويلة من الكربون) مبللة بالماء وتحتوي على طبقات من الشمع. في وجود الرطوبة الجدار البكتوسيليلوزي والكيوتيكل التي تغطيه يكونا رطبين، شبكة الكيوتيكل والشمع يمكن ابعادها وبالتالي يمكن أن تتم عملية الإنتشار. في حين إذا كان الوسط جاف الطبقة الكارهة للماء تشتد والكيوتيكل تصبح غيرنفوذة، وتشكل بذلك حاجز فعال ضد فقدان الماء.

تتميز الخلايا الثغرية ببنية خاصة لجدرانها المشتركة، هذه الأخيرة تتغلظ بمادة الكيوتين وتنشق في المنطقة المتجاورة مما يؤدي إلى تشكيل فتحة(ostiole) ذات شفتين سميكتين. من الناحية الداخلية، الفتحة تتصل مع غرفة تتواجد تحت الثغر التي تصب فيها كل الثقوب(غرفة هوائية) وبخلاف خلايا البشرة تتحول البلاستيدات البدائية إلى بلاستيدات خضراء. تتحكم الخلايا الثغرية في التبادلات بين الوسط الخارجي والغرفة الهوائية وذلك بتغيير أبعاد الثغر. ترجع هذه الحركة إلى تغير في الجهد المائي الخلوي. جهد ضعيف يسبب توترو تغيير شديد على مستوى الجدران مع تباعد الشفاه المتكتنة لفتحة الثغر، أما الزيادة في الجهد الداخلي فإنه يجمعها. حركة صمام الخلايا الثغرية تتحكم فيها عدة عوامل التي تجعل هذه الحركة تلائم الظروف الخارجية والنشاط الداخلي، حيث وجودالضوء ومقدار ضعيف من CO_2 يحفز فتح الثغور وبالعكس الجفاف ونسبة ضعيفة من الماء تغلقها. في الظروف الفيزيولوجية العادية، يكون هناك نظام يومي لفتح الثغور في النهاروغلقها في الليل ويكون مرتبط بالظروف البيئية(Roland et al., 2008) .

ج -الأنسجة الدعامية

1-الكولنشيم Collenchyme

مثل الخلايا البرانشيمية ،الخلايا الكولنشيمية البالغة هي خلايا حية، يكون الكولنشيم على شكل كتل منفصلة أو على شكل أسطوانة متصلة تكون موجودة تحت بشرة الساق والسويقة كما نجده في حواف أوراق نباتات ثنائية الفلقة، تكون الخلايا الكولنشيمية عادة متطاولة(Raven et al., 2007).

يعتبرالكولنشيم نسيج دعم للأعضاء الفتية التي تكون في طور النمو، يتشكل مبكرا في وضعية محيطية، عموما عن طريق انقسامات الخلايا تحت البشرة. يعتبر الكولنشيم مقاوم لكنه في نفس الوقت قابل للتمدد مما يسمح باستطالة العضوالنباتي (Roland et al., 2008).

2 - السكلرنشيم Sclérenchyme

يشير اسم السكليرنشيم إلى مجموعة متنوعة من خلايا الدعم أوخلايا ميتة(خلايا تفقد حيوتها بسرعة) تكون جدرانها مغطاة بمادة خشبية تسمى هذه الخلايا بالسكليروسيت (sclérocytes) تشترك في خاصية تطوير نمط خاص من الجدار الذي يعطيه صلابة كبيرة(تسمى بعضها بالخلايا الحجرية). حين تتوقف الخلية عن النمو، فإنها تضيف إلى جدارها الأول، جدار ثانوي يتكون من طبقة من الألياف السيليلوزية

المرتبطة ببعضها البعض بشكل كبير. هذه الجدران تكون مطاطية و مقاومة للشد. فيما بعد تتصلب جدرانها وتصبح ثخينة قاسية متغلظة بمادة اللجنين مما يجعلها غيرقابلة للتمدد و مقاومة للضغط (Roland et al., 2008).

د-الأنسجة الناقلة Tissus conducteurs

الخشب واللحاء يرتبطان ارتباط وثيق من ناحية التخليق، الفيزيولوجيا والتشريح،وهم يشكلان النظام الوعائي الذي يضمن الارتباط بين مختلف أجزاء النبات.

1-الخشب

يضمن نقل النسغ المعدني أوالنسغ الخام (محلول مائي مخفف من الأملاح المعدنية مستخلص من التربة). هذه العناصر المميزة تتمثل في القصيبات والأوعية، عبارة عن خلايا متخشبة تصبح وظيفية بعد التلاشي الكامل للبروتوبلازم (السيتوبلازم والنواة)، جدرانها الثانوية تكون متقطعة في الأعضاء الفتية مما يسمح لها بالتمدد والنمو. وهناك عدة أشكال مميزة لخلايا الخشب الإبتدائي(حلقية،حلزونية،مخططة، منقرة....الخ)، النوعين الأولين قابلة للتمديد وتتكون في الأعضاء الفتية(الخشب الأول (protoxylème)، أما الاثنين الباقيين فهي تتشكل بعد النمو وتشكل الخشب التالي (métaxylème) ويسمى أيضا الخشب الأولي المتأخر(xyléme primaire tardif) (Roland et al., 2008).

في البنية الأولية للنبات (نبات فتي) يشتق الخشب من الكامبيوم الإبتدائي (procambium)، أما أثناء النمو الثانوي (البنية الثانوية) فإن الخشب يكون مصدره الكامبيوم(Raven et al.,2007).

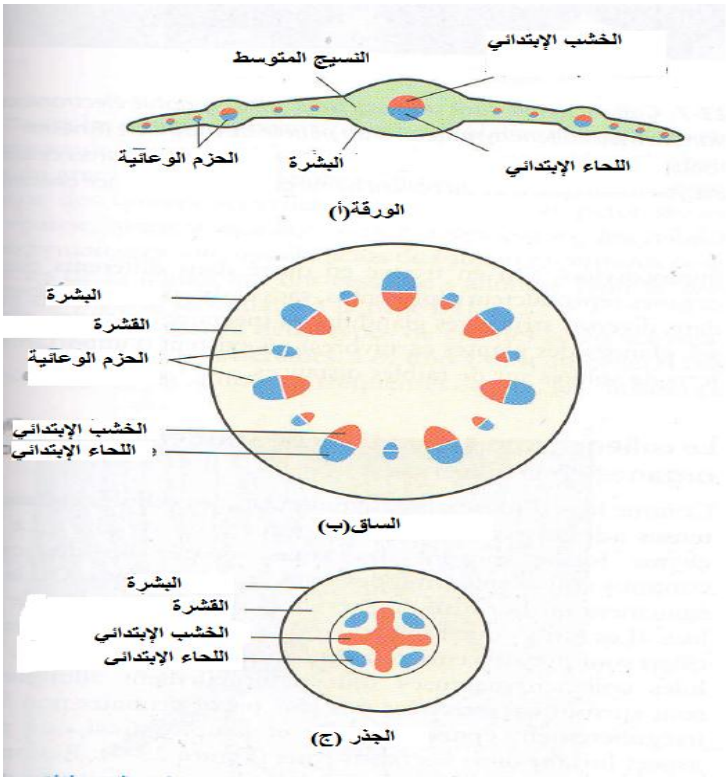
2-اللحاء

يسمح بانتقال النسغ الكامل الغني بالمواد العضوية بواسطة خلايا غربالية. تخضع هذه الأخيرة لتمايز خاص جدا الذي من خلاله تفقد هذه الخلايا أنويتها ويكون التحول في بنيتها السيتوبلازمية معتبر(Roland et al., 2008). مثل الخشب الإبتدائي، اللحاء الذي يتشكل في البداية (اللحاء الأولي protophloéme) غالبا ما يمتد ويتخرب أثناء إستطالة العضو النباتي (Raven et al.,2007). يتكون لحاء النباتات المزهرة من خلايا تسمى العناصر الغربالية بسبب جدرانها العرضية المزودة بالثقوب عكس القصيبات والأوعية، العناصر الغربالية هي خلايا حية مكدسة الواحدة فوق الأخرى لتشكيل الأنابيب الغربالية، التي تضمن نقل النسغ الكامل المصنع على مستوى الأوراق نحو باقي أجزاء النبات. ترافق هذه العناصر الغربالية دائما خلية مرافقة (cellule compagne) **ذات نواة**، غنية بالسيتوبلازم والريبوزومات. تنشأ الخلايا المرافقة مع خلايا الأنابيب الغربالية إنطلاقا من خلية مرستيمية واحدة مشتركة (Nabors,2009).

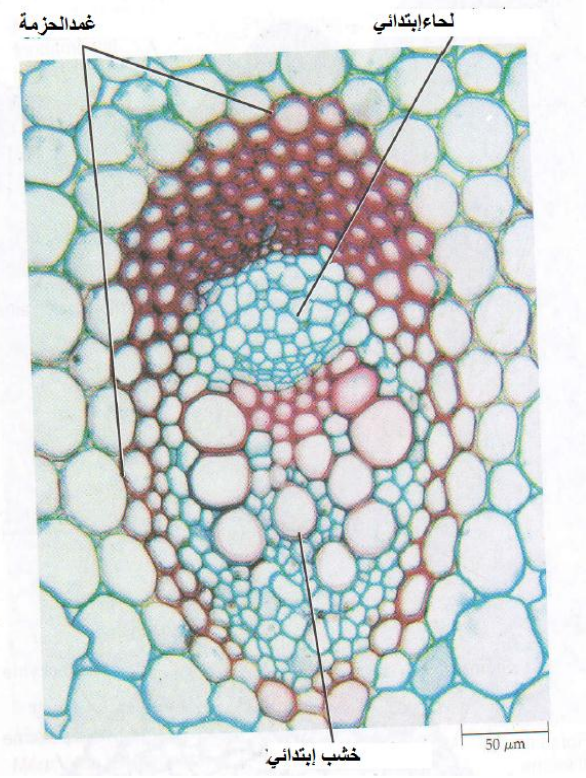
الأنسجة الناقلة تكون متمركزة داخل الأسطوانة الوعائية أو الناقلة عند الجذر والساق، حيث تشكل الأنسجة الناقلة الإبتدائية (الخشب الإبتدائي xylème primaire واللحاء الإبتدائيPhloème primaire) المصحوبة بجزء مركزي مكون من نسيج أساسي أو النخاع (اللب) عند بعض النباتات الوعائية الأسطوانة المركزية(Stéle) في ساق وجذر ذو البنية الأولية (Raven et al.,2000).

حسب Bossard et cuisance (1977) ذكر أن المقطع العرضي في الجذر والساق يبين وجود حزم وعائية من الخشب وحزم وعائية من اللحاء، الأولى تتكون من أوعية ذات قطر نوعا ما كبير ترافقها خلايا وألياف خشبية ذات جدران سميكة وصلبة، أما الثانية فتتكون من أنابيب غربالية وألياف لحائية. يكون هذين النوعين من الحزم في الجذر مفصولة و متوضعة بالتناوب، أما في الساق فتكون متوضعة فوق بعضها في حزم لحاء-خشب حيث اللحاء يتجه نحو الخارج مقارنة مع الخشب(شكل15).

أنسجة الخشب وأنسجة اللحاء تمثل الحلقات المركزية في أعضاء النبات أين تعمل طبقة مولدة للحاء والخشب، حيث اللحاء يكون نحو الخارج والخشب نحو الداخل(كما يوضح شكل 14توضع كل من الأنسجة الأساسية والناقلة على مستوى الأوراق، السيقان والجذورعند النبات ثنائي الفلقة).



شكل14.توضع كل من الأنسجة الأساسية والناقلة على مستوى الأوراق(أ)، السيقان(ب) والجذور(ج) عند النبات ثنائي الفلقة (Raven et al.,2007).



شكل15. مقطع عرضي في حزمة وعائية لنبات عشبي ثنائي الفلقة

٥- الأنسجة الإفرازية Tissus sécréteurs

عرف بوغديري (2000) الأنسجة الإفرازية على أنها أنسجة تعمل خلاياها على إفراز مواد مختلفة كالأصماغ و المواد الراتينجية والزيوت العطرية و الرحيق وغيرها. الخلايا الإفرازية قد تكون منعزلة عن غيرها من الخلايا وقد تتجمع لتشكل نسيجا إفرازيا. يمكن تقسيم النسج المفرزة إلى:

أ- النراكيب الإفرازية الخارجية

وهي تراكيب تتشكل من بعض خلايا البشرة أو الزوائد البشرة(trichomes)(شكل 13)، تفرز مواد خاصة على سطح النبات مثل الرحيق والمواد الزيتية، وأهم التراكيب الإفرازية الخارجية مايلي:

- الشعيرات الغدية

وهي زوائد تتشكل من البشرة، قد تكون وحيدة الخلية أو عديدة الخلايا، تفرزعادة المادة الراتينجية المنحلة في الزيوت الطيارة. ومن الأمثلة على ذلك الشعيرات اللاسعة في نبات الحريق، وكذلك الشعيرات الغدية في جنس التفاح. يلعب شكل الشعيرات دورا هاما في التمييز بين الفصائل النباتية كما هو الحال في الفصيلة الباذنجانية(Solanaceae) الفصيلة الشفوية(Labiatae).

-الغدد الرحيقية

توجد هذه الغدد عادة في أزهار النباتات التي يحدث فيها التلقيح عن طريق الحشرات، الرحيق عبارة عن سائل سكري يساعد على جذب الحشرات لحدوث عملية التلقيح في الأزهار. وقد توجد على الأعضاء الخضرية وتعرف بالغدد الرحيقية اللازهرية.

-الغدد الهضمية

توجد في النباتات آكلة الحشرات، حيث تفرز هذه الغدد سائل لزج يساعد على إقتناص الحشرات، كما تفرز أنزيمات هاضمة للبروتين .

-الثغور المائية

هي ثغور فقدت خلاياها الحارسة وبالتالي القدرة على الإنفتاح والإنغلاق فهي مفتوحة باستمرار، يخرج الماء من بين المسافات البينية للخلايا وتسمى عملية خروج الماء بالإدماع. توجد غالبا هذه الثغور على حواف الأوراق، كما أنها تأخذ أحيانا شكل الشعيرات.

ب - التراكيب الإفرازية الداخلية

وهي تراكيب تحفظ المواد المفرزة في داخلها، ومن أمثلتها:

- القنوات اللبنية

يوجد اللبن النباتي أو اليتوع في كثير من النباتات مغطاة البذور داخل خلايا أو سلسلة من الخلايا الحية المتصلة ببعضها من الأطراف. قد تكون القناة اللبنية بسيطة إذا تشكلت من خلية فردية تتغلغل بين الخلايا الأخرى وقد تتفرع، وبأنها مركبة إذا تكونت من سلسلة متصلة من الخلايا تتفكك جدرها لتشكل قناة مستقيمة أو متفرعة، يتكون اللبن النباتي من موادبروتينية،سكرية، صموغ،أملاح معدنية،أملاح لأحماض عضوية ـدهون،أصباغ مع نسبة من مادة المطاط ،أما لونه فيختلف من نبات إلى أخر، قد يكون أبيض أو أصفرأوبني أو عديم اللون.

- الجيوب الإفرازية

تتشكل من عدد من الخلايا الإفرازية تحيط بتجويف تطرح فيه موادها الإفرازية كما هو الحال في الجيوب المفرزة للزيوت العطرية في الأزهار وفي بعض الثمار كثمار الحمضيات (البرتقال والليمون) والتربينات في الصنوبر.

V- 2- المرستيم الثانوي Méristèmes secondaires

نجد في النباتات نوعين من الخلايا الميرسيمية الثانوية والتي تتمايز في وقت متأخر، حيث تنتتج الأنسجة الثانوية من نشاط نوعين من الكامبيوم :

1-المنطقة المولدة لحاء-خشب(La zone génératrice libéro-ligneuse) أو **الكامبيوم الوعائي** مسؤول عن تشكيل الخشب الثانوي نحوالداخل واللحاء الثانوي نحو الخارج، التي تضاف مباشرة إلى الأنسجة الأولية وبالتالي تضمن الزيادة في سمك النبات.

2- المنطقة المولدة للفلين (La zone génératrice subéro-phéllodermique) أو **الكامبيوم الفليني** (phéllogéne) مسؤول عن تكوين الفلين والقشرة أوالأدمة الثانوية. حيث يولد الفلين(liège) من الناحية الخارجية و الذي يعتبر نسيج للحماية ميت وعازل، حيث في بعض الأماكن نجدعديسات تتشكل من خلايا متفلنة مفصولة بواسطة ثقوب تسمح بالتبادل الغازي، والأدمة الفلينية(phelloderme) نحوالداخل التي تتكون من نسيج برانشيمي. هذين النسيجين يمثلان **أنسجة حماية ثانوية** أو كما تسمى البشرة الثانوية (périderme) حيث هذه الأخيرة تمثل مجموع الكامبيوم الفليني،الفلين والأدمة الفلينية (Roland et al., 2008 ; Laberche, 2010).

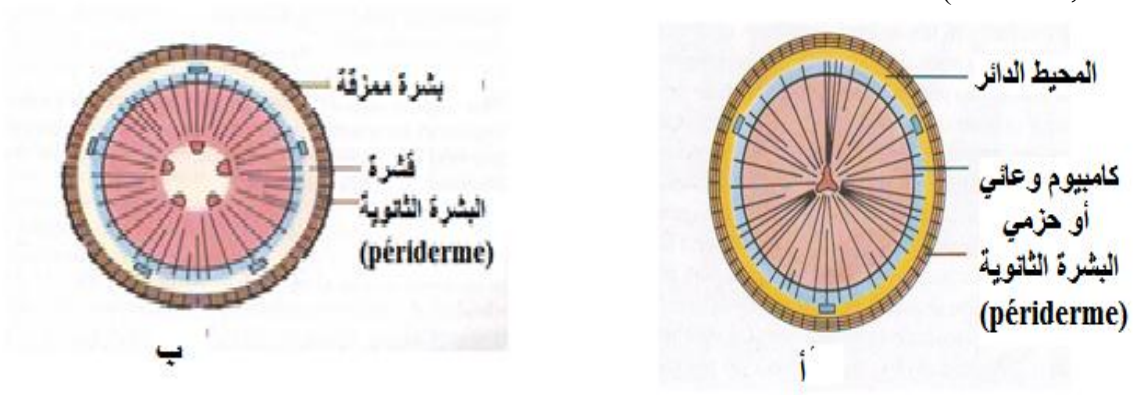
V- 2- 1-البنية الثانوية

يتعلق النمو الابتدائي باستطالة الجذور والسيقان، أما البنية الثانوية فهي تتمثل في الزيادة في السمك.

يعرف النمو الابتدائي بإنه ذلك النمو القريب نسبيا من نهايات الجذور والسيقان، ويبدأ من الميرستيم القمي(شكل12) و يؤدي خاصة إلى استطالة النبات غالبا نمو النبات من ناحية الإرتفاع. الأنسجة الناتجة عن النمو الإبتدائي هي الأنسجة الإبتدائية، وجزء النبات المكون من هذه الأنسجة يمثل البنية التشريحية الأولية أو الإبتدائية. النباتات الوعائية البدائية وكذلك العديد من النباتات الحالية تتكون بشكل كلي من الأنسجة الأولية.

بالإضافة إلى النمو الإبتدائي، الكثير من النباتات تطور نمو إضافي الذي يثخن الساق والجذر وهو النمو الثانوي أو البنية الثانوية(شكل 16). هذه الأخيرة تكون نتيجة لنشاط الخلايا المرستيمية الجانبية من بينها الكامبيوم الوعائي الذي ينتج عنه الانسجة الناقلة الثانوية: الخشب الثانوي واللحاء الثانوي. يكتمل إنتاج الأنسجة الناقلة الثانوية عموما بنشاط مرستيم جانبي ثاني وهو الكامبيوم الفليني أو الفيلوجان (phéllogéne) الذي ينتج عنه البشرة الثانوية (périderme) المكونة أساسا من نسيج قشري، البشرة الثانوية

تعوض البشرة العادية كنسيج حماية للنبات.الأنسجة الناقلة الثانوية والبشرة الثانوية تمثل البنية التشريحية الثانوية. النمو الثانوي ظهر منذ 380 مليون سنة عند مجموعات عديدة من النباتات الوعائية (Raven et al.,2000). النباتات الزهرية أحادية الفلقة لا تمتلك الكامبيوم وبالتالي لا تتعرض إلى البنية الثانوية (Laberche, 2010).



شكل 16. تطورجذرأثناء البنية الثانوية(أ)، تطور ساق أثناء البنية الثانوية(ب)(ظهور بنية ثانوية مع ظهورالبشرة الثانوية والأشعة) (Raven et al.,2007).

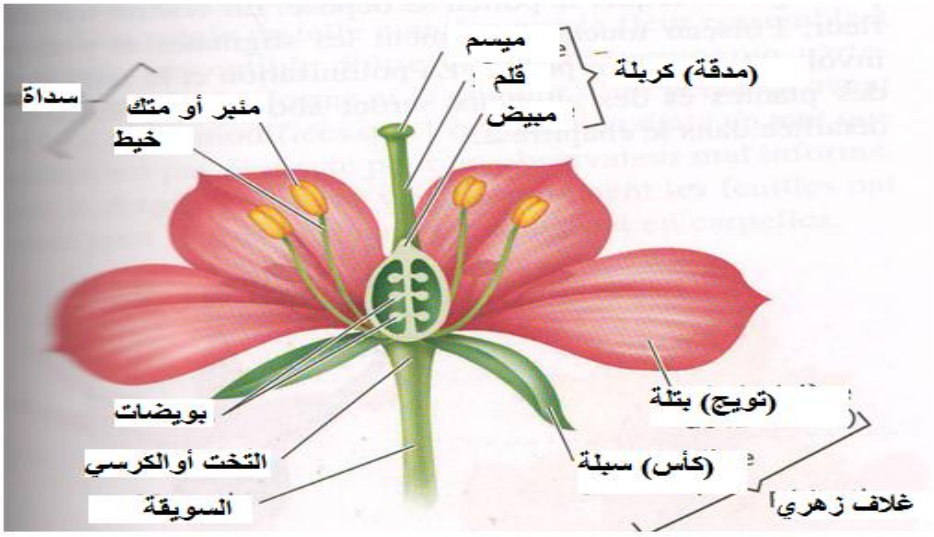
VI- الزهرة

الميزة الأكثر وضوحا لنباتات مغطاة البذور(angiosperme) هي الزهرة. تحمل الزهرة أعضاء تكاثر النبات وأهميتها الأساسية ليست فقط ان تضمن أجيالا من النباتات ولكنها تضمن تطور النوع نفسه(Raven et al.2000). كلمة مغطاة البذور تعني باليونانية *angeion* وهو وعاء، و *sperma* تعني بذرة (Raven et al.,2000).

حسب Nabors(2009) فهناك حوالي 258000نوع من النباتات مغطاة البذور، التي بدأ ظهورها منذ 140 مليون سنة، وهذا مايفسر التنوع الكبير في بنية الزهرة عند الأنواع الحالية.

سنتطرق إلى تركيب الزهرة النموذجية (شكل17)، حيث تقع هذه الزهرة في قمة ساق تدعى السويقة، قمة هذه السويقة تكون منتفخة وتدعى بالتخت أو الكرسي الذي يحمل الأعضاء الزهرية: السبلات لها دور أساسي في حماية برعم الزهرة قبل تفتحه، تكون عموما خضراء ويشكل مجموعها الكأس. يعتبر الكأس أول محيط زهري يظهر في قاعدة التخت، كما يمكن أن تكون السبلات حرة أو ملتحمة. البتلات هي عبارة عن أوراق متحورة ملونة تساهم في جذب الملقحات، تتحد البتلة مع الكرسي أو التخت في داخل و فوق الكأس، مجموع البتلات يشكل التويج، قد تكون البتلات حرة أو ملتحمة. يتكون الكأس و التويج من نمطين من الأوراق المتحورة والعقيمة التي تشكل الغلاف الزهري. الأسدية، الأعضاء الذكرية للزهرة، وظيفتها إنتاج حبوب الطلع. مجموع الأسدية يسمى الطلع (androcée) ، وهويمثل المحيط الزهري الثالث الموجود فوق الغلاف الزهري. تتكون كل سداة من خيط يتحد مع التخت ومن المئبر وهو عبارة عن كتلة

منتفخة متطاولة تتكون من فصين بها أربع أكياس طلعية. وظيفة السداة هي إنتاج حبوب الطلع داخل هذه الأكياس(Nabors,2009).

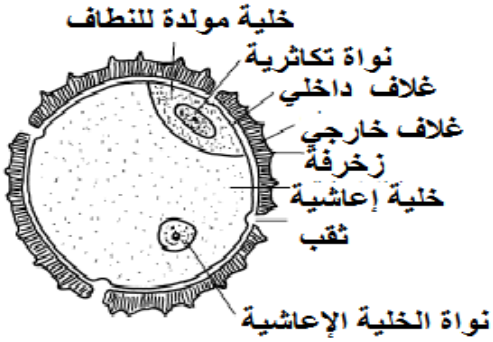


شكل17. شكل تخطيطي يوضح زهرة نموذجية(تحمل جميع المحيطات الزهرية)
(Nabors,2009)

تتكون حبوب الطلع من غشاء خارجي مقاوم Exine و غشاء داخلي Intine. يتكون Exine **من مادة مقاومة تتكون أساسا من الكاروتنويد أما** Intine فيتكون أساسا من السيليلوز والبكتين. يكون عموما غشاء حبة الطلع للنباتات مغطاة البذور عطر، ملون وغني بالأنزيمات وهي خاصية تميز تقريبا كل مغطاة البذور، تتضمن حبة الطلع خلية أنبوبية كبيرة تسمى الخلية خضرية أو الإعاشية (cellule végétative)، وخلية أخرى صغيرة تدعى الخلية المولدة أو النواة التكاثرية(cellule générative) التي تنتقل إلى داخل حبة الطلع. حبة الطلع ثنائية الخلية تمثل عروس نباتية غير ناضجة. عند حوالي ثلثي أنواع مغطاة البذور تتحرر حبوب الطلع من المئبرفي هذه المرحلة ثنائية الخلية (شكل18). في بعض الأنواع الأخرى النواة المولدة تنقسم قبل أن تتحرر حبة الطلع وتعطي جاميطتين ذكريتين (نطفتين ذكريتين) وبذلك نتحصل على نبات عروسي مذكرثلاثي الخلايا (microgamétophyte tricellulaire).

حسب الأنواع، يمكن لحبة الطلع أن تحتوي على النشاء أو الليبيدات وتكون كغذاء للحيوانات.

تختلف حبوب الطلع بشكل معتبر من ناحية الحجم والشكل، قطرها قد يتراوح من 20 إلى 250 ميكرومتر. كما يوجد فرق في عدد وتوضع ثقوب الإنبات التي من خلالها ينتش الأنبوب الطلعي. ثقوب الإنتاش هذه يمكن أن تكون متطاولة (الأثلام sillons)، دائرية(ثقوب pores)، وقد نجد الإثنين. نستطيع تحديد معظم العائلات، الكثير من الأجناس وعدد كبير من الأنواع فقط من خلال حبوبها للطلع بالإعتماد على معاييرمثل الحجم، عدد ونوع ثقوب الإنتاش وزخرفة الغشاء الخارجي Exine (Raven et al.,2007).



شكل 18. تركيب حبوب الطلع(Laberche,2010)

أما الكرابل تمثل العضو المؤنث للزهرة. مجموع الكرابل يعطي المدقة أو المتاع ويمثل هذا الأخيرالمحيط الزهري الأخير والداخلي يكون فوق الطلع. يتكون المتاع من كربلة أو عدة كرابل قد تكون حرة أو ملتحمة. تعلو كل كربلة قلم الذي ينتهي بجزء عريض يسمى الميسم الذي يمثل المساحة اللاصقة لحبوب الطلع، و المبيض يضم بويضة أوعدة بويضات وهي مصدر الثماروهو الجزء القاعدي من الكربلة. عند توضع حبة الطلع على الميسم تنتش وتعطي أنبوب طلعي الذي يتخلل القلم حتى يصل إلى المبيض حيث يتم تلقيح البويضة وتعطي البيضة الملقحة، بعد عملية التلقيح تتطور البويضة إلى بذرة (Nabors,2009).

حسب.Raven et al (2007) الأصبغة المسؤولة عن الأزهار في مغطاة البذورهي عموما مشتركة عند كل النباتات الوعائية، لكن تركيزها في الأزهاروخاصة في التويج هي ميزة مغطاة البذور. الأصبغة الأكثر أهمية في تلوين الأزهار هي الفلافونوييدات، أهم فئة تنتمي إلى هذه الأخيرة هي الأنتوسيان وتحتل أصبغتها المرتبة الأولى في تلوين الأزهارمن أهمها Pélargonidine(أحمر)، cyanidine (بنفسجي) و Delphinidine(أزرق) وأصبغة تذوب في الماء تكون موجودة في الفجوات العصارية، أما الكاروتونويد(caroténoides) فهي مسؤولة في كثير من الحالات عن اللون الأحمر، البرتقالي والأصفر للأزهاروهذه الأصبغة تذوب في الزيوت وتكون موجودة في الصانعات، كما توجد مجموعة أخرى من الفلافونوييدات وهي الفلافونول موجودة بكثرة في الأوراق وكذلك في الكثير من الأزهار. بعض من هذه المركبات تكون تقريبا أوكليا شفافة، ولكنها تستطيع أن تساهم في اللون الأبيض للأزهار. عند كل مغطاة البذورأي النباتات الزهرية الألوان المميزة هي نتيجة لخليط متنوع من الفلاونوييدات والكاروتونويد.

معظم الأزهارتحتوي على الأسدية والكرابل هذه تدعى بالزهرة الخنثى (كاملة)، وإذا غابت الأسدية أو الكرابل فتعتبر الزهرة وحيدة الجنس (غير كاملة)، وحسب العضو الموجود فقد تكون الزهرة مذكرة إذا احتوت على أسدية، ومؤنثة إذا احتوت على كرابل(Raven et al .,2007).

وضعية المبيض بالنسبة للأجزاء الزهرية تسمح بتصنيف الأنماط المختلفة للأزهار.عندما تكون الأجزاء الزهرية مثبتة على التخت تحت المبيض تسمى الزهرة السفلية(fleur hypogyne) المبيض يكون علوي (شكل19)، عند الأزهار العلوية (fleur hypigyne) بمبيض سفلي حيث يمتد مباشرة داخل المبيض ويظهر

تحت السبلات، البتلات والأسدية، في حالة الزهرة المحيطية (périgyne) السبلات، البتلات والأسدية تتوضع في منتصف إرتفاع المبيض الذي يسمى بالشبه سفلي وهي حالة وسطية (semi-infére) . (Nabors, 2009)

شكل 19. أنواع الأزهار حسب توضع المحيطات الزهرية على التخت(Nabors, 2009).

VI- 1- بنية وإنتاش البذرة

تنتج البذرة من تطوربيضة ملقحة، وهي تتضمن الجنين و المواد المغذية. تمثل بنية حماية التي تسمح للنبات بمقاومة الظروف غير الملائمة(درجة حرارة قصوى،الجفاف) حيث خلالها يصبح النبات غير قادر على الإنتاش وحتى غير قادرعلى العيش.

توجد البذرة عند مغطاة البذور في داخل المبيض الذي يعتبر جزء بنيوي في الزهرة. بعد التلقيح تتحول البويضة إلى بذرة، وجدار المبيض يتحول إلى ثمرة. شكل وبنية الثمرة تكون متنوعة ومميزة للأنواع بسبب الخصائص التي تحملها. تحمي الثمار البذور التي يتطور بداخلها الجنين من الجفاف، الأمراض والحيوانات المفترسة. الثمار تساعد على إنتشار البذوربواسطة الحيوانات التي تنقلها لأنها ملونة وحلوة المذاق، وتعغن الثمار الناضجة يكون سماد جيدلإنتاش البذور(كما تنتشر البذور بواسطة الماء والرياح، كم تملك الثمارنظام إنفتاح إنفجاري يسمح بنشر بذورها)(Nabors,2009) .

تحتوي الثمار على جدار أو ما يعرف بالغلاف الثمريPéricarpe ويتكون من ثلاثطبقات:

الطبقة الخارجية وتسمى Exocarpe، الطبقة الوسطى Mésocarpe والطبقة الداخلية Endocarpe. قد تكون الثمار لحمية أوجافة، كما قد تكون بسيطة تتكون إنطلاقا من كربلة بسيطة أو من مبيض مركب، مركبة (إنطلاقا من أكثر من كربلة في كل زهرة) أو متعددة (تتشكل إنطلاقا من عدة أزهار). الثمارالبسيطة يمكن أن تكون جافة أو لحمية، الثمار الجافة تستطيع أن تنشق(تنفتح بواسطة شقوق عند النضج) مثل الثمار

القرنية (Legume) ، الجرابية (Follicules)، خردلية(Siliques) و علبية (Capsule) وهذه الأخيرة تنفتح من خط إلتحام كربلتين، أو عن طريق ثقوب في قمة المبيض، وهناك ثمارغير متفتحة(تبقى منغلقة حتى النضج) مثل البرة(الحبة)Caryopses ، البندقة (nucule)، الأكينية(فقيرة)(Akène) ، الثمار الجافة المنشقة (Schizocarpe)،المجنحة (samares). أما الثمارالبسيطة اللحمية فنذكر مثل الحسلة، العنبية(اللبية)والتفاحية(Nabors,2009).

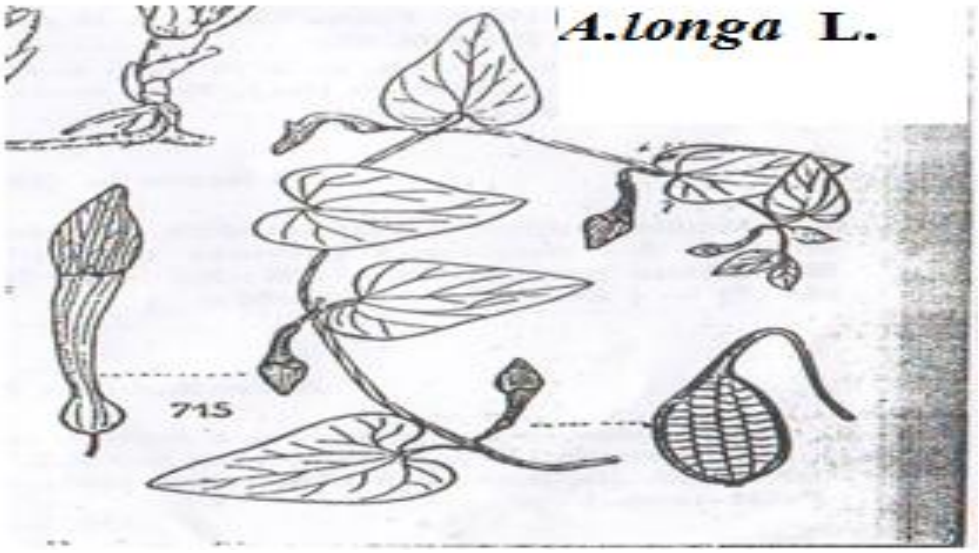
VII- العائلة الزراوندية Aristolochiaceae

من بين العائلات النباتية التابعة لمغطاة البذور، وحدها عائلة Aristolochiaceae تتضمن نباتات عشبية سهلة للزراعة مع مميزات واسعة تمثل بشكل عام مغطاة البذور.

تشمل رتبة Piperales 5 عائلات (Aristolochiaceae، Hydnoraceae، Piperaceae،Saururaceae و Lactoridaceae) التي تضم العديد من أصناف الأعشاب، تعتبرهذه الرتبة المعروفة بتنوعها الوحيد في أشكال النمو من بين أولى سلالات مغطاة البذور. معظم الدراسات الجينية والجزيئية قد قسمت Piperales إلى مجموعة بدون غلاف زهري(Piperaceae وSaururaceae) ومجموعة تحمل الغلاف الزهري (Aristolochiaceae، Lactoridaceae و Hydnoraceae)، في هذه المجموعة الأخيرة نجد الأجناس التالية: *Asarum*،*Saruma* ، *Lactoris*، *Hydnora*، *Prosopanche*، *Thottea* و Aristolochia .

تتضمن عائلة Aristolochiaceae 4 أجناس و550 نوع، الأجناس هي كالأتي *Saruma* (أعشاب) ويمثله نوع واحد، *Asarum* (أعشاب) يتضمن حوالي 86 نوع، *Thottea*(شجيري) يضم حوالي 29 نوع وجنس *Aristolochia* الذي يكون غني بالأنواع النباتية يمثله حوالي 450 نوع تكون على شكل عشبي، شجيري،أو متسلق(liane)، وكل هذه الأجناس تستغل تجاريا باستثناء جنس *Thottea*(الأشكال العشبية والشجيرية هي ميزة للجنس التابع لرتبة Piperales الذي لديه غلاف زهري Wagner ; Bliss et al.,2013) .et al.,2014)

حسب Quezel et Santa (1962) النباتات التابعة لعائلة Aristolochiaceae تكون ذات أوراق متناوبة، قلبية الشكل من جهة القاعدة. أزهارها خنثى، يكون الغلاف زهري ملون، غير منتظم، أنبوبية متطاولة في النهاية. لديها 6 أسدية ملتحمة مع القلم. المبيض سفلي، القلم قصير بست مياسم. الثمرة علبية بست حجرات تنفتح بست صمامات وتكون البذور مثلثية الشكل(شكل 20).



شكل 20. نبات جنس *Aristolochia* (Quezel et Santa,1962)

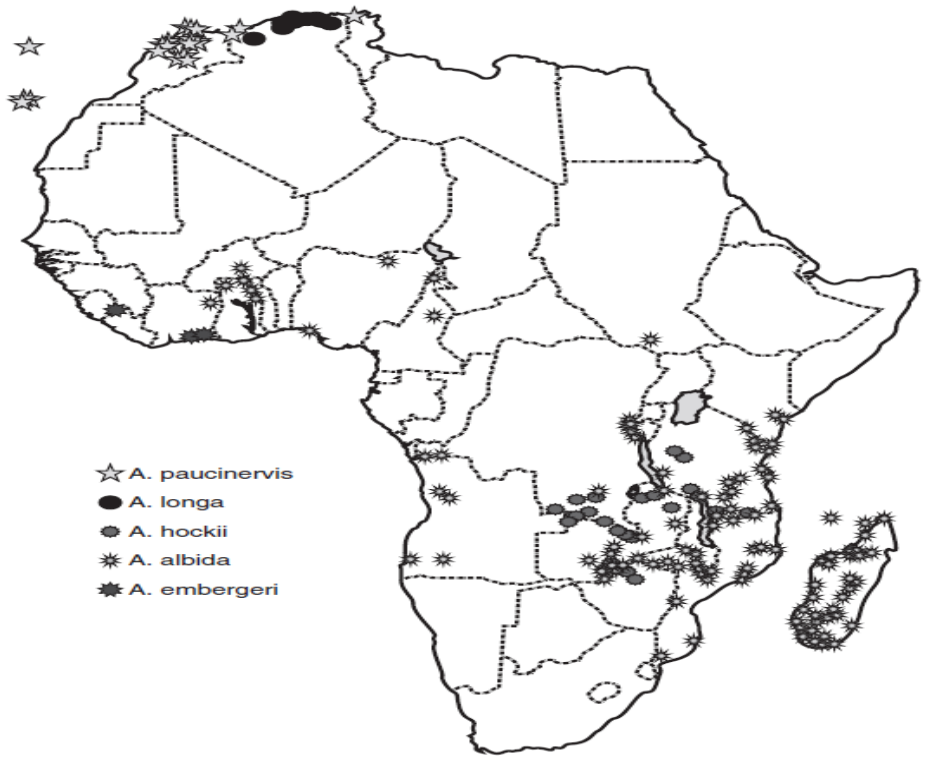
VII-1- جنس *Aristolochia*

تتميزأزهارنباتات جنس *Aristolochia* في محيطها بوجود 6 مئابرتغطيهاالمياسم في مرحلة الأنوثة،أما في المرحلة المذكرة تذبل المياسم وتصبح المآبر قادرة على تحرير حبوب الطلع .

هناك أربع مراجع فقط درست جنس *Aristolochia* ظهرت في العقود الأخيرة تغطي ثلاث مناطق جغرافية كبيرة :مناطق إفريقيا المطلة على البحرالأبيض المتوسط مثل الجزائر والمغرب الأقصى (Maire, 1961; Quézel et Santa, 1962)، غرب إفريقيا الإستوائية(Hutchinson et Dalziel, 1927) وشرق إفريقيا الإستوائية (Verdcourt, 1986). المعلومات غير الكافية حول توزيع هذا الجنس من النبات في جنوب إفريقيا ومدغشقر كان سبب في مراجعة هذا الجنس، وقد أسفرت هذه المراجعة أن أنواع *Aristolochia* في إفريقيا تنقسم إلى مجموعتين، الأولى تمثل أنواع الشرق / وسط / جنوب إفريقيا بما فيها مدغشقر وهي *A. albida*، *A. bracteolata*، *A. heppii* و *A. hockii* والمجموعة الثانية تشمل أنواع شمال إفريقيا (بما في ذلك الجزر الواقعة في غرب إفريقيا) وهي *A. sempervirens*، *A. pistolochia*، *A. paucinervis*، *A. fontanesii* و *A. Baetica* التي تنتمي إلى مجموعة الأنواع الموزعة في منقطة البحر الأبيض المتوسط وتركيا (DE Groot et al., 2006) .

حسب الدراسات يوجد 25 نوع من *Aristolochia* الأكثرإستعمالا خاصة في قارة أسيا وقارة أمريكا أكثر من باقي مناطق العالم، حيث أثبتت الدراسات الجغرافية استعمال هذا الجنس من النبات يكون النصف من طرف قارة أسيا والثلث من طرف قارة أمريكا. أما الاستعمال في إفريقيا قدر بـ (9%)، أوروبا (6.6%) ويرجع هذا النقص في الإستعمال إلى عدة عوامل منها الإختلاف في تواجد هذه الأنواع أو إلى عدم وجود

دراسات ميدانية طبية كافية في إفريقيا (Heinrich et al., 2009). شكل (21) يوضح توزيع أنواع *Aristolochia* في إفريقيا، بما فيها مدغشقروالجزر المجاورة لها.



شكل21. توزيع كل من *A.albida*، *A.embergeri*، *A .hockii*، *A.longa* = (*A. fontanesii*) و*A.paucinervis* في إفريقيا (DE Groot et al., 2006)

حسب المنظمة العالمية للصحة (WHO) سنة 2007 يستعمل جنس *Aristolochia* (Aristolochiaceae) في الطب الشعبي.

أنواع *Aristolochia* كثيرا ما ذكرت كنباتات طبية مهمة في الدراسات الإثنوطبية. عموما، أنواع هذا الجنس لديها تاريخ طويل في الاستعمال الطبي في أوروبا، أسيا(بما فيها الصين)، إفريقيا وأمريكا الوسطى وكذلك في الطب المكسيكي الشعبي (Heinrich et al.,2009).

*Aristolochia*هوالجنس الأكثر تنوعا في عائلة Aristolochiaceae، يتضمن أنواعا منتشرة عبر المناطق الإستوائية وشبه إستوائية. كل أنواع *Aristolochia* التي تمت دراستها حتى الآن يتم تلقيحها عن طريق حشرات متعايشة من عائلات مختلفة، التي تنجذب إلى الأزهار عن طريق رائحتها. أزهار العديد من الأنواع لديها آلية إقتناص–إفراج. الأزهار تجذب وتسجن الملقحات خلال مرحلة الأنوثة في أول يوم من الإزهار وتحررها بعد إنفتاح المآبر.

أزهارها غير منتظمة مختلفة من ناحية الحجم، الشكل واللون. الغلاف الزهري لديه فقط ثلاث سبلات تكون متحدة على شكل كأس أنبوبي، حيث نستطيع أن نميز ثلاث مناطق، وهذاما جاء به أيضا Friedel (1921) في وصفه لزهرة *Aristolochia*.

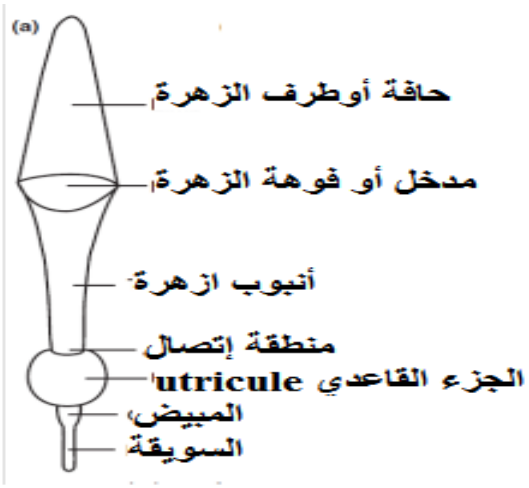
الجزء القاعدي من الغلاف الزهري يكون عبارة عن غرفة منتفخة (utricule) تحيط بالأقلام، المياسم والمآبر المتحدة(Gynostéme). الجزء القاعدي (utricule) يتصل بأنبوب ينتهي بطرف عريض، الذي يكون غالبا ملون لجذب الملقحات(شكل22 (a)) . تشهد أزهار*Aristolochia* درجة من التنوع في قطر أنبوبها الصغير وأيضا في المسافة بين جدار الأنبوب وأجزاء التكاثر المركزية.

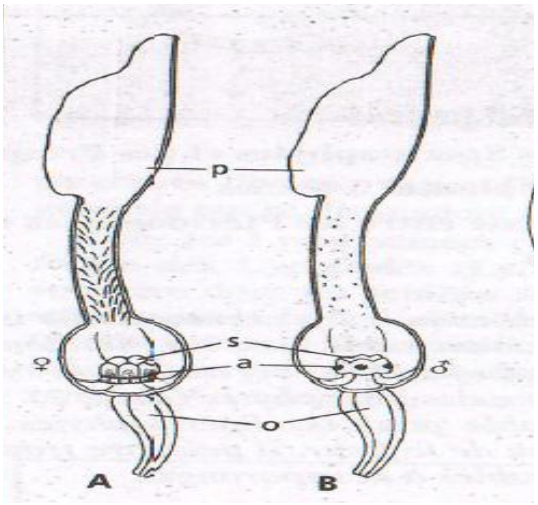
عملية اقتناص الحشرات لضمان التلقيح هي واحدة من أكثر الآليات المتطورة والمتخصصة في التفاعل بين الحشرات والنبات. من الناحية الوراثية، تمثل Aristolochiaceae أول سلالات مغطاة البذورالتي لديها أزهار مصيدة، تساهم في هذه الآلية شعيرات متخصصةpoils périanthaire (trichomesou).

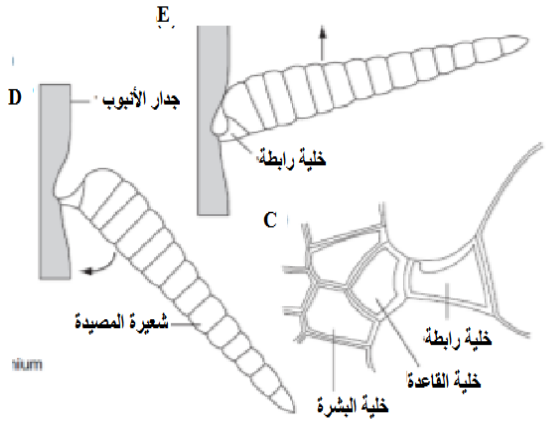
في حد علمنا، جنس *Aristolochia* (Aristolochiaceae)، فرد من مغطاة البذوروهي أول مجموعة في النبات التي تستعمل بشكل واسع آلية الاقتناص على مستوى الأزهاروإمكانية استهداف الملقحات. ممثلي جنس *Aristolochia* معروفة جيدا بسبب أزهارها الخاصة، التي تجذب الملقحات بواسطة رائحتها، حيث تكون أزهارها مبكرة الأنوثة protogynes و اليوم الذي يتم فيه إنفتاح الأزهار، ينجذب الذباب في المقام الأول عن طريق الرائحة، ويتم اقتناصه وحجزه داخل الزهرة(utricule) بواسطة شعيرات الغلاف الزهري وبذلك يكون الذباب في إتصال مع المياسم أين يضع حبوب الطلع التي كان يحملها من خلال زيارته لأزهار أخرى(شكل 22مرحلةA). في اليوم الثاني، تنفتح المآبر(anthéres) ويتم الإفراج عن الذباب مع حمولة حبوب اللقاح التي يمكن له أن ينقلها من مآبر الزهرة نفسها(شكل22 مرحلةB)، حيث شعيرات الغلاف الزهري تصبح غيروظيفية وتذبل (شكل 22مرحلة D)، بما أن الملقحات تنتمي إلى الحشرات المتعايشة saprophages، يعتبر نظام التلقيح هذا بالخادع.

عائلة الحشرات الملقحة والتي تنجذب إلى الأزهار تنتمي إلى رتبة Diptera، وهي متنوعة منها Anthomyiidae، Chloropidae، Milichiidae، Phoridae، Sarcophagida وSyrphidae

(Gorenflot,1997 ;Sakai,2002 ; Oelschla¨gel1et al.,2009).







شكل 22 . الشكل المورفولوجي لأزهار الـ Aristolochia (o: المبيض، a: المئبر، s: الميسم)
(Gorenflot,1997 ; Oelschla¨gel1et al.,2009).

وقد أشارTheron (1964) أن التلقيح المباشرعند نباتات الـ Aristoloches جد صعب، حيث الأسدية التي تكون ممثلة فقط بمآبرها تكون مثبتة من ناحية الظهرعلى الأقلام القصيرة جدا. وهذا التركيب التشريحي والفيزيولوجي يمنع التلقيح الذاتي، وتصبح الأزهارثنائية الجنس تفضل التلقيح غير المباشر خاصة التلقيح عن طريق الحشرات.

VII-1-1- تصنيف جنس *Aristolochia*

يتضمن جنس *Aristolochia* حوالي 450 نوع تصنف في ثلاث تحت أجناس (sous-genre):

Aristolochia، *Siphisia*(كانت سابقا نعتبرها تحت الجنس *Isotrema*) و *Pararistolochia*.

تحت الجنس *Aristolochia* يتضمن تقريبا 350 نوع معظمها خشبية إستوائية متسلقة، لكن العشبية منها التي تتضمن أنواع منطقة البحر الأبيض المتوسط هي أيضا معروفة. ثاني أكبر تحت جنس *Siphisia*(تقريبا 70 نوع) يوجد في قارة أسيا وكذلك في شمال و أمريكا الوسطى وتكون على شكل أنواع عشبية، شجيرية ومتسلقة. أصغر تحت جنس هو*Pararistolochia* (تقريبا 35نوع) موزعة في أستراليا

وإفريقيا وتتضمن حصريا الأنواع المتسلقة. صفة وجود الغلاف الزهري الخاصة بـ*Aristolochia* تكون أيضا عند أزهار شجيرات (Thottea تقريبا 44 نوع،Lactoris نمط واحد) أو أعشاب معمرة (Asarum 85 نوع، Saruma نمط واحد) أو Prosopanche وHydnora (Wagner et al.,2014).

أفراد جنس *Aristolochia* لديها أصغرحجم للجينوم المعروف حاليا. لكن لديها عدد كبير من الكروموزومات. و عند عائلة Aristolochiaceae لم نلاحظ علاقة مباشرة بين عدد الكروموزومات وحجم الجينوم.

الأنواع التابعة لتحت الجنس *Isotrema* تتميز عموما بـ 2ن= 32صبغي ولديها جينوم صغير الحجم (554 – MPb 774)، ضمن تحت الجنس Pararistolochia(MPb4321-1793) ، وهي تمثل المجموعة الشقيقة لتحت الجنس Aristolochia ولهذا فهي تدخل ضمن الأنواع التي لديها جينوم صغير الحجم، الزيادة في جحم الجينوم ليست مرتبطة بالزيادة في عدد الكروموزومات أو الصبغيات ولكن مرتبطة بحجمها(Bliss et al.,2013).

عموما، أنواع هذا الجنس لديها تاريخ طويل في الإستعمال، حيث عرفها Theophrastus(تلميذ أرسطو) قبل 300 سنة قبل الميلاد، حيث وصفها بأنها نباتات ذوقها مر، لديها عدة استعمالات وهي جيدة لعلاج جروح الرأس، جروح أخرى وحتى قرحة المعدة، تستعمل ضد لدغات الأفاعي، تحث على النوم(الأرق)، تطهر الرحم كما تستعمل في حالة الإمساك وأيضا في حالة الإلتهاب والإنتفاخ، تساعد على الولادة ويسمى الأفضل للولادة. لبعض الاستعمالات ينقع في الماء ويستعمل ككمادات، وفي استعمالات أخرى يستعمل كمسحوق ويخلط مع العسل وزيت الزيتون(تستعمل ككمادات). أما من أجل لدغة الأفاعي فإننا ننقعها في الخل، من أجل الحث على النوم تأخذ كمسحوق في الليل(Scarborough,2011). كما تستخدم أنواع *Aristolochia* أيضا في التئام الجروح ولديها نشاطية مضادة للإلتهاب، كما أثبتت الدراسات استعمالها ضد السعال، ضد مختلف التهابات الجهاز التنفسي والتهاب الشعب الهوائية، الكثير من الاستعمالات تدخل تحت فئة متنوعة و التي تضمنت استخدام هذا الجنس في علاج السرطان(Heinrich et al.,2009).

تستخدم أيضا على نطاق واسع في الطب الشعبي الصيني. وظائفها البيولوجية متنوعة تتضمن التخفيف في ارتفاع ضغط الدم، تحسين الكريات الدموية البيضاء، التخفيف من الروماتيزم، علاج الإلتهاب، مسكن للآلام ومدر للبول. مختلف الأنواع كانت تستخدم في الأدوية العشبية منذ العصور القديمة لعلاج لدغات الأفاعي، الجروح المتقيحة، الأورام وأنها لا تزال قيد الاستعمال خاصة في الادوية العشبية الصينية(Latha et al.2015).

VII-2-النوع *Aristolochia longa* L.

وصفه Quesel et Santa سنة (1962) بأنه نبات حولي ذوسيقان مستقيمة، مرتفعة أكثر من 60 – 80 سم ناتجة من درنة ترابية، ولديه غلاف زهري أنبوبي مستقيم. وهوتابع لجنس *Aristolochia*وعائلة

Aristolochiaceae، ويصنف نبات *Aristolochia longa* L. إلى تحت نوعين هما ssp.Paucinervis(pomel)Batt. و ssp.Fontanesii(Boiss et Reut)Batt. حيث هذه الأخيرة تكون أكبر بقليل من الأولى من ناحية طول الغلاف الزهري وحجم الأوراق.

كما ذكر De Groot et al. (2006) أن العديد من الأصناف المتواجدة في منطقة غرب البحر الأبيض المتوسط كثيرا ما تسمى *A. longa* و خاصة *A. fontanesii* (*A. longa = A. fontanesii*) و كذلك نجد *A. paucinervis*(شكل 21)، وهي أنواع متوطنة في الجزائر، حيث في النوع الأول يكون العدد الصبغي غير معروف ،أما *A. paucinervis* فيكون العدد الصبغي $2n = 36$.

VII-2-1 التسمية المحلية

الأرسطولوخيا باليونانية معناه الفاضل للمرأة النفساء و هو الزراوند بأنواعه الثلاثة الطويل والطيب والمدحرج. يسمى عندنا : برزطم، برستم، عنق الجمل، زروان الطويل، فقوس الغول، بوبرالة، قثا الحية. وبالأمازيغية : أجررخى . ذكر إبن البيطار: الزراوند هو المسمقورة أو المسمقار عند أهل الأندلس وسجرة رسم بالبربرية . الزراوند على أنواع والمستعمل في الطبابة هو المدحرج *Aristolochia rotunda* وهو الأنثى ، الزراوند الطويل*Aristochia longa* وهو الذكر و الزراوند الطيب *Aristolochia clematitis*.وقد ذكر الزراوند كل من إبن سينا، الأنطاكي،أبو القاسم الغساني وغيرهم، مما يظهر أن العشبة مستعملة منذ القديم (حليمي ،1997) .

وحسب Quesel et Santa(1962) فإنه يطلق إسم قثا الحية على*Aristochia longa* L.، الزراوند بالنسبة*Aristochia altissima* Desf. وبالي-ليتا (Beli litha) بالنسبة لـ *Aristochia baetica* L.

الجزء المستعمل هو الدرنات بعد التجفيف (تكون سامة وهي طازجة). من مركباتها الفعالة نذكر مواد الدباغة(tanins)، الراتنجات(résines)، المواد المرة والقلويدات و الزراوندين (aristolochine) (حليمي, 1997 ;Baba aissa, 2011).

VII-2-2-التصنيف (EURO – MED,2016)

المملكة: Plantae

قسم أو شعبة : Tracheophyta

تحت شعبة : Spermaphytina

الصنف : Magnoliopsida

فوق الرتبة :Magnolionae

الرتبة :Piperales

العائلة أو الفصيلة : Aristolochiaceae

الجنس : *Aristolochia*

النوع : *Aristolochia longa* L.

VII-2-3-الإستعمال الطبي

يستعمل هذا النوع من النبات.*Aristolochia longa*L لأغراض متعددة، الجزء المستعمل هو الجذور،كما يطلق عليها اسم الريزوم أودرنة، حيث تستعمل جذور.*Aristolochia longa*L ضد لدغات الأفاعي، وتستعمل من طرف المرأة النفساء لتطهير الرحم، كما تعطى للأطفال من أجل مرض الكساح والوقاية من التهاب المفاصل(Heinrich et al.,2009). كما تستعمل *Aristolochia longa* في علاج مرض السكري، والجزء المستعمل هو الريزوم على شكل مسحوق

(Ghourri et al.,2013)، أما Lahsissene et al. (2009) فقد بين أن مغلى الجذوريستعمل ضد الإلتهابات المعوية، التسممات الحادة، تسبب الإجهاض عند المرأة. كما يوصف هذا النبات كمسكن، مدر للطمث و مدر للحليب. لكن عند الجرعات العالية، يعتبر ها النبات سام. كما تخلط الجذورمع العسل وتأخذ عن طريق الفم لعلاج مرض السرطان حسب Kabbaj et al. (2012).

وقد أستطاع Cherif et al. (2009) في دراستة أن يعزل حمض الأرستولوشيك AAI من أوراق ودرنات نبات *Aristolochia longa* باستعمال جهاز المطياف (spectrométrie IR) وHPLC. وقد ذكر Benarba et al. (2014)أن هذا النبات *A. longa*يستعمل بشكل واسع كعلاج لمرض السرطان في الجزائرو المغرب الأقصى. وقد أثبت حديثا أن المستخلصات المائية لـ*A. longa* تحدث الموت الخلوي لخلايا سرطان الغدد الليمفاوية BL41 (Burkitt's lymphoma cell line) بطريقة تعتمد على الجرعة. وقدرت IC50 المستخلصات المائية لـ *A. longa* بـ15,63 μg/mL من خلال التأثيرعلى مسارالميتوكوندري. لكن عند النساء اللواتي بلغن سن اليأس وأصيبن بمرض سرطان الثدي حديثا، فإن أخذ جذور*A. Longa* يكون ضار لوظائف الكلى ويؤدى إلى ارتفاع هشاشة العظام، قد يرجع هذا إلى انخفاض وظائف الكلى بسبب حمض الأرستولوشيك الموجود في الجذور. كذلك قد أثبتت.benzakour et al (2012) أن *Aristolochia longa* تستعمل بشكل واسع في المغرب لعلاج السرطان، لكن .خلال علاج السرطان لوحظت 16% من حالة الفشل الكلوي عند المرضى الذين يعانون من الأورام الخبيثة. علاوة على ذلك، عندما يأخذ عن طريق الفم، المستخلص المائي لـ *Aristolochia longa* يسبب آثار سمية شديدة مع آفات في الأنسجة لا رجعة فيها وخاصة في الرئتين والكلى والكبد. ولكن حسب ما أفاد حليمي (1997) أنه يستخرج من الزراوند جوهر حجالي فعال يدعى الزراوندين، قليله مقو نافع، وكثيره سم قاتل، كما أفاد Lahsissene et al. (2009) أن هذا النبات سام عند الجرعات العالية.

VIII- حمض الأرستولوشيك Acide aristolochique

حمض aristolochique (AA) الحامل لمجموعة الأزوت ينتج بشكل واسع في العديد من نباتات التابعة لـعائلة Aristolochiaceae. حسب ما ذكر DE Pascual et al. (1983) فإن هذا الحمض يزيد من عملية البلعمة للكريات البيضاء، ولديه نشاطية مثبطة لمرض السرطان. وأنه في ذلك الوقت كل المحاولات

لتصنيع هذه الأحماض قد باءت بالفشل للحصول على طريقة فعالة لاستعمالها على الصعيد الصناعي. وأن المصدر الوحيد لهذه المركبات هو النبات نفسه. لكن في الوقت الحالي ومع ظهور بعض الأمراض عند تناول النباتات الطبية فقد أشارت.Nacsa-Farkas et al (2014) أن أنواع *Aristolochia* تستخدم في الطب التقليدي على الرغم من أن حمض aristolochique له تأثير سام على الخلايا و يمكن أن يسبب الفشل الكلوي المزمن، ومن المفترض أن يكون لهذا الحمض خصائص مضادة للميكروبات، وقد ثبت في عام 1992 بأن أحماض AA كانت مسؤولة عن ظهورمرض اعتلال الكلية. كما ارتبطت أنواع هذا النبات باعتلال الكلية أساسا في الصين والدول الأوروبية، وقد أصبح من المهم دراسة ما إذا كان اعتلال الكلية يحدث في أجزاء أخرى من العالم أيضا، أين يشيع استعمال هذا النبات في أمريكا الوسطى والهند أيضا(Latha et al.,2015). وقد أوضح .Debelle et al (2009) أناعتلال الكلية بسبب الأحماض الأرستولوشية يحدث على المستوى النسيجي التليف الخلوي وضمور كبير للأوعية.

بالرغم من المخاوف الأخيرة حول السمية المرتبطة بـ AA في أنواع *Aristolochia*المستخدمة في الطب التقليدي في وسط وجنوب أمريكا أو أفريقيا فإنها لا تزال غير واضحة(Heinrich et al.,2009).

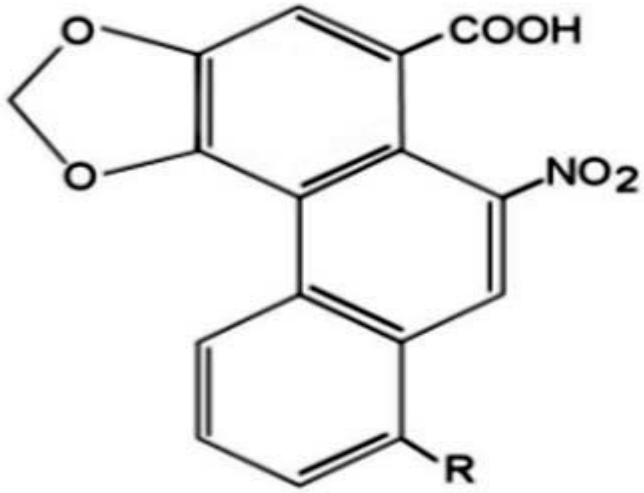
تحتوي أنواع *Aristolochia* على حمض الأرستولوشيك ،الأستر،aristolactams ،aporphines ، protoberberines،isoquinolines ،benzylisoquinolines ،steroids وغيرهم من المركبات التي لديها نشاطية فيزيولوجية واسعة. حاليا الأبحاث تدور حول تسمم الكلى بسبب أنواع *Aristolochia*.. وهناك حاجة إلى تقييم منهجي من محتوى الأحماض aristolochique في الأنواع الأكثر استخداما على نطاق واسع لتقييم ما إذا كان استعمالها يشكل خطرا محتملا على الصحة (Latha et al.,2015).

يختلف محتوى حمض الأرستولوشيك (AA) حسب نوع، جزء النبات (جذر،ساق،ورقة)، موسم الجني، وطريقة التحضير. الأحماض الأرستولوشية ($C_{17}H_{11}NO_7$) هي أحماض كربوكسيلية نتروفنونتران(acides carboxyliques nitrophe´- nanthre`nes)، تنتمي إلى مجموعة الهيدروكربون العطرية متعددة الحلقات(شكل23). مجموعة الأزوت لديها القدرة على الإرتباط مع الجزيئات البيولوجيةالكبيرة حيث تتميز بنشاطية ألكيلية(activite´ alkylante). أشهر هذه الأحماض حمض أرستولوشيك I(AA I) أو (AA A) ويسمى

8-me´thoxy- 6-nitrophenanthro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxylique

وحمض الأرستولوشيك II (AA-II)(أوAA B) وهو

6-nitrophenanthro-(3,4-d)1,3-dioxolo-5- carboxy- lique. على العموم،AA-I ،AA-I صعب الفصل بينهما بسبب التشابه الكبير بينهما في البنية وفي النشاطية الطبية(Nortier et al., 2015).



شكل23. الأحماض الأرستولوشية (AI وAII)، I (R = OCH3)، II (R = H) (Debelle et al.,2009)

أيض الأحماض الأرستولوشية معقد جدا ولحد الآن هو غير معروف بشكل كامل. كما تتدخل عدة أنزيمات خاصة بالكبد والكلى. وجود عدة نواقل للشوارد السالبة العضوية(anions organiques) في الكلية يمكن أن توضح التوضع المفضل في الكلى والمسالك البولية للتأثيرات السمية للـ AA، حيث بينت التجارب المخبرية أن الأحماض AA يتم إلتقاطها من الأوعية الدموية(أي الشعيرات الدموية المحيطة بالأنابيب) نحو داخل الخلايا بواسطة نواقل للشوارد السالبة العضوية الموجودة في الكلية.

كما هناك تجارب أثبتت اعتلال الكلية بسبب أحماض الأرستولوشية، وتأكد العلاقة بين أخذ AA وتطور تسمم الكلى الحاد والمزمن، الذي يتطور إلى سرطان المسالك البولية، بعد وجود ADN مصاب في عينات أنسجة الأشخاص المصابة(Nortier et al., 2015) .

يتم الكشف عن حمض الأرستولوشيك في المستخلصات النباتية بواسطة تقنيتين :TLC (Thin-Layer Chromatographic) ويتم الكشف عن الحمض بواسطة مواد كيميائية، وكذلك تقنية HPLC مع الأشعة فوق البنفسجية وجهاز مطياف الكتلة (HPLC/UV) (Ioset et al.,2003).

الجزء العملي

مواد و طرق العمل

I - المواد

I-1-المواد النباتية

تم جمع النبات .*Aristolochia longa* L في ماي 2011 من عين السبت تقع شمال ولاية سطيف على بعد 80 كم عن ولاية سطيف. تم التأكد من تسميتها بالاستعانة بكتاب النباتات الخاص بالجزائر المنجز من طرف Quezel et Santa (1962).

I-2- المواد الكيميائية والأجهزة

المواد الكيميائية من صنع شركة Sigma-Aldrich.

I-3- فئران المخبر

تم اقتناءها من طرف معهد باستور بالجزائر العاصمة.

II-الطرق التجريبية

II-1– الدراسة الأثنوطبية لنبات *Aristolochia longa L.*

من أجل التعرف على مدى استعمال هذه النبتة وكيفية تحضيرها على مستوى منطقة سطيف وضواحيها (عين المان،صالح باي ،اوريسيا،بوقاعة وعموشة)،تم إنجاز تحقيق ميداني مع مئة شخص (100) لهم علاقة بالتداوي بالأعشاب (كبار السن والعشابين)،يوجد نموذج التحقيق الميداني في ملحق رقم 1.

II-2-الدراسة المورفولوجية و التشريحية لنبات *Aristolochia longa L.*

قمنا بدراسة مورفولوجية أي ملاحظة الشكل الخارجي لكل أجزء النبات، ثم دراسة تشريحية الهدف منها التعرف على مختلف الأنسجة الموجودة و المقارنة فيما بينها، كذلك التعرف على الشعيرات والغدد الإفرازية إن وجدت، ولهذا الغرض تم اختيار أجزاء نباتية فتية تشمل الجذور، السيقان، الأوراق والدرنات الفتية لإنجاز مقاطع من أجل الدراسة. كما تم عمل مقاطع طولية وعرضية على مستوى الزهرة.

II-2-1-تحضير المقاطع النباتية للدراسة التشريحية

تم اختيار أجزاء نباتية فتية من جذور، السيقان و الأوراق كما ذكر سابقا من أجل عمل مقاطع بطريقة يدوية أو بواسطة جهاز الميكروتوم (microtome) وإتباع طريقة التلوين المضاعف حسب بوغديري (2000) وفق الخطوات التالي :

1- وضع الجزء النباتي بين شقي لب البيلسان ان كان جذر، ساق أو ورقة .

2- تحضير مقاطع رقيقة جدا باستعمال شفرة حلاقة حادة.

3- وضع المقاطع في غرابيل أو مصفاة خاصة وتوضع هذه الأخيرة بدورها في الماء لتفادي جفاف المقاطع النباتية لحين استعمالها.

4- القيام بتلوين المقاطع باستعمال طريقة التلوين المضاعف المتمثلة في الخطوات التالية:

- توضع المقاطع في ماء جافيل لمدة 20 دقيقة .
- تغسل جيدا بالماء المقطر
- توضع المقاطع في حمض الخل المخفف (10%) مدة دقيقتين.
- توضع المقاطع في أخضر اليود مدة (2-3) دقائق
- الغسل الجيد بالماء المقطر
- توضع المقاطع في أحمرالكارمن الشبي من 15 إلى 20 دقيقة
- الغسل الجيد بالماء المقطر
- فحص المقاطع تحت المجهرالضوئي بتكبير 100 ثم 400 X

II-3 تحضير المستخلصات

II-3-1تحضير المستخلص المائي

يوضع 20غ من جزء النبات المراد استخلاصه المجفف والمسحوق ، الجزء الهوائي(الأوراق و السيقان)، الجزء الترابي (الدرنات) و الثمار في الماء المغلى(250ملل) ويترك لمدة 10د من أجل الغلي، ثم يبرد لمدة 15د قبل أن يرشح عبر ورق الترشيح، في الأخير يركز المرشح في جهازالتبخيرالدوراني (Rotavapor BUCHI) (Belhattab et al.2004).

II-3-2 تحضير المستخلص الأسيتوني

تمت عملية استخلاص 20غ من جزء النبات المراد استخلاصه الجزء الهوائي (الأوراق و السيقان، الجزء الترابي (الدرنات) و الثمار، بواسطة 300ملل من الأسيتون باستعمال جهاز السوكسلي (Soxhlet)لمدة 6 ساعات، المستخلص المتحصل عليه يركز بواسطة جهاز التبخير الدوراني (RotavaporBUCHI) (Belhattab et al.2004).

II- 3-3 تحضير المستخلص الميثانولي

تنقع 20غ من جزء النبات المراد استخلاصه الجزء الهوائي (الأوراق و السيقان)، الجزء الترابي (الدرنات) و الثمار، في 100ملل من محلول هيدروكحولي من الميثانول 80% (v/v) في درجة حرارة الغرفة، بعد 48سا نرشح و الراسب المتبقي ينقع مرة ثانية في 50ملل من المحلول الأول لمدة 24سا ثم يرشح ،نركز الرشاحة المتحصل عليها في جهاز التبخير الدوراني بدرجة 40م°، ولفصل الليبيدات نغسل المستخلص المحصل عليه 3 مرات بـإيثر البترول (éther de pétrole)،ثم نمر إلى المرحلة الأخيرة وهي مرحلة التنقية باستعمال أسيتات الإيثيل (Acétate d’éthyle) في وجود 20% من كبريتات الأمونيوم (sulfate d’ammonium) و 2% حمض فوسفوريك(acide phosphorique)، ثم نرشح باستعمال ورق

الترشيح في وجود كبريتات الصوديوم الجاف من اجل التجفيف، و في الأخير نمررالرشاحة في جهاز التبخير الدوراني(RotavaporBUCHI) 40 م°. وبهذه الخطوات نحصل على المستخلص الفينولي النقي (Djeridane et al .2006).

يتم حساب مردود كل مستخلص بالطريقة التالية:

$$\text{المردود} = \frac{\text{وزن المستخلص النباتي الجاف}}{\text{الوزن الجاف للنبات}} \times 100$$

بعد ذلك تحفظ المستخلصات المحضرة بعيدا عن الهواء في درجة حرارة 4 م°إلى غاية الاستعمال.

II-4- التحليل الكيميائي للنبات Analyse phytochimique

II-4 -1 التحليل النوعي Analyse qualitative

اعتمدت الطرق اللونية من أجل الكشف عن المستقلبات الأولية والثانوية المنتجة من طرف هذا النبات (الدرنات، الجزء الهوائي والثمار) :

- **الكشف عن الفينولات الكلية**

يغلى 0,5غ من مسحوق نبات .*Aristolochia longa* L في 20 ملل من الماء المقطر، ثم ترشح بواسطة ورق الترشيح.تضاف 5% (w/v) من $FeCl_3$ إلى الرشاحة، يستدل على وجود هذه المركبات بظهور لون بني مخضرأو أزرق مسود(Rai et al., 2013).

- **الكشف عن الفلافونويدات**

للتأكد من وجود الفلافونويدات في مسحوق نبات .*Aristolochia longa* L، نضع 0,5 غ من المستخلص الجاف في 10ملل من الماء المقطر، ثم نضيف 5ملل من الأمونيا المخففة إلى رشاحة المستخلص المائي مع إضافة 1ملل من حمض الكبريتيك المركز (H_2SO_4)، ظهور اللون الأصفر دليل على وجود الفلافونويدات (Wadood et al.,2013).

- **الكشف عن مواد الدباغة**

نضيف 5ملل من الماء المقطرإلى 0,5غ من مسحوق النبات، نرج جيدا ثم نضيف بعض قطرات من كلوريد الحديد($FeCl_3$) 10% .ظهوراللون الأزرق المسود، الأخضر، أو الأخضر المزرق دليل على وجود مواد الدباغة (Sahu et al.,2012).

- **الكشف عن التربونويدات**

نضع 0,8غ من مسحوق النبات في أنبوب اختبار ونسكب عليه 10ملل من الميثانول نرج المحلول جيدا ثم نرشح، ونضيف إلى 5 ملل من الرشاحة 2 ملل من الكلوروفورم مع الرج الجيد ثم في الأخير نضيف 3ملل من حمض الكبريتيك(السلفوريك).ظهور اللون البني المحمر دليل على وجود التربونوييد في المستخلصات النباتية المختبرة (Wadood et al.,2013).

- **الكشف عن القلويدات**

أ- نضع 200 مغ من المادة النباتية في أنبوب إختبار ونضيف 3ملل من الهكسان(hexane) نخلط ونرج جيدا ثم نقوم بالترشيح .بعد ذلك نضيف إلى هذه الرشاحة 5 ملل من حمض كلوريد الماء HCl 2%، ثم نسخن الخليط ونرشحه، بعد الترشيح نضيف بعض قطرات حمض البيكريك (acide picric) إلى الخليط.تكوين راسب أصفر اللون يدل على وجود القلويدات (Wadood et al.,2013).

ب- نضع 5غ من المادة النباتية في أنبوب اختبار ونضيف إليها 20 ملل من الميثانول، يتم تسخين الخليط بواسطة حمام مائي حتى الغليان لمدة دقيقتين. ثم بعد التبريد نرشح ثم نضيف إلى 5 ملل من الرشاحة قطرات من كاشف wagner (محلول الإيودين ومحلول بوتاسيوم الإيوديد). ملاحظة راسب يدل على وجود القلويدات (Chinedu et al.,2013).

- **الكشف عن الصابونين**

نضع 200 مغ من المادة النباتية في 10ملل من الماء المقطر، ثم يتم الترشيح بعد الرج الجيد. نأخذ 0,5 ملل من الرشاحة ونضيف إليها 5ملل من الماء المقطر نقوم بالرج، بقاء الرغوة دليل على وجود الصابونين (Parekh et al.,2006).

- **الكشف عن الكينون**

تغلى 0,5غ من مسحوق النبات في 20 ملل من الماء المقطر، ثم نرشح بواسطة ورق الترشيح. نأخذ 1 ملل من الرشاحة ونضيف إليها 1 ملل من حمض الكبريتيك (H_2SO_4)المركز، ملاحظة اللون الأحمر دليل على وجود الكينونات(Vijayalakshmi et Ravindhran,2012).

- **الكشف عن الأنتراكينون**

نأخذ 1ملل من الرشاحة المحضرة سابقا (الخاصة بالكشف عن الكينون) ونضيف إليها بعض قطرات من حمض الكبريتيك (H_2SO_4)2%، ظهور راسب أحمر دليل على وجود الأنتراكينون (Vijayalakshmi et Ravindhran,2012).

- **الكشف عن السكريات المرجعة**

نضع 0,5 غ من المادة النباتية في 5ملل من الماء المقطر، ثم نضيف 1 ملل من الإيثانول .بعد ذلك نقوم بتسخين خليط من 1ملل من محلول فهلنك A و1ملل من محلول فهلنك B حتى الغليان ثم نسكبه على المستخلص المائي الإيثانولي. عند ملاحظة حدوث تفاعل لوني يعتبر نتيجة إيجابية(Wadood et al.,2013).

- **الكشف عن البروتينات**

تفاعل الأكزنتوبروتوييك(réaction xanthoprotéique): 5ملل من الرشاحة المتحصل عليها من غلي بعض الغرامات من المادة النباتية، يتم تسخينها مع بعض قطرات من حمض النيتريك (acide nitrique)،

اللون الأصفر الذي يتغير إلى برتقالي عند إضافة قاعدة (مثل NaOH)، دليل على وجود البروتينات (Chinedu et al.,2013).

II-4-2 - التحليل الكمي Analyse quantitative

II-4-2 -1- تقدير الفينولات الكلية

يتم تقدير الفينولات الكلية لمختلف المستخلصات بطريقة Folin- ciocalteu حسب طريقة Li et al.,(2007) حيث تعتمد على إرجاع مكونات كاشف Folin- Ciocalteu بواسطة المجاميع الهيدروكسيلية الفينولية، مشكلة ناتجا أزرقا في وسط قاعدي.

نضع 100 µl من كل مستخلص من نبات .*Aristolochia longa* L في أنبوب إختبار، ثم نضيف 500µl من الكاشف Folin- ciocalteu المخفف بالماء المقطر 10 مرات، نحرك جيدا ونترك التفاعل 4 دقائق قبل إضافة 400µl من محلول كربونات الصوديوم (Na2CO3) المحضرة بـ 75 غ/ل. تحضن الأنابيب في درجة حرارة المخبر وفي الظلام لمدة ساعتين، ثم نقرأ الكثافة الضوئية على موجة 765 نانومتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي (spectrophotomètre PRIM SECOMAM). الشاهد الأبيض (le blanc) يحضر بنفس الطريقة السابقة دون إضافة حمض الغاليك.

يستعمل حمض الغاليك (20-200 µg/ml) لتحديد منحنى العيارية، يعبر عن النتائج بعدد المليغرامات الموافقة لحمض الغاليك لكل غرام من وزن المستخلص الجاف(mg GAE/g extrait) .

II-4-2 - 2- تقدير الفلافونويدات

يتم تقدير الفلافونويدات لمختلف المستخلصات بإتباع طريقة تعتمد على تكوين معقد(فلافونوييدات – ألمنيوم) لديه أقصى امتصاص عند موجة 430 نانومتر، حسب (Djeridane et al.,2006) نضع 1ملل من كل مستخلص من نبات . *Aristolochia longa* L في أنبوب الإختبار، نضيف1ملل من محلول ميثانولي من كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) بنسبة 2%، يتم حضن الأنابيب لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة المخبر، ثم نقرأ الكثافة الضوئية باستعمال جهاز المطياف الضوئي(spectrophotomètre PRIM SECOMAM) على طول موجة 430 نانومتر. الشاهد الأبيض يحضر بإضافة الإيثانول عوضا عن المستخلص إلى كلور الألمنيوم .

يستعمل الكرستين (5-100 µg/ml) لتحديد منحنى العيارية، يعبر عن النتائج بعدد المليغرامات الموافقة للكرستين لكل غرام من وزن المستخلص الجاف(QE/g extrait).

II-4-2 - 3- تقدير الفلافون والفلافونول

لتقديرالفلافون و الفلافونول نضع 0.5 ملل من المستخلص النباتي في أنبوب إختبار، نضيف 1.5 ملل إيثانول، 0.1ملل من المحلول الميثانولي من كلورالألمنيوم بنسبة 10%، ثم نضيف 0.1ملل أسيتات الصوديوم 1مول/لترو في الأخير نضيف 2.8ملل من الماء المقطر. نقرأ الإمتصاصية عند موجة 415

نانومتر بعد الحضن لمدة 30 دقيقة في الظلام في درجة حرارة المخبر. الشاهد يحضر بنفس الطريقة و لكن باستبدال الكرستين بنفس كميته إيثانول(Kosalec et al., 2004).

يستعمل الكرستين (20-100 µg/ml) لتحديد منحنى العيارية، يعبر عن هذه النتائج بعدد المليغرامات الموافقة للكرستين لكل غرام من وزن المستخلص الجاف (QE/g extrait).

II-4-2 – 4- تقدير مواد الدباغة

تعتمد طريقة Bate-Smith (1973) على ترسب هيموغلوبين دم البقر الطازج، لتقدير مواد الدباغة في مختلف مستخلصات نبات.*Aristolochia longa* L ، حيث يضاف حجم من الدم (1ملل) المخفف بالماء المقطر(5ملل من الدم يخلط مع 420ملل من الماء المقطرمن أجل الحصول على امتصاصية قدرها 1,6على طول موجة 576نانومتر) إلى حجم من المستخلص النباتي(1ملل) بتراكيز مختلفة، يترك الخليط لمدة 20 دقيقة في درجة الحرارة العادية ،ثم نقوم بعملية الطرد المركزي 4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق في 4 م°، ثم تقرأ امتصاصية الجزء الطافي على طول موجة 576 نانومتر، نستعمل الماء المقطر لتعديل جهاز المطياف الضوئي على الصفر. يستعمل حمض التانيك (100-600 µg/ml) لتحديد منحنى العيارية.

يعبر عن هذه النتائج بعدد الميكروغرامات الموافقة لحمض التانيك لكل ميليغرام من وزن المستخلص الجاف(µgATE /mg d'extrait) .

II-4-2 - 5- تحديد وجود الليكوبين، بيتا كاروتان ، كلوروفيل أ و كلوروفيل ب

تم تقدير الليكوبين، بيتا كاروتان، كلوروفيل أ و كلوروفيل ب حسب طريقة Nagata and Yamashita (1992) حيث نذيب 100مغ من كل مستخلص من المستخلصات المراد دراستها في 10ملل من خليط أسيتون – أكسان (acetone–hexane) بنسبة (4: 6) مع الخلط الجيد لمدة دقيقة ثم الترشيح عبر ورق الوتمان رقم 4. في الأخير تقرأ امتصاصية الرشاحة على طول موجة 453 ، 505 ،645 و663 نانومتر.

نتبع العملية الحسابية التالية لحساب كل من :

الكلوروفيل أ(مغ/100ملل): 0,999 ×الإمتصاصية(A_{663}) – 0,0989×الإمتصاصية (A_{645}).

الكلوروفيل ب(مغ/100ملل): -0,328 ×الإمتصاصية(A_{663}) – 1,77×الإمتصاصية (A_{645}).

الليكوبان (مغ/100ملل): -0,0458 ×الإمتصاصية(A_{663})+ 0,372×الإمتصاصية (A_{505})- 0,0806 ×الامتصاصية(A_{453}).

β-كاروتين(مغ/100ملل): 0,216 ×الإمتصاصية(A_{663}). 0,304×الإمتصاصية (A_{505})+ 0,452 ×الامتصاصية(A_{453}).

النتائج يعبر عنها بـ مغ / غرام من المستخلص

. (Barros et al., 2007 ; Sushila Devi et al., 2014)

II--5 دراسة النشاطية المضادة للأكسدة

تم تحديد النشاطية المضادة للأكسدة على كل المستخلصات باستعمال ثلاث طرق مختلفة الموضحة فيما يلي :

II-5-1- إختبار إزاحة الجذرالحر DPPH

يتم تقدير النشاطية المضادة لإزاحة الجذور الحرة للمستخلصات بإتباع طريقة .Kulsic et al (2004)، باستعمال الجذر DPPH (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate)، وهذا الأخير عبارة عن جذر حر ذو لون بنفسجي يعطي اللون الأصفر إذا تم إرجاعه بواسطة معطي للبروتوناتH^+ .

$$DPPH + AH \text{ ----------------------> } DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

حيث AHهو مركب معطي للبروتونات للجذر DPPH

نحضر تركيزات مختلفة إنطلاقا من محلول أم 1مغ/ملل،نضع 1ملل من كل تركيز في أنبوب إختبار و نضيف له 1ملل من محلول ميثانولي لمركب الـDPPH ذو تركيز0,004%، تحضن الأنابيب 30 دقيقة في الظلام في درجة حرارة المخبر . في الأخيرتقاس الإمتصاصية في طول الموجة 515 نانومتر بعد تعديل الجهاز على الصفر بالشاهد الأبيض (le blanc) وهو عبارة عن الميثانول النقي.

نتبع نفس الخطوات باستعمال محاليل ميثانولية لمركب BHT (hydroxytoluène butylé) بتركيزات مختلفة إنطلاقا من محلول أم µg/ml100 الذي استعمل كشاهد موجب و الميثانول النقي كشاهد سالب.

$$\text{نسبة التثبيط\%} = \frac{\text{إمتصاصية الشاهد – إمتصاصية المستخلص}}{\text{إمتصاصية الشاهد}} \times 100$$

يتم حساب التركيز المثبط لـ % 50 من نشاطية جذر DPPH (IC50) لكل مستخلص من منحنى نسب التثبيط. مع العلم أن أقل قيمة من التركيز IC50 توافق النشاطية المضادة للأكسدة العالية للمستخلص.

II-5-2-اختبار إرجاع الحديد(Reducing power)

تم تحديد القوة الإرجاعية للحديد (Fe^{+3}) لمختلف مستخلصات نبات الـ *Aristolochia longa* L. باتباع طريقة Oyaizu (1986).1 ملل من المستخلص بمختلف التركيزات،يضاف له2,5ملل من المحلول المنظم فوسفات0,2مول ذو pH 6,6 و 2,5 ملل من محلول فيريسيانور البوتاسيوم (1%) [$K_3Fe(CN)_6$]، يمزج هذا الخليط ويحضن لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة 50م°،بعد ذلك نضيف 2,5ملل من حمض ثلاثي كلور الأستيك (10%)من أجل توقيف التفاعلات الكيميائية،ثم نعرض الأنابيب لعملية الطرد المركزي 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق، و في الأخير نأخذ 2,5ملل من الجزء الطافي ونضيف له 2,5 ملل ماء مقطرو 0,5ملل من المحلول المائي $FeCl_3$ (0,1%). تتم القراءة على موجة 700نانومتر، من

أجل تعديل جهاز المطياف الضوئي نستعمل أنبوب اختبار مشابه للأنابيب السابقة غير أنه يستبدل المستخلص بالماء المقطر، كما تم إستعمال الكرستين و BHA (Butylhydroxyanisol) كشاهد موجب للمقارنة. تم التعبير عن النتائج بالتركيز الفعال(EC_{50}) (effective concentration)، تمثل هذه القيمة تركيز العينة الذي يوافق امتصاصية تعادل 0,5، حيث تحسب انطلاقا من منحنى الامتصاصية بدلالة تركيز العينة. التزايد في الامتصاصية يوافق التزايد في القوة الإرجاعية للمستخلصات المختبرة (Sarikurkcu et al., 2008 ; Goze et al.,2009; Bougandoura et Bendimerad, 2012).

II-5-3-الإختبارالمضاد للأكسدة النوعي باستعمال الـ β- carotène

نحضرالجيلوز بإذابة 1,5غ من الأقار في 100ملل من الماء المقطر، بعد التبريد إلى غاية 50م° نضيف الخليط β -كاروتين /حمض اللينولييك، حيث نذيب بيتا كاروتين(1مغ/ملل) في الأسيتون، و حمض اللينولييك(5 µl/ملل) في الميثانول، بعد ذلك نحرك الخليط جيدا و نسكب في أطباق بتري، ثم يترك ليتصلب، بعد ذلك ننجز على مستوى الجيلوز حفر صغيرة يوضع على مستواها 30 µl من المستخلص بتراكيز مختلفة1، 2 و4 مغ /ملل، في الأطباق الشاهدة نستبدل المستخلص بالشواهد الموجبة الكرستين و BHT و الشواهد السالبة الماء والميثانول. يتم الحضن في درجة 45م° لمدة 3 إلى 4 ساعات، بقاء اللون البرتقالي حول الآبار دليل على النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية المختبرة (Belhattab et al.,2007)

II-5-4- إختبار تبييض β –carotène / acide linoléique

تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات المختبرة بواسطة اختبارβ -كاروتين /حمض اللينولييك، حسب (Bougatef et al., 2009; Ben Mansour et al.,2013)، يذاب 0,5 مغ منβ –carotène في 1 ملل من الكلوروفورم ثم يضاف له 25 ميكرولتر من حمض اللينولييك و 200 مغ من 40 Tween، يمزج هذا الخليط جيدا ثم يتم تبخير الكلوروفورم في جهاز التبخير في 45 م°، يتم إضافة 100 ملل من الماء المقطر المشبع بالأكسجين ويرج هذا الخليط جيدا. يوضع 2,5 ملل من الخليط السابق في أنبوب إختبار ونضيف له 0,5 ملل من المستخلصات النباتية المحضرة بتركيز ثابت2 مغ/ملل، كذلك 0,5 ملل من BHT كشاهد موجب ومن الشواهد السالبة المتمثلة في الماء المقطر بالنسبة للمستخلصات المائية والميثانول بالنسبة للمستخلصات العضوية. يحضن المزيج في حمام مائي على درجة 50 م° لمدة ساعتين. نتبع أكسدة المزيج السابق بقراءة الامتصاصية لكل عينة مباشرة بعد تحضيرها(ز=0) و خلال كل 15 دقيقة حتى نهاية التجربة(ز=120 دقيقة)عند طول موجة 470 نانومتر. يتم حساب النشاطية المضادة للأكسدة (AA%) للمستخلصات النباتية حسب العلاقة التالية:

Activité antioxydante %(AA%) = [1- (At_0– At_{120}) test / (At_0-At_{120}) contrôle] x 100

At_0 :الإمتصاصية ز=0

At_{120} : الإمتصاصية ز=120دقيقة

test :المستخلص النباتي أو الشاهد الموجب

contrôle :الشواهد السالبة

II-6-النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات المائية و العضوية لنبات *Aristolochia longa*L.

تم اختبار النشاطية ضد ميكروبية للمستخلصات المتحصل عليها من مختلف أجزاء النبات: الجزء الهوائي(الأوراق و السيقان)، الدرنات والثمار المذكورة سابقا على مجموعة من الكائنات المجهرية منها البكتيريا والفطريات.

II-6-1 السلالات البكتيرية والفطرية وأوساط الزرع المستعملة

تمت هذه النشاطية على 4 أنواع من البكتيريا الممرضة المرجعية ATCC (American Type Culture Collection) . *Escherichia coli* ATCC 25922 غرام سالب، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 غرام سالب، *Staphylococcus aureus* ATCC25923غرام موجب، *Bacillus cereus* ATCC10876 غرام موجب، و على نوعين من الفطريات *Aspergillus flavus* NRRL 391، *Aspergillus niger* 2CA 936 ونوع واحد من الخميرة *Condida albicans* ATCC1024.

الوسط المستعمل هو MH(Muller Hinton) و المرق الغذائي(Bouillon nutritif) بالنسبة للبكتيريا ، PDA (Potato Dextrose Agar) وSabouraud +cloromphenicol+actidione للفطريات والخميرة على الترتيب. استعملنا المضاد الحيوي Gentamycine بكمية 10µg/القرص كشاهد موجب لأن السلالات البكتيرية الأربعة المدروسة حساسة لهذا المضاد الحيوي و Clotrimazole بكمية 50µg/القرص بالنسبة للفطريات.

II-6 -2 دراسة النشاطية ضد بكتيرية

حددت النشاطية ضد بكتيرية لمستخلصات نبات.*Aristolochia longa* L بـ : تقنية اللمس المباشر(Technique par contacte directe) المتمثلة في طريقة الانتشار (méthode de diffusion) حسب Belaiche (1979) و طريقة التخفيف أو المزج في وسط سائل (méthode de dilution)حسب Camporese et al.(2003).

II-6-2-1 تقنية اللمس المباشر Technique par contacte directe

هذه الدراسة تتحقق بطريقة الانتشار في وسط صلب (Méthode de diffusion)، وهي خاصة بالمضادات الحيوية (antibiogramme)، ولكن باستبدال أقراص المضادات الحيوية بأقراص أخرى مبللة بالزيوت الأساسية فإننا نحصل على (aromatogramme)، حيث توضع هذه الأقراص على سطح الجيلوز

المزروع بالبكتيريا، و بعد فترة الحضن تقاس أقطار مناطق التثبيط بالميليمتر، وهذه الأخيرة تبين أن البكتيريا قد قتلت أو ثبطت بانتشار الزيت. في دراستنا هذه ارتأينا أن تتم دراسة تأثير المستخلصات النباتية على البكتيريا الممرضة .

ـ تحضير المزرعة النقية:

يتم تحضير المزرعة النقية إنطلاقا من سلالات بكتيرية مرجعية(ATCC) كما ذكر سابقا،حيث تنمى كل بكتيريا في الوسط الخاص بها حيث تنمى*Staphylococcus aureus* على وسط chapman، أما *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* فتنمى على وسط BCP(BromoCresol Purple)، وأخيرا *Bacillus cereus* تنمى على وسط جيلوز مضاف إليه الدم (Gélose au sang)، بعد النمو لمدة 18-24ساعة في37 م° ، تستعمل هذه البكتيريا في تحضير اللقاح الذي نحتاجه في المراحل القادمة من التجربة.

ـ تحضير اللقاح:

يحضر انطلاقا من زراعة نقية وفتية (18 ساعة) في ماء فيزيولوجي معقم حيث تكون الكثافة الضوئية (DO) لهذا المعلق البكتيري بقيمة 0.08 -0.1 عند طول موجة 625 نانومتر أو Mc Farland0.5 ، أي بمقدار 10^8 CFU/ml (Chamba et Prost,1989)، يجب أن لايتعدى اللقاح المستعمل 15 دقيقة من عملية تحضيره خوفا من تزايد البكتيريا و ارتفاع الكثافة .

ـ طريقة العمل:

الزرع يتم بواسطة طريقة المسح (écouvillonnage)، يتمثل في تبليل ممسحة معقمة écouvillon (stérile) مع التخلص من الكمية الزائدة بالضغط على جدار الأنبوب، ثم يتم المسح على كامل الجيلوزمن الأعلى إلى الأسفل بشكل خطوط متراصة، نكرر العملية 3 مرات على نفس العلبة، مع التحريك في كل مرة بزاوية 60م°، مع الحفاظ على نفس الممسحة (écouvillon) لكل علبة مع إعادة ملئه باللقاح في كل مرة.

بعد ذلك نضع أقراص من ورق واتمان بقطر 6 مم فوق سطح الجيلوز المزروع تكون مبللة بـ 10µl من المستختصات النباتية لـ*Aristolauchia longa* L. المخففة بـ محلول DMSO إذا كانت عضوية أو بالماء المقطر المعقم إن كانت مائية و التراكيز المختارة هي 25، 50 و100مغ/ملل بالنسبة للمستخلصات العضوية و 200، 100 و50مغ/ملل بالنسبة للمستخلصات المائية، أقراص أخرى مشربة بـ DMSO فقط أو بالماء المقطر المعقم فقط تستعمل كشاهد، نضع في كل طبق بتري 3 أقراص مشربة بالتراكيزالثلاثة المختلفة.

أخيرا تحضن أطباق بتري في 37م° بالنسبة لكل أنواع البكتيرياالمدروسة لمدة 24 ساعة ، بعد هذه المدة نقيس قطر منطقة التثبيط المتواجدة حول كل قرص .

لمعرفة أثر المستخلصات النباتية هل هو قاتل البكتيريا (bactéricide) أو مثبط لنمو البكتيريا (bactériostatique)، نأخذ عينة من منطقة التثبيط و نضعها في أنبوب يحتوي على مرق غذائي، وهذا الأخير يحضن في درجة حرارة الملائمة 37 م° لمدة 18 ساعة، ثم يفحص بالعين المجردة:

- وسط معكر : تأثير مثبط للبكتيريا للمستخلص المختبر .
- وسط شفاف : تأثير قاتل للبكتيريا للمستخلص المختبر .

II-6-2-2 طريقة المزج في وسط سائلMéthode de microdilution

بعد الحصول على نتائج النشاطية في وسط صلب و تحديد التراكيز التي تم فيها تثبيط البكتيريا المدروسة، أردنا تحديد التركيز الأدنى للتثبيط (CMI) (Concentration minimale inhibitrice) بطريقة التخفيف الضعيف (Méthode de microdilution) حسب Camporese et al. (2003) الموافقة للهيئة الوطنية للمعايير المخبرية السريرية(National committee for clinical laborotary standard) (NCCLS,2001).

نستعمل صفيحة تحتوي على 96 كؤيس(Microplaque à 96 cupules)، و ذلك بوضع كمرحلة أولى µl 50 من وسط الغذائي السائل MH إنطلاقا من الكؤيس رقم 2 من الصفيحة حتى الكؤيس رقم 12، ثم في الكؤيس رقم 1 نضع100 µl من محلول ذو تركيز 200مغ/ملل بالنسبة للمستخلصات العضوية و 400 مغ /ملل بالنسبة للمستخلصات المائية الذي حضر بإذابة كمية من المستخلص النباتي في DMSOبنسبة 10% ثم نكمل بمرق MH، ثم نأخذ 50 µl من محلول الكؤيس الأول حتى الكؤيس رقم 9 بطريقة التخفيف المتسلسل (Dilution en serie). الكؤيس 10 نعتبره الشاهد الموجب حيث لا نضيف له المستخلص. في الأخير نضيف 50 µl من المعلق البكتيري10^5ml/ UFC لكل الكؤيسات المكونة للصفيحة. في الأخير التراكيز المتحصل عليها لتقدير النشاطية ضد بكتيرية هي كالآتي100 مغ/ملل للكؤيس الأول حتى 0, 390 مغ/ملل في الكؤيس التاسع بالنسبة للمستخلصات العضوية و 200مغ/ملل للكؤيس الأول حتى 0,780 في الكؤيس التاسع بالنسبة للمستخلصات المائية. تحضن الصفيحة في 37م °لمدة 18 ساعة ثم نفحص بالعين المجردة ظهورتعكر وترسب في الوسط، أقل تركيزلا يحدث به نمو بكتيري يمثل التركيز الأدنى المثبط CMI للمستخلص المختبروهذا ما أشارإليه كل من Arif et al.(2013) و Masadeh et al. (2014) .

II-6-3 النشاطية الضد فطرية للمستخلصات المائية و العضوية لنبات *Aristolochia longa* L.

تم إختبار الفطريين (*Aspergillus flavus* NRRL 391, *Aspergillus niger* 2CA 936) و الخميرة *Condida albicans* ATCC1024.

تنمى الخميرة على وسطSabouraud +cloromphenicol+actidione ثم يحضر معلق في الماء المقطرالمعقم بحيث يحتوي على 10^6 بوغ/ملل، أما الفطريات الليفية A.niger وA.flavus فتنمى لمدة 7أيام على وسط PDA في درجة حرارة 28 م°قبل الإختبار ثم تنقل كتلة من الأبواغ إلى الماء المقطر المعقم و يعدل التركيز على 10^6بوغ/ملل باستعمال خلية Mallassez. الزرع يتم بطريقة المسح (écouvillonnage)، نتبع نفس طريقة العمل السابق شرحها في النشاطية ضد بكتيرية، حيث نضع 10 µl

من المستخلص النباتي المختبر فوق أقراص معقمة ذات قطر 6 مم، في الأخيرنحدد قطرالتثبيط بعد حضن الخميرة في 30 م° لمدة 24 سا، والفطريات في درجة حرارة 28 م° لمدة 3 إلى 5 أيام (Belhattab et al.,2004). تم استعمال Clotrimazole (µg50) كشاهد موجب أما الماء المقطر و DMSO كشاهد سالب.

II-7- النشاطية المضادة للإلتهاب في المخبر

II -7 - 1-طريقة تثبيط تخريب البروتينات

لتقدير النشاطية المضادة للالتهاب الخاصة بالمستخلصات النباتية *Aristoloche longa* L. يحضرمحلول مائي من بروتين BSA (Bovine Serum Albumin) بنسبة 5% (w/v)، كما تحضر المستخلصات النباتية المختبرة بتركيز 500ميكروغرام/ملل، و يحضر المركب المعيار ديكلوفيناك الصوديوم (Diclofenac de sodium) بتركيز500ميكروغرام/ملل، بعد ذلك نقوم بتحضير أربع محاليل حيث نقوم بتحضير المحلول المختبر(0,5 ملل) يتكون من 0,45 ملل من بروتين BSA المحضر سابقا و0,05 ملل من المستخلص النباتي، نقوم أيضا بتحضير محلول شاهد (0,5 ملل) يتكون من 0,45 ملل من بروتين BSA و0,05 ملل من الماء المقطر، كما نقوم بتحضير محلول شاهد من المستخلص النباتي(0,5 ملل) يتكون من 0,45 ملل من الماء القطر و0,05 ملل من المستخلص النباتي، كمرحلة أخيرة نحضر محلول المعيار(0,5 ملل) يتكون من 0,45 ملل من بروتين BSA و0,05 ملل من ديكلوفيناك الصوديوم. كل هذه المحاليل المحضرة تعدل بواسطة محلول حمض كلور الماء 1 نظامي (HCl 1N) حتى نحصل على درجة حموضة(pH=6,3)، ثم يتم الحضن في درجة حرارة 37 م°لمدة 20 دقيقة، ثم نرفع درجة الحرارة حتى 57 م° و نبقي المحاليل السابقة فيها لمدة 3 دقائق، بعد ذلك نقوم بتبريد المحاليل و إضافة لكل منها 2,5 ملل من محلول فوسفات منظم (pH 6,3). تقرأ الإمتصاصية على موجة 416 نانومتر.

يتم حساب نسبة تثبيط تخريب البروتينات كما يلي:

نسبة التثبيط %= 100 - (إمتصاصيةالمحلول المختبر- إمتصاصية محلول شاهد من المستخلص/ محلول شاهد)*100.

الشاهد يمثل 100% من البروتينات المخربة، و تقارن النتائج الخاصة بالمستخلصات النباتية بـالديكلوفيناك الصوديوم(Diclofenac de sodium) (500ميكروغرام/ملل) (Kar et al.,2012).

II-8 - تقييم سمية النبات *Aristolochia longa* L.

تم استعمال المستخلص المائي للجزء الهوائي (سيقان وأوراق)، الثمار و درنات *نبات Aristolochia longa* L. في هذه التجربة ،حيث استعملنا الفئران البيضاء Albinos Wistar التي جلبناها من معهد باستور بالجزائر العاصمة ، وقد اجريت التجربة على أنثي الفئران حيث كان متوسط الوزن30,41 ± 2,07لأن أنثى الفئران تكون أكثر حساسية من الذكور(OCDE,2001) ، وضعت هذه الفئران في أقفاص بلاستيكية شفافة مفروشة بالنشارة التي تغير مرتين في الأسبوع لضمان نظافة ووقاية الفئران، و زودت

بالماء و بالغذاء الخاص بها المصنع على مستوى وحدة الـONAB بلقصر بولاية بجاية. تبقى الفئران داخل غرفة درجة حرارتها بين 20 و 25 م° لمدة أسبوع قبل بداية التجربة.

من أجل تقييم التأثير السمي الفوري للمستخلص المائي لدرنات نبات .*Aristolochia longa* L، يجب قياس الجرعة القاتلة بنسبة 50 % (DL_{50}). وهذا يعطي فكرة عن المواد السامة، حيث قيمة الجرعة القاتلة بنسبة 50 % تعطي ترتيب لهذه المواد السامة، كلما كانت ضعيفة كلما كانت المادة سامة و العكس صحيح كما هو مبين في الجدول التالي:

جدول3.أصناف السمية : سلم Hodge et Sterner 1943 (Ouedraogo et al.,2001)

مؤشر السمية	مصطلح شائع الإستخدام	DL_{50} (جرعة واحدة للفئران مغ/كغ)
1	ذات سمية قصوى	أقل من 1
2	ذات سمية عالية	من 1 إلى50
3	ذات سمية متوسطة	50 من إلى 500
4	ذات سمية قليلة	من 500 إلى 5000
5	تقريبا غير سامة	من 5000 إلى 15000
6	غير ضارة نسبيا	أكبر من 15000

II-8 -1- السمية الحادة لدرنات نبات *Aristolochia longa* L.

لتحديد السمية الحادة(Toxicité aiguë) قسمت الفئران المختبرة إلى 6 أفواج، كل فوج يتكون من 6 فئران أنثى، حيث قبل تحديد الأفواج يجب وزن الفئران وتوضع الفئران المتوافقة في الوزن مع بعض كما نعيد عملية الوزن في اليوم الأخير من التجربة وهذا من أجل مراقبة تطور وزن أجسام الفئران أثناء التجربة.

نعتبر أحد هذه الأفواج كشاهد حيث يتلقى الماء المقطر فقط، أما باقي الأفواج تعالج حيث كل فوج يأخذ جرعة وحيدة من المستخلص المائي لدرنات النبات المذاب في الماء المقطر بحجم ثابت 1ملل من المحلول لـ 100غ من وزن الفأر، مع العلم أنه قبل بداية التجربة نحدد أوزان الفئران.

بعد تجويع الفئران لمدة 12ساعة تعطى الجرعات المحددة لكل فوج عن طريق الفم بواسطة محقنة خاصة (sonde rigide). الجرعات المحقونة كانت كالأتي:0، 2، 4، 6، 8 و 12غرام من المستخلص في الكيلوغرام من وزن الفأر. بعد ذلك تراقب الفئران في الساعة الأولى بعد بلع المستخلص النباتي ثم بعد 4 ساعات، ثم لمدة 24 ساعة، بعد ذلك لمدة 14يوم وهي مدة التجربة مع تدوين كل الملاحظات الخاصة بمظاهر السمية من حيث تغير سلوك الفئران أو موتها. في اليوم14 أي نهاية مدة التجربة كل الفئران الحية تقتل من أجل الدراسة، أما التي توفيت أثناء التجربة يعبر عنها بالنسبة المئوية.

تحليل النتائج

يعبر عن الجرعة القاتلة بنسبة 50 % (DL_{50}) بـالمغ/كغ من وزن الفأر وتحدد الطريقة الحسابية لـ Dragstedt et langسنة 1957:

$$DL_{50} = \frac{50(X_2-X_1) + (X_1Y_2-X_2Y_1)}{Y_2-Y_1}$$

X_2: الجرعة التي تفوق DL50

X_1: الجرعة التي تكون أقل من DL50

Y_2: نسبة موت الفئران الموافقة X_2

Y_1: نسبة موت الفئران الموافقة X_1

II-8 -2-تقييم السمية الحادة للجزء الهوائي و ثمار نبات الـ*Aristolochia longa* L.

من أجل تقييم سمية الجزء الهوائي و ثمار نبات الـ*Aristolochia longa* L. ، اخترنا المستخلص المائي لهذين الجزءين، لم نتبع الطريقة الكلاسيكية لتقييم السمية الحادة و إنما اتبعنا طريقة OCDE لسنة 2001 رقم 423 وهي طريقة تسلسلية لا تتطلب عدد كبير من الفئران بل نستعمل فيها 3 فئران لكل مرحلة، وعلى أساس موت أو الحالة السيئة للفئران، من اثنين إلى ثلاث مراحل تكون ضرورية لتقييم السمية الحادة و المادة المختبرة.

مبدأ هذه التجربة أن المادة المختبرة تقدم بطريقة تسلسلية إلى ثلاثة فئران من نفس الجنس (عادة أنثى). وفاة الفئران أو عدم ظهور أعراض تؤدي إلى الموت في مجموعة الفئران التي تلقت جرعة معينة في مرحلة محددة، هي التي تحدد المرحلة القادمة أي نكتفي بالنتائج ونوقف التجربة، أو نعيد التجربة على ثلاث فئران أخرى بنفس الجرعة، أو تعطى جرعة أقل أو أكثر من الأولى لثلاث فئران أخرى .

عوملت الفئران المراد اختبارها بنفس الطريقة التي ذكرت في اختبار سمية المستخلص المائي للدرنات، ولكن الجرعة التي اخترناها هي 2غ/كغ و 5غ /كغ حسب OCDE لسنة 2001 لكل من مستخلص الجزء الهوائي أو الثمار.

يعبر عن الجرعة القاتلة بنسبة 50 % (DL50) بـالمغ/كغ من وزن الفأر حسب الملحق رقم 2d الموجود ضمن طريقة OCDE لسنة2001.

II-8 -3- أخذ عينات الدم و إنجاز التحاليل البيوكيميائية

في اليوم الرابع العشرمن التجربة ، تم تجويع الفئران لمدة 12ساعة ثم في اليوم التالي وبعد قتل الفئران تم وضع عينات الدم في أنابيب خاصة مزودة بمادة الهيبارين(héparine) من أجل التحاليل البيوكيميائية، ثم توضع في جهاز الطرد المركزي3000 دورة/دقيقه في درجة 4م°، والبلازما المتحصل عليها تحفظ في الثلاجة ثم تنقل بصفة فورية إلى المخبر.

أجريت التحاليل البيوكيميائية على مستوى المخبر المركزي بالمستشفى الجامعي لولاية سطيف، وقد تم إنجاز الاختبار الكبدي الذي يضم التحاليل التالية ALT (Alanine aminotransférase)، وAspartate aminotransférase) AST ، الاختبار الدهني ويضم الكولسترول CHO (Cholestérol Total)، الغليسريدات الثلاثية TGT (Triglycérides totaux)، الإختبارالكلوي ويضم الكرياتن CRE (créatine) و اليوريا (Urée) و أخيرا قمنا بتحليل نسبة السكر في الدم Gly (Glycémie) .

II-8 -4- تحضير المقاطع النسيجية

بعد نزع الأعضاء المختارة للدراسة (الكبد والكلى)، تغسل جيدا بالماء الفيزيولوجي و يتم وزنها ثم تحفظ في الفورمال 10% لحين استعمالها.

تم تحضير المقاطع النسيجية على مستوى مخبر التشريح المرضي بمستشفى الجامعي بسطيف، وذلك بقطع الأعضاء إلى قطع صغيرة وتوضع بعلب خاصة، هذه العينات تجفف باستعمال الإيثانول 90 ° ثم توضح باستعمال الإكزيلان(hyxyléne)، بعد ذلك توضع في البرافين و هذه العملية تتم في جهاز الأوتومات (Automate) ، ثم كمرحلة ثانية تتم عملية التضمين (L'inclusion) في قوالب معدنية حيث نتحصل على قوالب من البرافين التي يتم قطعها باستعمال جهاز ميكروتوم (microtome) ، توضع المقاطع المتحصل عليها على شرائح زجاجية التي تجفف لمدة ساعة في درجة حرارة 37 م°، ثم كمرحلة أخيرة تتم عملية تلوين المقاطع باستعمال إماتوإكزلين –إيوزين (hématoxyline-éosine).

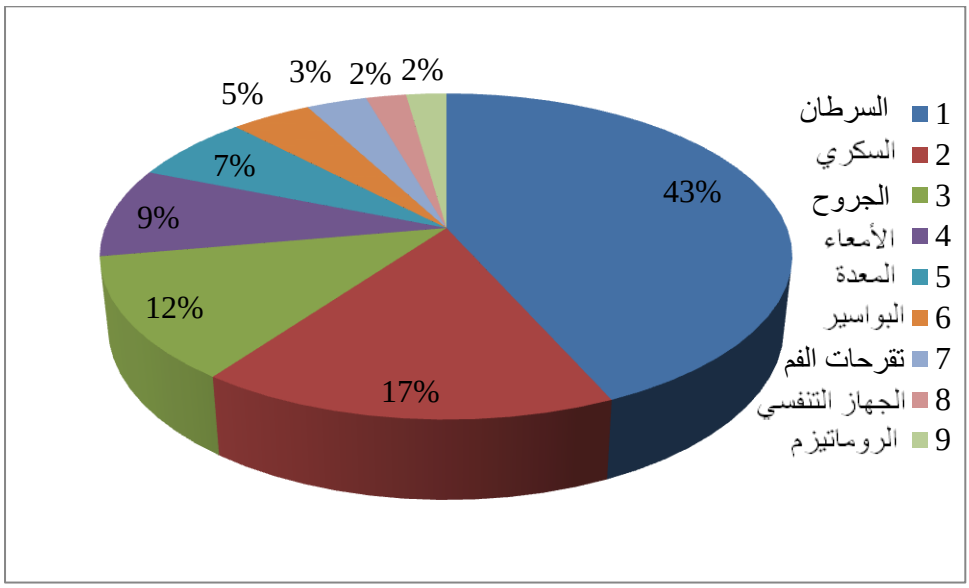
التحاليل الإحصائية المستعملة

تم التعبير عن القيم بالمتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري mean ± (SD) ، حللت النتائج إحصائيا باستعمال برنامج « Graphpad Prism5® » عن طريق إختبارANOVA (one-way ANOVA) متبوع باختبار Tukey بالنسبة للمقارنات بين مختلف المستخلصات والشواهد و بين المستخلصات فيما بينها، حيث اعتبر الفرق إحصائيا ذو معنى عند الدلالة 5 % أي أن معامل التحديد ($P < 0.05$).

III– النتائج و المناقشة

III-1– الدراسة الأثنوطبية لنبات *Aristolochia longa* L.

أسفرت نتائج البحث في منطقة سطيف وضواحيها (عين المان، صالح باي واوريسيا وعموشة)، عن طريق إنجاز تحقيق ميداني مع مئة (100) شخص لهم علاقة بالتداوي بالأعشاب من كبار السن وخاصةالعشابين وطرحت الأسئلة على 82 رجل معظمهم عشابين وعلى 18امرأة، وعلى أساس المعلومات المتحصل عليها وجدنا 50% فقط من هذه الفئة تعرفت على هذا النبات وتعرف كيفية استعماله و تحضيره، أما 50% الأخرى لم تتعرف عليه. نسبة إلى النتائج المتحصل عليها(شكل 24) فقد وجدنا أن هذا النبات يستعمل لعلاج العديد من الأمراض وقد احتل علاج مرض السرطان بواسطة هذا النبات المرتبة الأولى بقيمة 39 شخص(مكررة 39مرة) أي بنسبة (43%)، يليه الداء السكري 15شخص بنسبة (17%)، أيضا علاج الجروح خاصة عند الماشية والأبقارذكر من طرف 11شخص بنسبة 12%، أما أمراض الأمعاء والمعدة فذكرها 8 و6 أشخاص على الترتيب أي بنسبة 9% و7%، إضافة إلى مرض البواسير4 أشخاص (4%)، تقرحات الفم 3 أشخاص (3%)، أمراض الجهاز التنفسي (شخصين)(2%) وأخيرا أمراض الروماتيزم(شخصين) (2%).

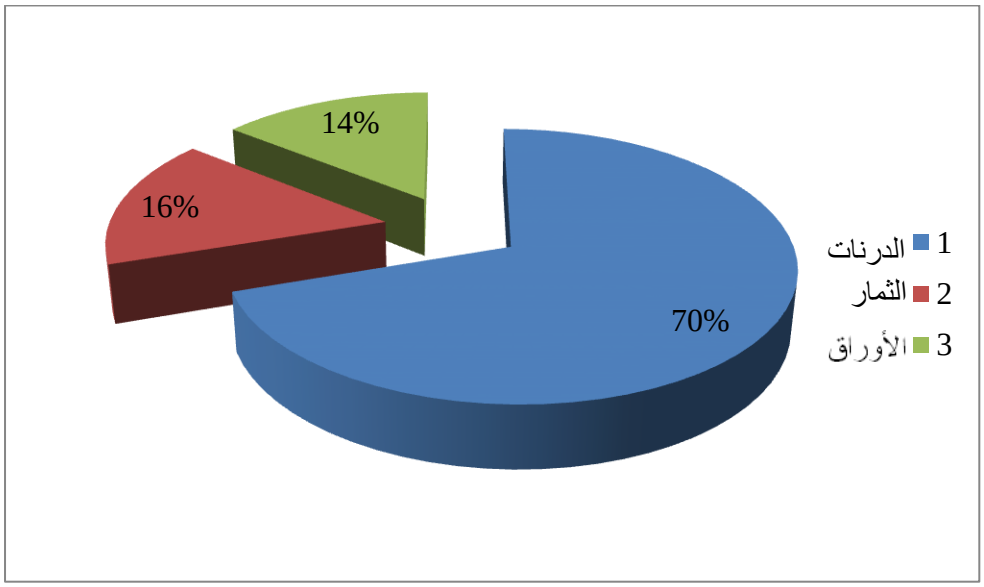


شكل24. نسب الأمراض المعالجة بواسطة نبات *Aristolochia longa* L.

بالنظر إلى النتائج الذي تحصل عليها Benarba et Meddah(2014) فيما يخص استعمال هذا النبات *Aristolochia longa* L. في منطقة غرب الجزائر تحديدا بولاية معسكر عن طريق تحقيق ميداني شمل 100 شخص أن هذا النبات معروف أويستعمل تقريبا من طرف جميع الأشخاص المستجوبين في هذه المنطقة أي بنسبة 100%، عكس ما تحصلنا عليه في نتائجنا أن هذا نبات معروف أويستعمل بنسبة 50%

فقط شرق الجزائر تحديدا بولاية سطيف، وحسب رأي الأشخاص الذين تم استجوابهم أن هذا النبات بدأ ينتشر استعماله بمدينة سطيف إلا في السنوات الأخيرة فقط. لكن من جهة أخرى توافقت نتائج دراستنا مع دراسة Benarba et Meddah(2014) من ناحية الأمراض المعالجة بواسطة نبات *Aristolochia longa* L. حيث كانت نتاجهم مقاربة لما تحصلنا عليه حيث أشارت أن مرض السرطان هو الأكثر علاج بواسطة هذا النبات بنسبة 39%، الأمراض الجلدية (14%)، الداء السكري(14%)، مشاكل المعدة والأمعاء(9%).

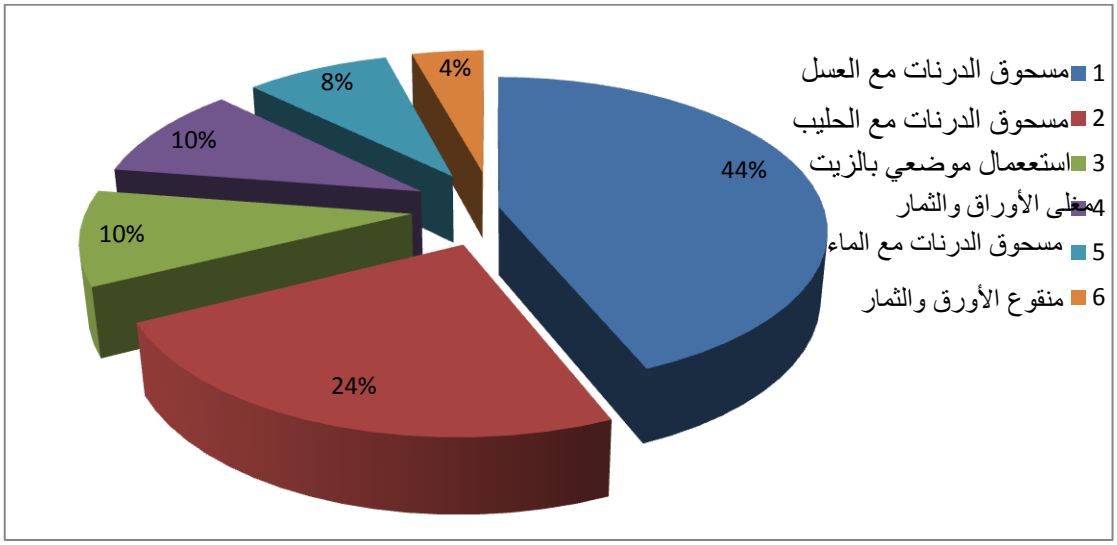
يوضح الشكل 25 أن الدرنات تمثل الجزء الأكثر استعمالا من طرفة الفئة (50%) التي تعرف أوتستعمل هذا النبات، حيث كان استعماله من طرف44 شخص أي بنسبة 70 %، تليها الثمار بنسبة 16%(10شخص)، كذلك الأوراق تستعمل (9أشخاص) بنسبة 14%، وهذه النتائج وافقت نتائج دراسة Benarba etMeddah(2014)، حيث كان استعمال الدرنات بنسبة 89%، الأوراق بنسبة 9%، وأخيرا النبات كامل بنسبة 2%.



شكل 25. نسب استعمال أجزاء نبات *Aristolochia longa* L. في ولاية سطيف

حسب نتائج التحقيق الميداني فإن االطريقة الأكثر استعمال هي مسحوق الدرنات مع العسل الذي يؤخذ عن طريق الفم وقد تكررت 31 مرة(44%)، أو يأخذ مع الحليب بنسبة 24% (17شخص) أو مع الماء بنسبة 8%(6أشخاص)، أما الإستعمال الموضعي فكان بخلط مسحوق الدرنات مع زيت الزيتون وتم ذكره من طرف 7 أشخاص بنسبة(10%). كما يستعمل مغلى الأوراق والثمار بنسبة (10%) أي من طرف 7أشخاص، وكانت أقل نسبة استعمال لمنقوع الأوراق والثمار من طرف 3 أشخاص(4%) يستعمل لعلاج أمراض المعدة والأمعاء(شكل26). وقد وافقت هذه النتائج ما تحصل عليه Benarba et Meddah(2014) حيث كانت أكبر نسبة استعمال تخص مسحوق الدرنات مع العسل (63%)، يليها الخليط

مع الحليب (13%)، والغلي مع الماء بنسبة (11%)، كذلك كان هناك استعمال موضعي لهذا النبات وخلطه مع زيت الزيتون.



شكل26. نسب طرق تحضير نبات *Aristolochia longa* L.

كنتيجة لهذا التحقيق الميداني حول نبات *Aristolochia longa* L. بمنطقة سطيف تبين لنا أن هذا النبات حديث الاستعمال وقد بدأ وانتشر استعماله إلا في السنوات الأخيرة فقط، وقد استنتجنا أن الجزء الأكثر استعمال هو الدرنات (الجزء الترابي) لغرض علاج خاصة مرض السرطان بأخذ مسحوق هذه الدرنات مع العسل بكمية قليلة ولمدة محددة.

III-2 -الدراسةالمورفولوجية و التشريحية لنبات *Aristolochia longa* L.

III-2 -1 –الخصائص المورفولوجية caractéres morphologiques

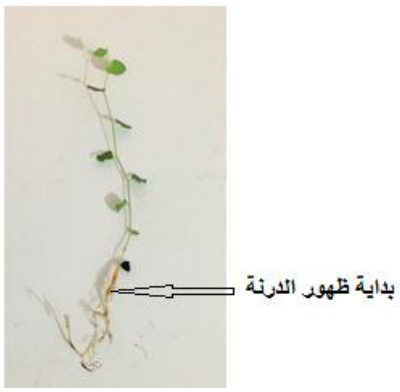
بعد الدراسة المورفولوجية (الشكل الخارجي) للنبات *Aristolochia longa* L. استنتجنا أنه نبات عشبي معمريبلغ طوله تقريبا 30سم، غزير التفرع ينمو في المناطق الرطبة، له درنات مطمورة في التربة يتراوح طولها بين 6-12سم تعطي إلى الأعلى سيقان هوائية يتراوح طولها مابين 23 – 25 سم و إلى الأسفل جذور عرضية، أما الورقة فهي ذات شكل قلبي ذات تعرق راحي، لها عنق صغير، تتوزع على الساق بشكل متناوب يبلغ طولها حوالي4,5 سم طولا و4 سم عرضا. فترة الإزهار تكون قصيرة نوعا ما حيث تمتد بين شهر ماي وجوان، تتميز الزهرة بأنها أنبوبية الشكل متطاولة ذات لون بني مخطط باللون البنفسجي يبلغ طولها حوالي 6 سم تتكون من ثلاث سبلات ملتحمة شكل(27)، أما الثمار فهي علبية الشكل تحتوي 6 حجرات تنفتح بستة صمامات، يتكاثر بالبذور أو خضريا. هذا الوصف مطابق لما جاء بكتاب Quesel etSanta (1962) (راجع الجزء النظري صفحة44).

شكل27. الشكل المورفولوجي لنبات *Aristolochia longa* L.

III-2–2- تتبع مراحل الإنتاش وتشكل الدرنات

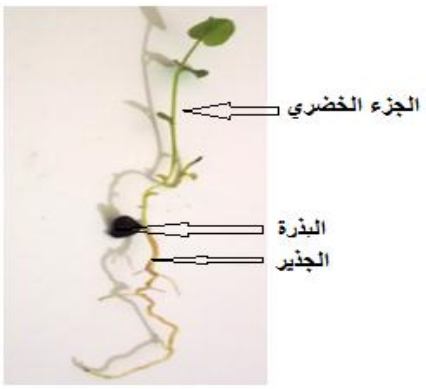
قمنا بزرع بذور من نبات *Aristolochia longa* L. في التربة وبعد مدة معينة (تقريبا شهرين)أنتشت هذه البذور لتعطي بادرة أو نبيتة صغيرة ذات درنة، قمنا بتتبع كيفية تشكل الدرنات وتحصلنا على الأشكال التالية(من 1إلى 10) الموضحة في شكل 28 :

نلاحظ في الشكل1 إنتاش البذرة وإعطاء جزء خضري فوق التربة المتمثل في الساق والأوراق والجذير تحت التربة، بعد ذلك في الشكل2، 3 و4 لاحظنا تضخم صغيروهذا ما يدل على بداية تشكل الدرنة مع بقاء البذرة في هذه المراحل، أما في الشكل 5 لاحظنا تزايد في حجم الدرنة مع اختفاء البذرة و ظهور إستطالة من الساق الهوائية لكن باتجاه التربة حيث تنتهي هذه الأخيرة بتشكيل الدرنة وذلك بعد ثلاثة أشهر من الإنتاش، في شكل 6 و7 نلاحظ ظهورالدرنة بشكل واضح بعد 4 أشهر من الإنتاش، الشكل 8 يوضح الدرنة الفتية مع وجود جذورعليها. أما الدرنة المسنة فتظهر بشكل متخشب(الشكل9) مع العلم أن هذا النبات يعتبرمن النباتات المعمرة، في الأخير مختلف أشكال درنات نبات *Aristolochia longa* L. موضحة في شكل10.

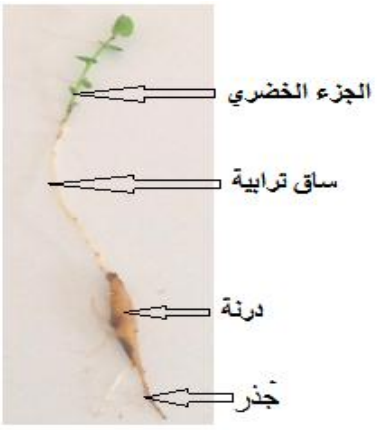

بداية ظهور الدرنة

3

2


الجزء الخضري
البذرة
الجذير

1


الجزء الخضري
ساق ترابية
درنة
جذر

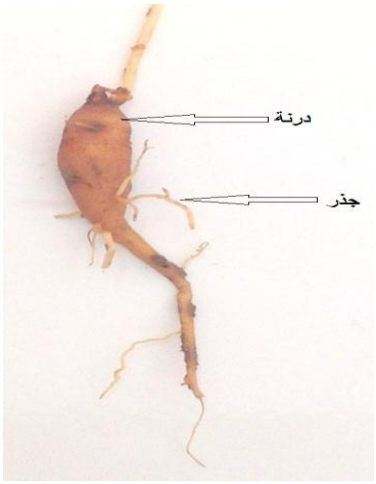
6

5

4

درنة مسنة

9


درنة
جذر

8

7

10

شكل28. مراحل تشكل الدرنات(من 1إلى 10) عند نبات *Aristolochia longa* L.

حسب (Letondor,2014) تتشكل الدرنات من تضخم أنسجة معينة في النبات أين تتكدس المدخرات أساسا الكربوهيدرات(les glucides)، وبذلك نعتبرها أنسجة تخزين. من الناحية اتشريحية يمكن أن تنتج الدرنات من تثخن:

- ساق التي تعطي الكورمة (القلقاس *Colocasia esculenta*)أومن ساق ترابية (البطاطا *Solanum tuberosum*)
- من جذر وتدي(الجزر *Daucus carota*) أو جذر عرضي (البطاطا الحلوى*Ipomoea batatas*)
- من أسفل الفلقة (hypocotyle) (الفجل *Raphanus sativus* ، اللفت*Brassica rapa*L. ، الشمندر*Beta vulgaris*).
- نبات اليام (igname) يمثل حالة خاصة، حيث تتشكل الدرنة عن طريق إنتفاخ بين الساق والجذورجنس*Dioscorea* .

وبذلك تختلف آلية تشكيل الدرنات بدلالة العضو المسؤول عن تشكيل هذه الدرنة، أي حسب نوع النبات.

حسب الصورالموضحة في شكل 28 التي تحصلنا عليها عند تتبع عملية تشكيل الدرنات خاصة رقم 2، 3 و4 نلاحظ أن درنة النبات *Aristolochia longa L.* تتشكل في البداية بظهور تضخم مباشرة أسفل الفلقة، وهذه الملاحظة تتطابق مع النوع الثالث الذي سبق ذكره أي أسفل الفلقة (hypocotyle) .

وقد وافقت دراستنا ما أشارإليه (Letondor,2014) أن الدرنة الناجمة من أسفل الفلقة (hypocotyle) تعتبر عضو إنتقال بين الجذر والساق(شكل 28 رقم 6)، كما يبدأ تشكيل الدرنة نسبيا مبكرا عند مرحلة النمو، إبتداءا من ظهور الأوراق الأولى، حيث يحدث تثخن أسفل الفلقة والجزء العلوي من الجذر(شكل28رقم2،

3 و 4). كذلك الدرنات الناضجة تكون مغطاة ببشرة ثانوية (périderme) نوعاما سميكة، التي تشكل خط الدفاع الأول ضد الهجومات الحيوية وغير الحيوية(شكل 28 رقم 10).

III-2 -3 الدراسة التشريحية لجذر فتي

قمنا بزرع بذرة من نبات .*Aristolochia longa* L ، وقد أعطى انتاش هذه البذرة نبيتة صغيرة الموضحة في الشكل (a-29) لديها جذير حيث قمنا بعمل مقاطع عرضية للتعرف على البنية الداخلية لجذر نبات *Aristolochia longa* L الفتي، الدائرة السوداء على البادرة في شكل (a-29)هو مكان أخذ المقاطع. فتحصلنا على مقطع دائري المبين في شكل رقم(b-29).

من خلال المقاطع العرضية للجذور الفتية لنبات .*Aristolochia longa* L نلاحظ البنية الأولية حيث تتميز بشكل دائري نميزبه عدة أنسجة من الخارج إلى الداخل مختلفة في شكل و لون الخلايا تتمثل في البشرة، القشرة، الحزم الوعائية والنخاع أواللب.

1- البشرة

تتكون طبقة البشرة من صف واحد من الخلايا دائرية الشكل المتراصة (b-29)، يعتبر هذا النسيج من أنسجة الحماية ولهذا تترسب بهذه الخلايا مادة الفلين التي تظهر باللون أزرق مخضر.

2- القشرة

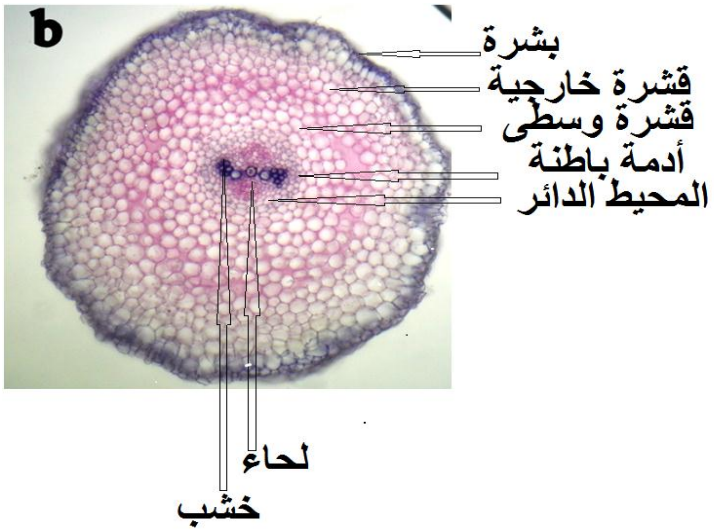
نسيج برانشيمي يتكون من خلايا دائرية الشكل أكبر حجم من خلايا البشرة، تتواجد هذه الطبقة بين البشرة والأسطوانة الوعائية وتتمايز إلى ثلاث طبقات (شكل29-c) طبقة خارجية تتمثل في القشرة الخارجية التي تقع مباشرة تحت البشرة، طبقة وسطى تمثل القشرة الوسطى تتكون من خلايا برانشيمية ذات لون وردي وآخرطبقة من طبقات القشرة هي الأدمة الباطنة (القشرة الداخلية) هي سلسلة واحدة من الخلايا المتفلنة وتظهرباللون الأزرق في الشكل (c-29)هي تحيط بالأسطوانة المركزية. ترسب الفلين بين خلايا الأدمة الباطنة يعرف بشريط كاسبروهو ينظم حركة مرور الماء داخل وخارج الأسطوانة الوعائية أو المركزية.

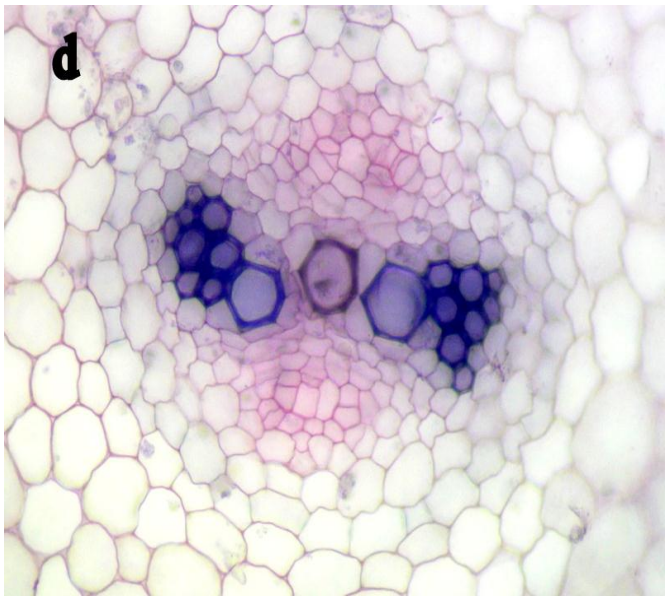
3-الحزم الوعائية

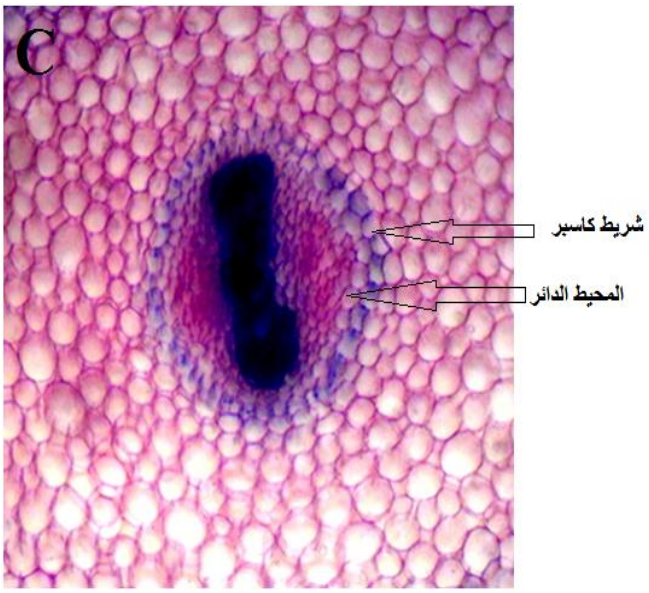
تحاط الحزم الوعائية بالمحيط الدائرالذي يتمثل في سلسلة واحدة من الخلايا البيضوية الشكل وردية اللون كما هومبين في الشكل (c-29) والمتواجد تحت الأدمة االباطنة مباشرة، كان عدد الحزم الوعائية حزمتين وعائتين تتكون كل حزمة وعائية من الخشب الذي يظهرباللون الأزرق وبجانبه اللحاء باللون الوردي حيث هاتين الحزمتين تظهربشكل واضح في شكل (d-29) ويتبين من هذا الشكل الأخيرأن الخشب وهوالنسيج الناقل للنسغ الناقص يتكون من أوعية كبيرة تسمى الخشب التالي تتجه إلى الداخل وأوعية صغيرة الحجم تتجه إلى الخارج تسمى الخشب الأول والإثنين معا يشكلان الخشب الإبتدائي، نفس الشيء بالنسبة للحاء الذي يبينه الشكل (d-29) أنه يتكون من أوعية كبيرة الحجم تتجه نحو الداخل هي اللحاء التالي وأوعية صغيرة تتجه نحوالخارج تمثل اللحاء الأول والإثنين معا يكونان اللحاء الإبتدائي المسؤول عن نقل النسغ الكامل. يشكل كل من المحيط الدائروالحزم الوعائية الأسطوانة المركزية.

4-اللب

من المفروض أن يحتل اللب أو النخاع وسط المقطع أي مركز الأسطوانة المركزية، لكن يبين الشكل (d) أن النخاع تم اختزاله من طرف إلتقاء أوعية الخشب.







شكل 29. (a) بادرة *Aristolochia longa* L. ، **(b)** مقطع عرضي في جذر فتي لـ *Aristolochia longa* L.، **(c)** الأسطوانة المركزية لجذرفتي لنبات *Aristolochia longa* L.، **(d)** الحزم الوعائية لجذرفتي لنبات *Aristolochia longa* L. التكبير X100 و X400

III-2 -4 الدراسة التشريحية للساق

من خلال المقاطع العرضية للسيقان الفتية الهوائية والترابية لنبات *Aristolochia longa* L. نلاحظ البنية الأولية :

III-2 -4 -1-السيقان الهوائية

السيقان الهوائية الفتية لها شكل مربع يحتوي على أربع زوايا مجهزة بنسيج دعامي كولونشيمي زاوي، تتكون من أربع أنسجة مختلفة في شكل و لون الخلايا تتمثل في البشرة، القشرة، الحزم الوعائية والنخاع أواللب الموضحة في شكل30(a،b،c).

1- البشرة

تتكون طبقة البشرة من صف واحد من الخلايا دائرية الشكل المتراصة (شكل a30،b30) ،تكون هذه البشرة خالية من الأوبار والغدد الإفرازية.

2- القشرة

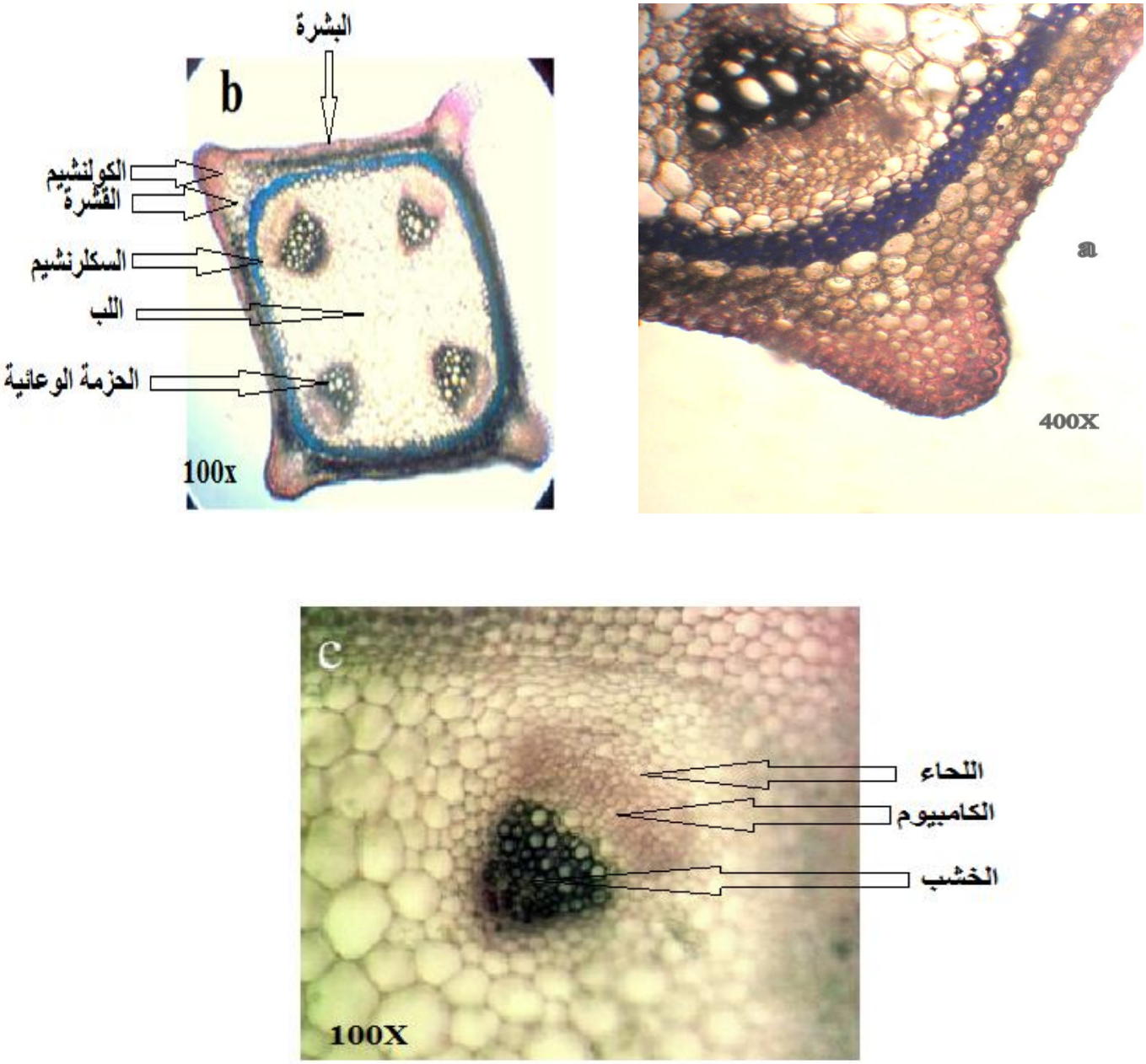
نسيج برانشيمي يتكون من خلايا دائرية الشكل أكبر حجم من خلايا البشرة، تتواجد هذه الطبقة بين البشرة والحزم الوعائية وتكون ضيقة نوعا ما، في الزوايا الأربعة نلاحظ وجود كتل من الخلايا الكولونشيمية ذات التثخن الزاوي التي تظهر باللون الوردي (شكل a30،b30) .

3-الحزم الوعائية

تحاط الحزم الوعائية بالمحيط الدائر المتمثل في النسيج السكليرنشيمي الذي يظهر باللون الأخضر مزرق، عدد الحزم الوعائية أربعة كل حزمتين متقابلتين تكون متساويتان في الحجم حيث لاحظنا وجود حزمتين كبيرتين متقابلتين و حزمتين صغيرتين متقابلتين (شكل b30). تتواجد هذه الحزم في زوايا المربع، حيث تتكون كل حزمة وعائية من الخشب الإبتدائي في جهة الداخل أي جهة النخاع يقابله اللحاء الإبتدائي نحو الخارج أي اللحاء يتوضع فوق الخشب، توجد بينهما طبقة من الكومبيوم الإبتدائي (procambium) الذي يتحول فيما بعد إلى كامبيوم (شكلc30).

4- اللب

يتكون من النسيج برانشيمي ذو خلايا مضلعة الشكل وكبيرة الحجم مقارنة مع خلايا القشرة، كما يحتل اللب الجزء الأكبر من مساحة المقطع(شكلb 30).



شكل30. مقطع عرضي لساق فتي لنبات .*Aristolochia longa* L **a** جزء من المقطع العرضي، **b** مقطع عرضي كامل للساق الفتي، **c** الحزمة الوعائية.

III-2 -4 -2-السيقان الترابية

تمتد من السيقان الهوائية سيقان أخرى تحت التربة تكون رقيقة وتنتهي بدرنة شكل (d،31)، أخذت مقاطع من هذا الجزء(الحلقة الصفراء في شكل31) فأعطت البنية النسيجية الموضحة في شكل (e، 31) كان المقطع بشكل بيضوي يتكون من أنسجة تشبه أنسجة الساق الهوائية وهي كالآتي:

1-البشرة

تظهر في الشكل طبقة واحدة من الخلايا المتراصة خالية من الغدد والأوبار.

2- القشرة

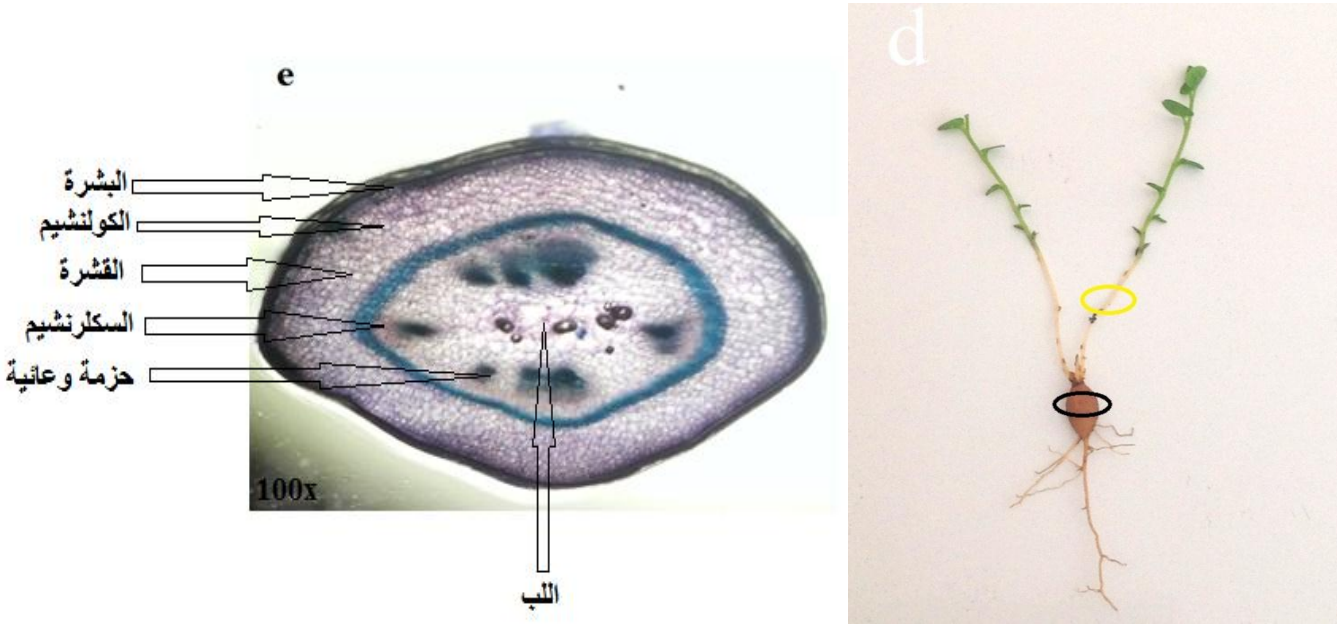
نسيج برانشيمي يتكون من خلايا دائرية الشكل أكبر حجم من خلايا البشرة تظهر باللون الوردي، تتواجد هذه الطبقة بين البشرة والحزم الوعائية وتكون واسعة نوعا ما، تحت طبقة البشرة مباشرة نجد سلسلة من الخلايا الكولونشيمية تكون أقل حجم من خلايا النسيج البرانشيمي.

3-الحزم الوعائية

تحاط الحزم الوعائية بالمحيط الدائر المتمثل في النسيج السكليرنشيمي الذي يظهر باللون الأخضر مزرق، ظهرت في الشكل 8 حزم وعائية متباينة الحجم، حيث3 حزم تقابل 3حزم، أما الحزمتين الباقيتين فتحتل قطبي الأسطوانة الوعائية. تتكون كل حزمة وعائية من الخشب الإبتدائي في جهة الداخل يقابله اللحاء الإبتدائي نحو الخارج وبينهما توجد طبقة من الكامبيوم الإبتدائي(procambium)الذي يعطي الكامبيوم.

4-اللب

يتكون من النسيج برانشيمي ذو خلايا مضلعة الشكل وكبيرة الحجم مقارنة مع خلايا القشرة، كما يتوسط اللب مساحة المقطع.

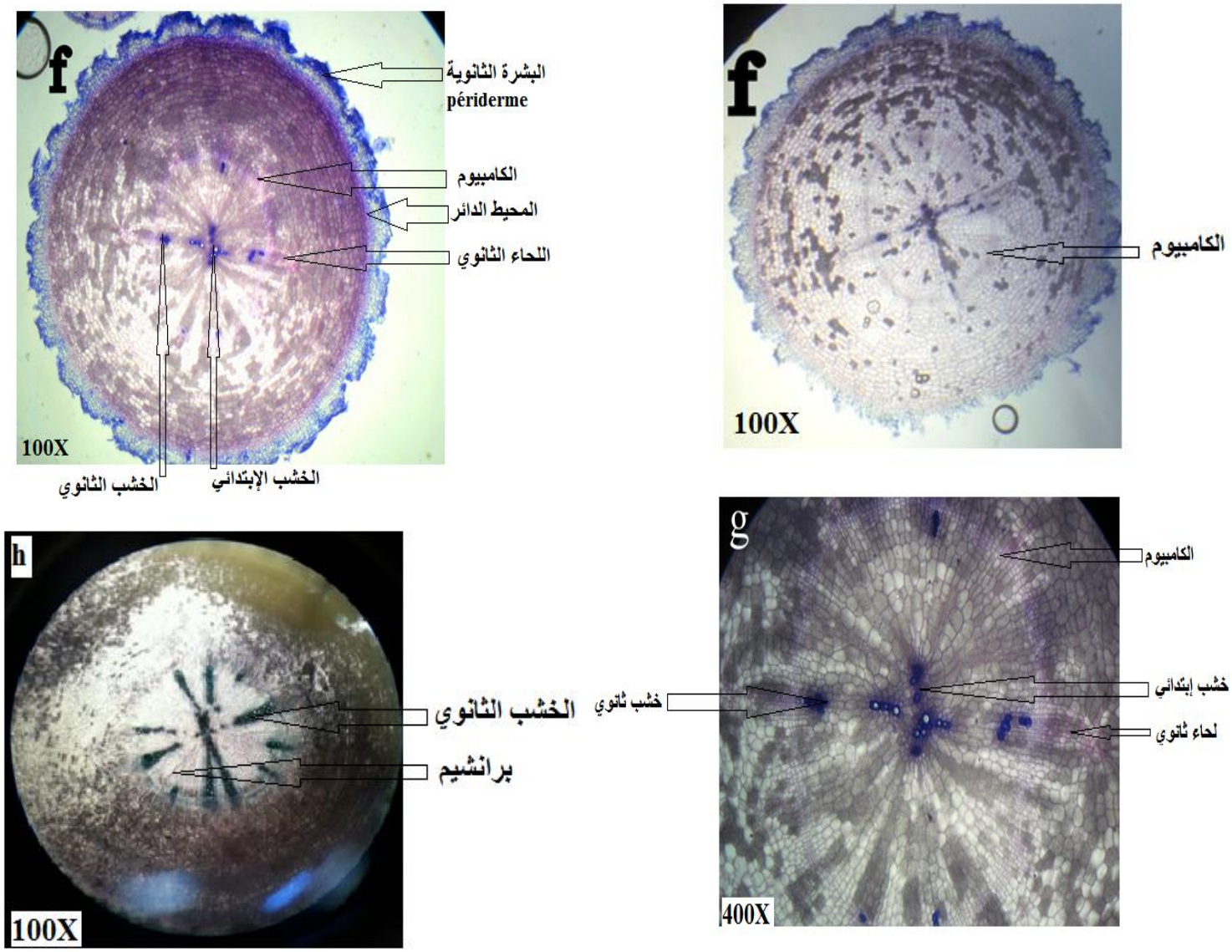


شكل31. ممقطع عرضي لساق فتية تحت التربة(تكبير100X)

III-2 -4 -3 الدرنات

تنتهي السيقان الأرضية الفتية الرقيقة بدرنة صغيرة شكل (31، d) (الحلقة السوداء في الشكل31)، وقد أعطى المقطع العرضي لهذا الجزء أنسجة ذات بنية ثانوية حيث ميزنا من خارج المقطع إلى داخله البشرة الثانوية (périderme)التي تحيط بالمقطع من الخارج وتظهر باللون الأزرق لوجود مادة الفلين ومتقطعة من الناحية الخارجية، تحتها مباشرة نجد المحيط الدائر، ثم نجد النسيج البرانشيمي في كامل المقطع وهو من نوع الإدخاري حيث تظهرخلايا النسيج أنها مملوؤة بمادة ادخارية(مثل سكر النشاء) ذات لون بني كما

يبين الشكل (f،32) ، كما لاحظنا وجود الخشب الإبتدائي في مركز المقطع ثم الخشب الثانوي الذي يفصله عن اللحاء الثانوي حلقة الكامبيوم شكل (f،32) ، الخشب الثانوي ينتظم في شكل أشعة، مفصولة بواسطة البرانشيم شكل (h،32) وهذا المقطع العرضي في درنة هذا النبات يؤكد أن الدرنة هي عضو إدخاري للمواد العضوية، حيث يظهرمن الشكل (g،32) أن المقطع يسوده نسيج برانشيمي إدخاري، تتخلله الأنسجة الناقلة من الخشب واللحاء، وقد أكد هذا (Letondor,2014) أنه على المستوى النسيجي، تتميزالدرنات بوفرة البرانشيم النشوي(parenchyme amylifère) الذي يعرف بأنه برانشيم متخصص في تخزين حبيبات النشاء داخل الصانعات النشوية، تتم تغذيته عن طريق نسيج ناقل، هذه التغذية قد تكون عن طريق الخشب(النسغ الناقص) و/أو عن طريق اللحاء(النسغ الكامل أي منتجات التركيب الضوئي).



شكل 32.مقطع عرضي لدرنة نبات *Aristolochia longa* L.

وقد وافقت نتائجنا في البنية النسيجية لدرنة نبات *Aristolochia longa* L. ما جاء به Raven et al.(2007) في تفسير البنية الثانوية لجذر نبات ثنائي الفلقة، وهذا ما يجعلنا نستنتج أن أسفل الفلقةhypocotyle لهذا النبات يكون مشابه في البنية التشريحية للجذر، وهذا أيضا ما استنتجه Letondor (2014) في دراسته على درنة نبات الفجل التي لديها نفس منشأ النبات المدروس.

كما بين Raven et al. (2007) أن من بداية التغلظ الثانوي، تمايزالخشب الإبتدائي تقريبا يكون منتهي ويظهرالكامبيوم الحزمي بين الخشب الأول(protoxylème) واللحاء الإبتدائي في البرانشيم الأساسي. أثناء النمو، يتطورهذا الكامبيوم بشكل جانبي ويعطي الخشب الثانوي نحو الداخل واللحاء الثانوي نحو الخارج، الكامبيوم الذي يكون مقابل للخشب الأول(protoxylème) ينقسم بنشاط مكون حلقة تفصل الخشب الإبتدائي عن اللحاء الإبتدائي، وعن طريق عدة إنقسامات للداخل والخارج الكامبيوم يضيف الخشب الثانوي واللحاء الثنوي ، الخلايا البرانشيمية التي تمر من خلال الأنسجة الثانوية تشكل أشعة. بزيادة سمك الخشب الثانوي واللحاء الثانوي، يتم إزالة أو سحق اللحاء الإبتدائي فقط ألياف اللحاء الإبتدائي تعطي آثار مرئية للحاء الأولي في البنية الثانوية للجذر (راجع شكل16 صفحة 40 بالجزء النظري). كما يتطور المحيط الدائر بالانقسام الخلوي مشكلا نسيجا مكونا من عدة طبقات من خلايا الطبقة الخارجية منه تعطي طبقة مولدة فلينية(كامبيوم الفليني phéllogéne) التي تعطي البشرة الثانوية (périderme) التي تتكون من الفلين نحو الخارج و الأدمة الفلينية إلى الداخل، حيث خلايا السطح الخارجي تكون متفلنة و تتكون من مواد كارهة للماء. كما تمثل البشرة الثانوية نسيج متقطع حرشفي، ظهور البشرة الثانوية يتبع دائما تمايز الخشب الثانوي واللحاء الثنوي. أما بقية خلايا المحيط الدائر يمكن أن تنتج نسيج مشابه للبرانشيم القشري بتكوين البشرة الثانوية (périderme)، البرانشيم القشري بما فيه الأدمة الباطنة والبشرة فضلا عن باقي أنسجة الجذر تنتهي بالموت ويتم إزالتهما.

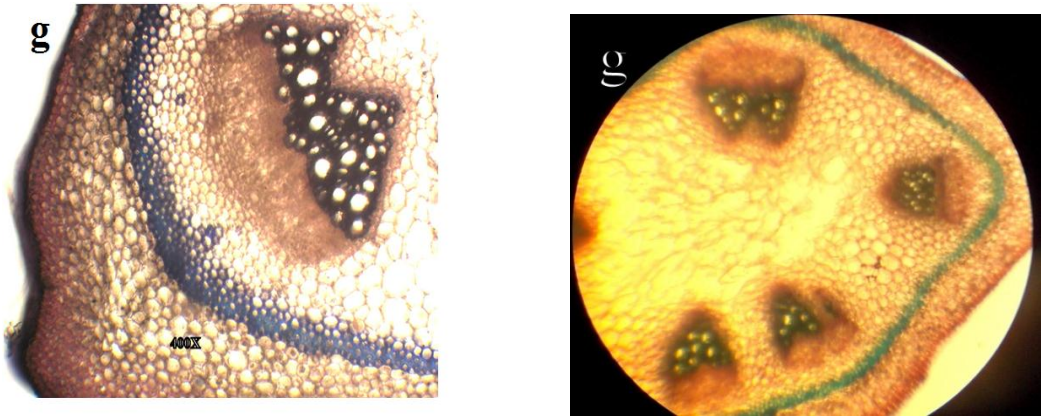
خلال السنة الأولى من النمو الأنسجة التالية تترتب في جذر عشبي من الخارج إلى الداخل : بقايا من البشرة والبرانشيم القشري، البشرة الثانوية (périderme)، المحيط الدائر، اللحاء الإبتدائي (ألياف وهمية وخلايا ذات جدران رقيقة مسحوقة)،اللحاء الثانوي، الكامبيوم والخشب الثانوي، وقد طابقت هذه الأنسجةأنسجة المقطع العرضي الذي تحصلناعليها في شكل (f،32). داخل الأسطوانة المركزية، الخشب الثانوي ينتظم في شكل أشعة، مفصولة بواسطة البرانشيم،وقد طابقت شكل(h،32).

كما بين Letondor (2014) أن تضخم أسفل الفلقةhypocotyle يتم أساسا بانقسام الخلايا البرانشيمية التي تحيط بأوعية الخشب، وبتطور هذه الأوعية. والكامبيوم المتشكل في البداية يعطي حلقة من الأوعية الخشبية مباشرة تحت البشرة الثانوية والمحيط الدائر(أين توجد أوعية اللحاء)، وبذلك يحدث تضخم في حجم الأسطوانة المركزية مما يؤدي إلى تمزق كل من القشرة والبشرة حيث خلايا هذه الأنسجة بعد الإنتهاء من مرحلة التمايزلن تستطيع الإنقسام مرة أخرى مما يؤدي إل تمزقها. رغم أن التثخن يبدأ مبكرا

إبتداءا من ظهور الأوراق الأولى، إلا أن تمزق البشرة والقشرة نعتبره الزمن صفر لآلية تشكيل الدرنة.
كما يظهرأن النسغ الذي يغذي الدرنة هو النسغ الناقص.
نستنتج من تتبع مراحل تشكيل الدرنة ومن المقاطع العرضية لدرنة فتية أن درنة نبات *Aristolochia longaL.* تعتبردرنة جذر.

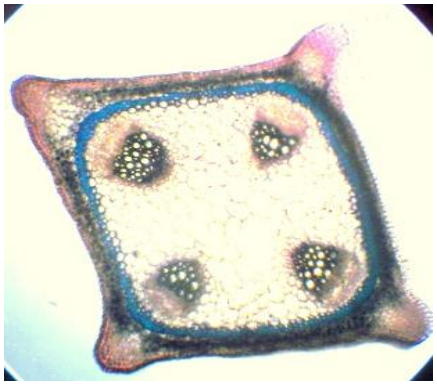
III-2 -4 –4 تطور بنية السيقان الهوائية

لاحظنا من خلال المقاطع العرضية لمختلف مواضع في سيقان هذا النبات، أن هناك تطور في بنية السيقان الفتية، حيث لاحظنا من خلال أشكال المقاطع العرضية تزايد في عدد الحزم وهناك تضاعف في الحزمة الوعائية كما يظهر في الشكل(33 g)، وهذا يرجع لعمل النسيج المولد للأنسجة الناقلةالخشب واللحاء وهوالكامبيوم. أي تشكل حزم وعائية جديدة وهذا التطورفي عدد الحزم الوعائية من 4 حزم إلى

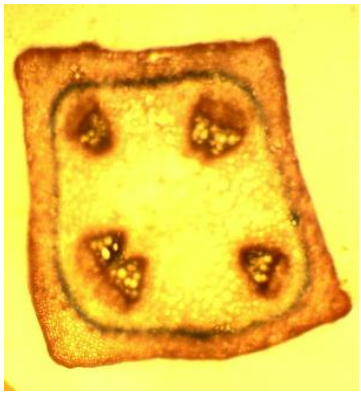


شكل 33.ظهور إزدواج الحزمة الوعائية بالمقطع العرضي للساق بتكبيرX400

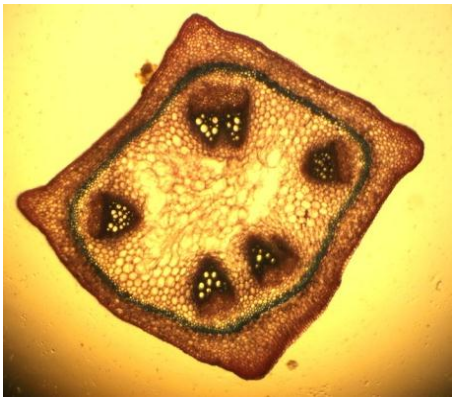
أكثريؤدي إلى البنية الثانوية للساق، حيث تزداد عدد الحزم والأنسجة الدعامية مثل الكولنشيم وهكذا يذهب النبات إلى التغلظ والبنية الثانوية الأكثر تعقيد، تطوربنية الساق الفتي واضحة في الشكل34 (أ،ب،ج ،د وهـ)، حيث يمثل الشكل أ مقطع عرضي في ساق فتي، أما باقي الأشكال فهي نتيجة لمقاطع عرضيةمن مناطق أخرى في أعلى الساق أي كان مكان أخذ العينات من أسفل الساق إلى أعلى أي حسب نمو الساق، نجد مقاطع أكثر تطور خاصة من ناحية عدد الحزم أين نجد تزايد في عددها من أربعة حزم إلى ثمانية، تتميزهذه المقاطع بوجود طبقة واحدة من خلايا البشرة، وجود قشرة ضيقة جدا، كما نميز في زوايا المقطع وجود كتل من النسيج الكولنشيمي الذي يظهر باللون الوردي يليها المحيط الدائر المتمثل في النسيج السكلرنشيمي الذي يظهر باللون الأخضرو يشكل حلقة تحيط بالحزم الوعائية المرتبة بشكل حلقة، وأخيرا اللب الذي يحتل وسط المقطع وتكون خلاياه برانشيمية كبيرة الحجم ومضلعة.



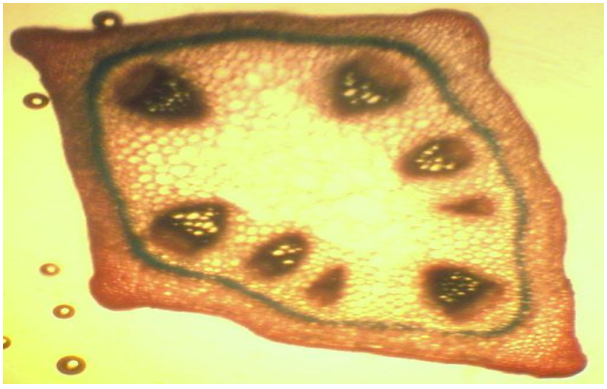
أ



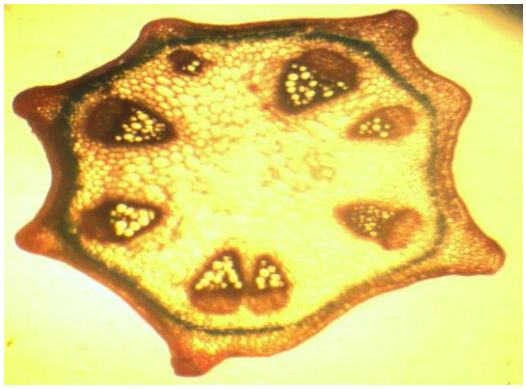
ب



ج



هـ



د

شكل34 .مراحل تطور عدد الحزم الوعائية و تغير في شكل مقطع الساق الهوائية(أ،ب،ج،د وهـ) بتكبير X100.

نستنتج من هذه الدراسة أن الكامبيوم الموجود بين الخشب واللحاء هو المسؤول عن توليد حزم وعائية جديدة وهذا من أجل أن تستطيع هذه الأنسجة الناقلة أن تواكب تطور بنية النبات وتلبي حاجياته من النسغ الناقص والكامل، حيث يتميزالنموالثانوي بتكوين أنسجة وعائية جديدة تتزايد كميتها مع النمو الثانوي في السمك مما يؤدي إلى ازدياد قطر الساق.

وقد أشار Friedel (1921) أن الحزم الوعائية في الساق تكون متغيرة، ويمكن أن يرجع هذا التغير إلى إزدواج أو تضاعف الحزم الوعائية أو إلتحام حزمتين وعائيتين كانت في الأصل منفصلة. كما ذكر أن في جميع السلاميات، مباشرة بجوارالعقد يكون عدد الحزم جد متغير وأكبر بكثير من وسط السلامية.

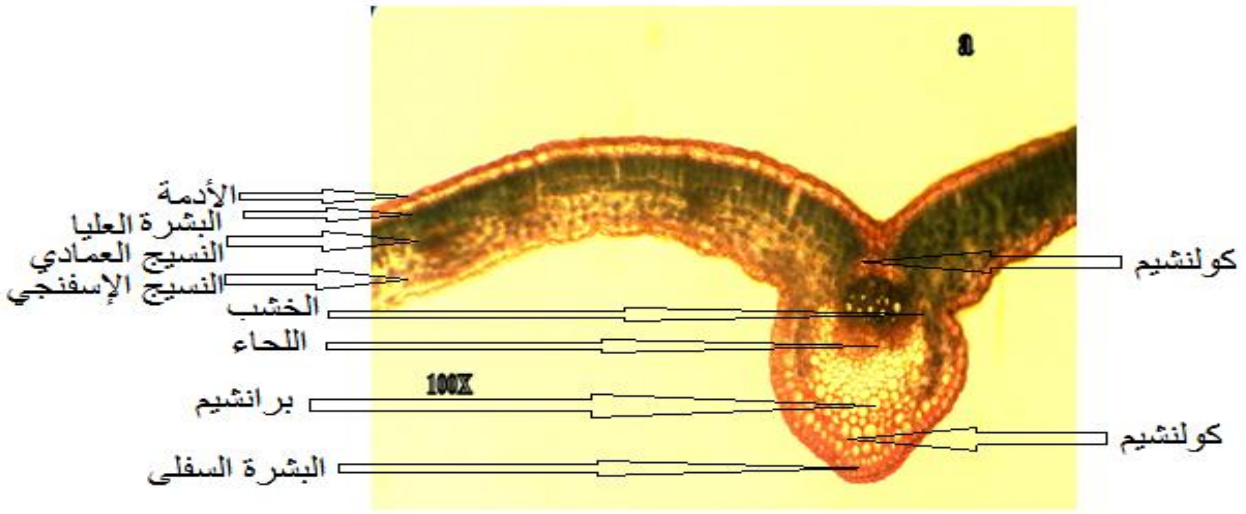
حسب الشكل العام للمقاطع العرضية التي تحصل عليها .Wagner et al(2014) في سيقان بعض الأنواع التابعة لجنس *Aristolochia*، *Aristolochia gigantea*، *A. leuconeura* ، *A. grandiflora* ،

A.ovalifolia، *A. triactina*، *A. leuconeura* و *A. serpentaria* ، فنلاحظ تشابه مع المقطع العرضي لساق *A. longa* من ناحية أنواع الأنسجة الموجودة وترتيبها.

III-2 -5 -الدراسة التشريحية للأوراق

نلاحظ من خلال المقاطع العرضية الخاصة بالورقة(شكل35 a،) مايلي :

البشرة صف واحد من الخلايا مستطيلة الشكل نوعا ما وتغطى بطبقة من الكيوتين تسمى الأدمةأو الكيوتيكل(cuticule) والتي تظهر بشكل واضح في الطبقة العليا من الورقة (شكل35a)،



شكل35. مقطع عرضي لورقة نبات *Aristolochia longa* L.

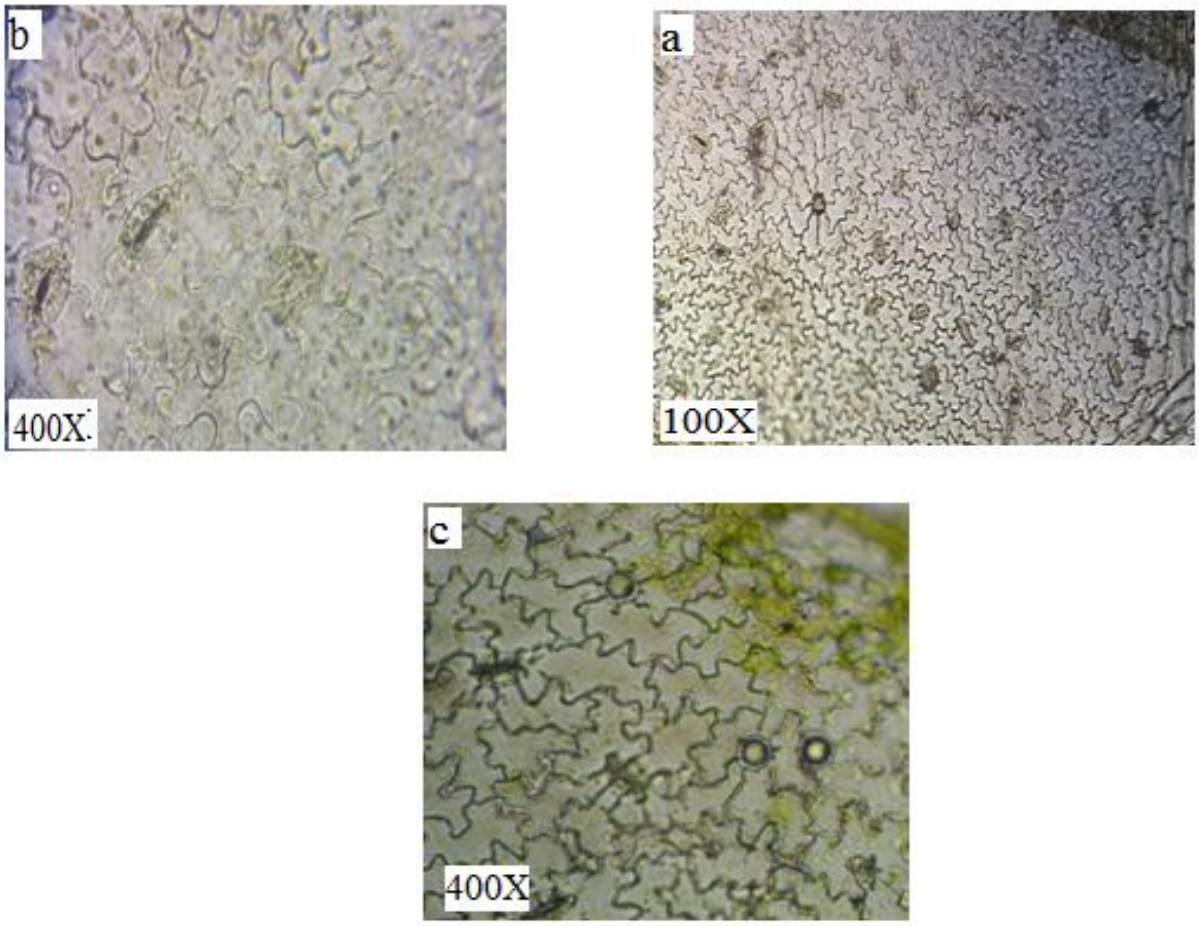
تحت البشرة مباشرة نميز طبقة من نسيج الكولنشيم يظهر باللون الوردي، الحزمة الوعائية في العرق الرئيسي والعروق الثانوية تكون جانبية بتوضع الخشب فوق اللحاء، حيث يتجه اللحاء جهة البشرة السفلى لنصل الورقة و الخشب بدوره يتجه نحو البشرة العليا، يحيط بالحزمة الوعائية الرئيسية نسيج برانشيمي عادي يظهر باللون الوردي، يتميز نصل الورقة بوجود طبقة من الخلايا المتطاولة و المتراصة تحت البشرة مباشرة تسمى بالنسيج العمادي ويكون غني بالصانعات الخضراء كما يظهر في الشكل a، ويليه مباشرة النسيج الإسفنجي الذي يتميز بوجودالفراغات البينية وتتخلله الحزم الوعائية الثانوية(شكل35a) يشكل هذين النسيجين النسيج المتوسط، تليه مباشرة طبقة من البشرة من الجهة السفلية، تتميز هذه الجهة بوجود زوائد تمتد من خلايا البشرة الخارجية أي السفلى على شكل شعيرات غدية(trichomes) تتكون من أقل أو أكثر من ثلاث خلاياالأولى قاعدية والثانية في الوسط والثالثة قمية معكوفة، توجد هذه الشعيرات في مستوى الحزمة الرئيسية والنصل (شكل36b،c) دورها إفرازبعض المواد كالزيوت. لكن نلاحظ عدم وجود هذه الشعيرات في البشرة العليا للورقة.

وهي تشبه في الشكل الظاهري الشعيرات الموجودة على السطح الخارجي لورقة نبات *Aristolochia bracteolata* كما وصفها Thirumal et al. (2012).

شكل36. الشعيرات الموجودة على سطح السفلي من الورقة.

كما تتوزع على سطح البشرة ثغور(شكلa37،b) و قد صنفنا هذه الثغور الموجودة على مستوى ورقة *Aristolochia longa* L. إلى النوع الشقيقي (Ranunculaceous) حسب أنواع الثغور التي ذكرها البازوآخرون (2008) حيث عرفها هذا الأخيربأنها تتميز بعدم وجود أي خلايا مساعدة تحيط بالخلاياالحارسة، التي تتوزع دون نظام معين تحيط بها خلايا البشرة العادية،وقد وجد Thirumal et al. (2012) نفس النوع من الثغور على سطح أوراق*Aristolochia bracteolata* ، كما نلاحظ وجود إضافة إلى الثغورغدد إفرازية داخلية في شكل قنوات(شكلc37).

و حسب laberche (2010) فإن الأنسجة الإفرازية تتمثل في خلايا حية معزولة متساوية الأقطارذات جدران بكتوسيلولوزية توجد في البراشيم القشري للسيقان وفي برانشيم الأوراق، تتميزهذه الخلايا بأنها تكدس في فجواتها العصارية المركبات المصنعة، كما توجد أيضا قنوات إفرازية جدرانها سيليلوزية خلاياها حية تفرز المركبات المصنعة في جيوب وقنوات.



شكل37. شكل ثغورعلى مستوى بشرة ورقة نبات *Aristolochia longa* L.

III-2 -6 الدراسة التشريحية لزهرة *Aristolochia longa* L.

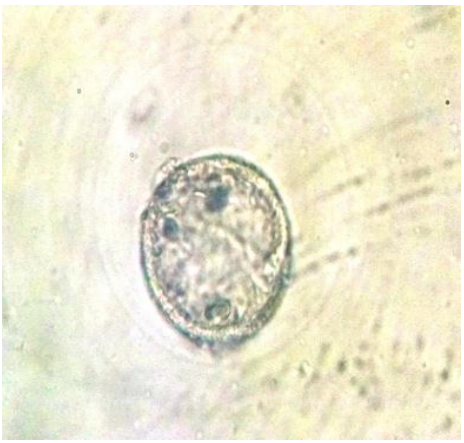
يبين المقطع الطولي لزهرة نبات *Aristolochia longa* L. شكل (38) أن هذه الزهرة هي زهرة خنثى حيث أنها تحتوي على أعضاء التكاثر الذكرية(الأسدية) والأنثوية(المبيض)،وهي علوية لأن المقطع الطولي للزهرة يبين أن المبيض يكون سفلي ويكون ملتحم مع التخت أو الكرسي (شكل39)، كل المحيطات الأخرى من السبلات ،البتلات والأسدية تعلو المبيض(شكل39) وقد ظهر شكل المياسم في الشكل(40) وعددها ستة، أما المقطع العرضي في الزهرة فقد أظهر أن المبيض يتكون من ستة (6)كرابل (شكل41). كما ظهر القلم قصير في الشكل(42،أ وب)، وقد ظهرت 6 مآبرلستة أسدية ملتحمة بالقلم وشكلت مايسمى بالـgynostème وقد وافق هذا ماجاء بـه Quesel et Santa(1962)، كذلك أشار Spichiger et al.(2004) أن عند عائلة Aristolochiaceae تكون المآبر،القلم والميسم متحدة لتشكل gynostème. ظهرت في الشكل(42،أ وب) كل سداة تتكون من مئبرالذي يتكون بدوره من فصين وكل فص يتكون من جزأين كل جزء يحتوي على كيس لحبوب الطلع. أما حبة الطلع فكانت ذات شكل دائري كما يبين الشكل (42،ج)، وقد أشار Spichiger et al.(2004)أن حبوب طلع نباتات عائلة Aristolochiaceae من نمط ذات الفتحة الواحدة(monoaperturé). أما الثمرة فهي علبية الشكل(شكل43،أ وب) تفتح بستة (6) صمامات كما يبين الشكل(43،ج)، أماالبذورفهي ثلاثية بشكل قلبي كما يظهر في الشكل(44).

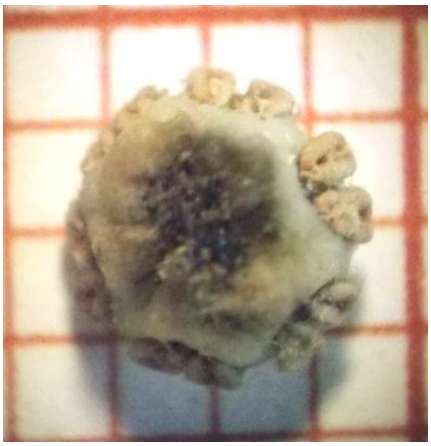
شكل38. زهرة نبات *Aristolochia longa* L

شكل39. مقطع طولي في زهرة نبات *Aristolochia longa* L.(ظهور المبيض ملتحم مع تخت أو كرسي الزهرة) (التكبير X20)

شكل40. مياسم زهرة نبات. *Aristolochia longa* L(التكبير X20)

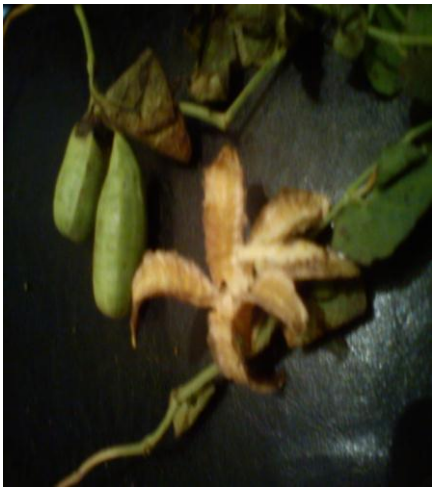
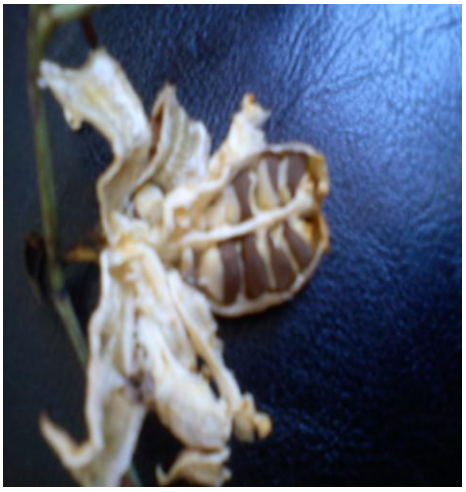
شكل 41.مقطع عرضي في مبيض لزهرة نبات. *Aristolochia longa* L(6 كرابل)(التكبير X20)





ج ب أ

شكل 42. أعضاء التكاثر الذكرية (الأسدية)(أ،ب)، شكل حبة الطلع(ج) لزهرة نبات *Aristolochia longa* L. (التكبير X20)

ج ب أ

شكل43. ثمار نبات *Aristolochia longa* L.(أ-ثمرة علبية، ب-مقطع في الثمرة، تفتح الثمرة بست صمامات).

شكل44 .بذور نبات .*Aristolochia longa* L

III-3-المستخلصات النباتية

تتراوح قيم مردود المستخلصات النباتية بين 1,45% و 10,05% كما هو مبين في الجدول (4)، حيث تتأثرهذه الأخيرة بعدة عوامل منها التركيب الكيميائي والخصائص الفيزيائية للمستخلص النباتي (Dai et Mumper, 2010). نلاحظ في دراستنا أن المستخلص المائي كان له أكبر نسبة من المردود خاصة الثمار(10,05%)، مع العلم أن المستخلصات المائية محضرة بطريقة الغلي في درجة حرارة عالية لمدة 10دقائق وهذا يتوافق مع ما ذكره .Su et al(2006) أن فعالية طريقة الاستخلاص المائي تتزايد مع درجة الحرارة. وهذا يفسر أن درجة الحرارة العالية للماء تسبب اضطراب في الخلايا مما يسهل دخول المذيب وانحلال الجزيئات.(Albano et Miguel, 2010)

كذلك بين .Martins et al (2015) أن طريقة الغلي تسمح بالحصول على أعلى تركيز من المركبات الفينولية (الأحماض الفينولية والفلافونويدات) تليها طريقة الشاي النباتي (infusion) و الإستخلاص الهيدروكحولي. كما أكد .Koruthu et al(2011) أن الفينولات الذائبة في الماء تكون لها أهمية كمركبات مضادة للأكسدة. و في دراسة أخرى تبين أن المذيبات القطبية تؤثر بدرجة عالية على مردود الإستخلاص والنشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية (Metrouh-Amir et al.,2015) . في الأخير توافقت دراستنا مع دراسة(2014) .Khaled-Khodja et al حيث استنتج ان فعالية الإستخلاص ترتبط بعدة عوامل منها زمن الإستخلاص، درجة الحرارة، حجم ونوع المذيب المستعمل.

جدول 4. مردود المستخلصات المحضرة من نبات *Aristolochia longa L.*

المستخلص	المـــــــــــــائي			الميثانـــــــــــــولي			الأسيتونـــــــــــــي		
	هوائي EAF	ثمار EAFr	درنات EAT	هوائي EMF	ثمار EMFr	درنات EMT	هوائي ESF	ثمار ESFr	درنات EST
المردود % w/w	**8.65**	**10.05**	**2.7**	**3.35**	**2.15**	**4.35**	**6.4**	**2.75**	**1.45**

III-4 التحليل الكيميائي لنبات *Aristolochia longa* L. Analyse phytochimique

III-4-1التحليل النوعي Analyse qualitative

تم الكشف اللوني على المركبات الفعالة الموجودة في مستخلصات المحضرة انطلاقا من غبرة الجزء النباتي المختبر، حيث يعتمد هذا الإختبار على التفاعلات اللونية وتشكل رواسب وهذا باستعمال كواشف كيميائية محددة. يعتبر هذا الإختبار بمثابة تقدير أولي لتواجد المكونات الفعالة في المادة النباتية.النتائج المتحصل عليها مدونة في جدول(5):

جدول5.نتائج التحليل الكيميائي النوعي لنبات *Aristolochia longa* L.

المكونات	الجزء الهوائي	الثمار	الدرنات
الفينولات الكلية	+	+	+
الفلافونوييدات	+	+	+
مواد الدباغة	+	+	+
التربينوييدات	-	+++	+
القلويدات	+++	++	+
الصابونين	+	-	-
الكينون	-	-	-
الأنتراكينون	-	-	-
البروتينات	+	+++	++
السكريات	+	++	+++

+: وجود - :عدم وجود

توضح النتائج أن معظم المركبات الفعالة متواجدة في مختلف أجزاء نبات. *Aristolochia longa*Lحيث ميزنا وجود كل من الفينولات الكلية، الفلافونوييدات،القلويدات و مواد الدباغة التي ظهرت باللون الأخضر و تدل على أنها مواد دباغة كاتيشولية (tanins catécholiques)، حسب ما أشار إليه Koruthu et al. (2011) أن اللون الأزرق يدل على المواد الدباغة الغاليكية (tanins galliques)، بينما اللون الأخضريدل على مواد دباغة كاتيشولية (tanins catécholiques)، وقد وافقت هذه النتائج ماتوصل إليهBenraba et Meddah (2014) أن المستخلص المائي للدرنات يحتوي على مواد دباغة كاتيشولية. أما الصابونين فقد تم الكشف عنه في الجزء الهوائي فقط وغاب في الثمار والدرنات وهذه النتيجة الأخيرة كانت عكس ما وجد Benraba et Meddah (2014) حيث وجد الصابونين في المستخلص المائي للدرنات. كما غابت الكينونات والأنتراكينون في أجزاء النبات الثلاثة وقد وافقت هذه النتيجة ماتوصل إليه Benraba et Meddah (2014). أما التربينوييدات فقد غابت في الجزء الهوائي وتواجدت في كل من الثمار والدرنات. في الأخير المركبات الأساسية مثل السكريات والبروتينات تواجدت في كل من الجزء الهوائي ،الثمار و الدرنات. وقد أشارت Bliss et al. (2009) أن أنواع *Aristolochia* تحتوي على مستقلبات ثانوية تعتبر مركبات طبيعية مهمة في الطب الشعبي، كما ذكر.Pacheco et al(2009) أن الدراسة الكيميائية لأنواع *Aristolochia* تكشف عن وجود القلويدات، الكينونات،الكومارين، الفلافونوييدات والأحماض الدهنية، وكذلك التربينوييدات التي تعتبر مكونات الزيت الأساسي المعزول من أنواع هذا النبات أهمها مشتقات كوران kaurane، كليرودانclerodane ولبدان labdane.

III-4-2التحليل الكمي Analyse quantitative

نتائج كل من الفينولات الكلية، الفلافونويدات، الفلافون والفلافونول ومواد الدباغة موضحة في جدول رقم 6.

III-4-2 -1 تقدير الفينولات الكلية

تم تقدير الفينولات الكلية للمستخلصات الثلاثة المائي، الميثانولي والأسيتوني لكل من الجزء الهوائي، الثمار والدرنات بطريقة Folin-Ciocalteu حيث تعتبر من أفضل الطرق لتقدير الفينولات الكلية بما فيهم مواد الدباغة(Li et al.,2007). و قد تم تحديد مقدارالمركبات الفينولية باستعمال المعادلة المستنتجة من منحنى العيارية الذي يبين أن الإمتصاصية تتناسب طرديا مع تركيزحمض الغاليك تركيزات (شكل45) ($A=0,089X+0,0199(R^2=0,9995)$، حيث A تمثل الامتصاصية و X هو تركيز حمض القاليك بالميكروغرام.

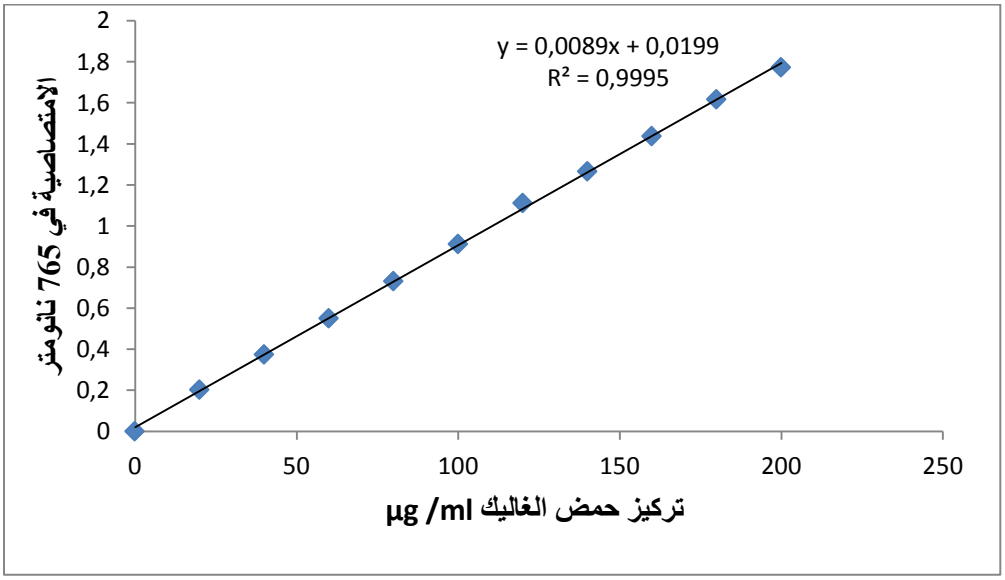
أظهرت النتائج المبينة في جدول(6) أن قيم عديدات الفينول تكون مرتفعة في كل المستخلصات مقارنة مع باقي المركبات، وقد تميز المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي (ESF) بأكبر تركيز(µg/mg525,43)

يليه المستخلص المائي للثمار(EAFr) بـ 518,54µg/mg. نعبر عن النتائج بـ µgالمكافئ لحمض الغاليك / mg من المستخلص (GAE) .

نستنتج من هذه النتائج أن كل المذيبات لها القدرة على استخلاص المركبات الفينولية لكن بدرجات مختلفة ومتفاوتة قد يرجع ذلك إلى نوع المذيب، طريقة الاستخلاص المتبعة، الجزء النباتي المختبرونمط المركبات الفينولية الموجودة.

وجد Djeridane et al. (2006) نسبة المركبات الفينولية في المستخلص الميثانولي للدرنات نبات *Aristolochia longa* L. تقدر بـ 1,47±0,02 مغ حمض الغاليك/غ المستخلص الجاف، أما Benraba et Meddah(2014) قد وجدا 6.07 ± 0.12 مغ حمض الغاليك/غ المستخلص الجاف في المستخلص المائي لدرنات نفس النبات، لكن النتائج التي تحصلنا عليها كانت أعلى من هذه النتائج وقد نفسرهذا الاختلاف باختلاف المنطقة (طبيعة التربة) والظروف المناخية أوالبيئية وأيضا الخصائص الوراثية للنبات.

يتضح من خلال النتائج المتحصل عليها أن مستخلصات نبات *Aristolochia longa L.* تكون غنية بالمركبات الفينولية. مع العلم أن المركبات الفينولية مثل الفلافونويدات، الأحماض الفينولية و مواد الدباغة تساهم بصفة أساسية في النشاطية المضادة للأكسدة للنباتات(Li et al.,2007). وقد أشير إلى أن المركبات الفينولية لها تأثير مثبط بشكل خاص على الطفرات والسرطان لدى البشر، عند تناولها بنسبة تصل إلى 1غ يوميا باتباع نظام غذائي غني بالفواكه والخضروات(Djeridane et al.,2006).



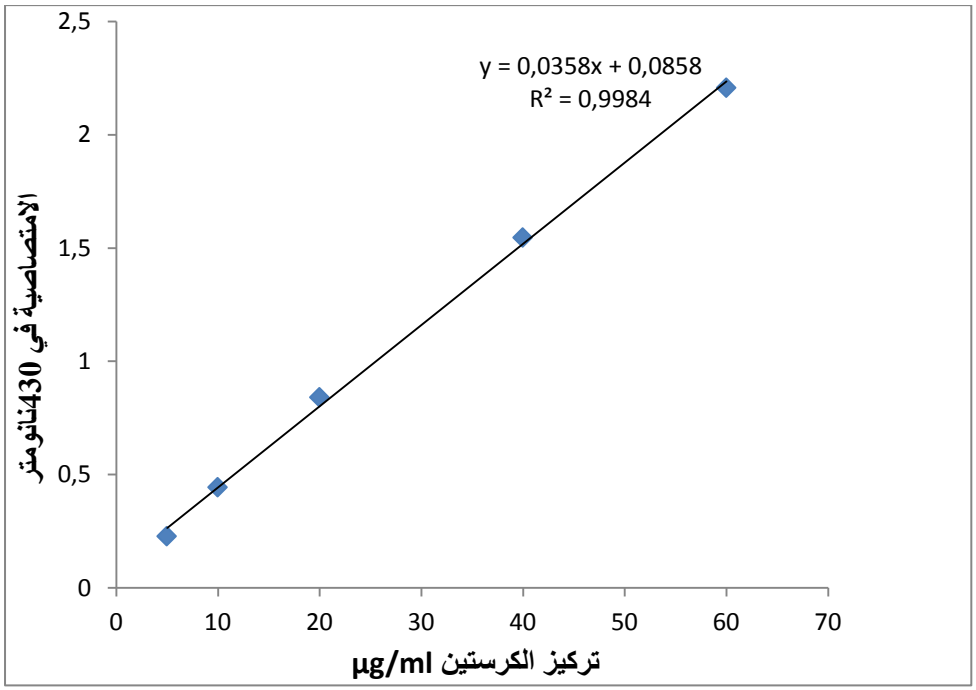
شكل45. منحنى العيارية لحمض الغاليك لتقدير الفينولات الكلية

III-4-2-2 تقدير الفلافونويدات

لتقدير الفلافونوييدات تم استعمال كلور الألمنيوم $AlCl_3$ واستعمل الكرستين كمرجع،كمية الفلافونوييدات يعبر عنها بما يعادل ميكوغرام من الكرستين المكافئ/ميليغرام من المستخلص و يعبر عنها بالمعادلة التالية: $A=0,0358X+0,0858$ ($R^2=0,9984$) (شكل46).

تراوح تركيز الفلافونويدات بين 4,86 و52,37±0,94 ميكروغرام كرستين مكافئ/مغ من المستخلصات(جدول6)، وقد وجد المحتوى الأكبر للفلافونويدات في المستخلص الميثانولي للجزءالهوائي(EMF) والمستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي(ESF) (52,37±0,94 و37,54±0,98 ميكروغرام كرستين مكافئ/مغ من المستخلصات)على الترتيب، أما بقية المستخلصات فكانت نسبة الفلافونوييدات فيها أقل.

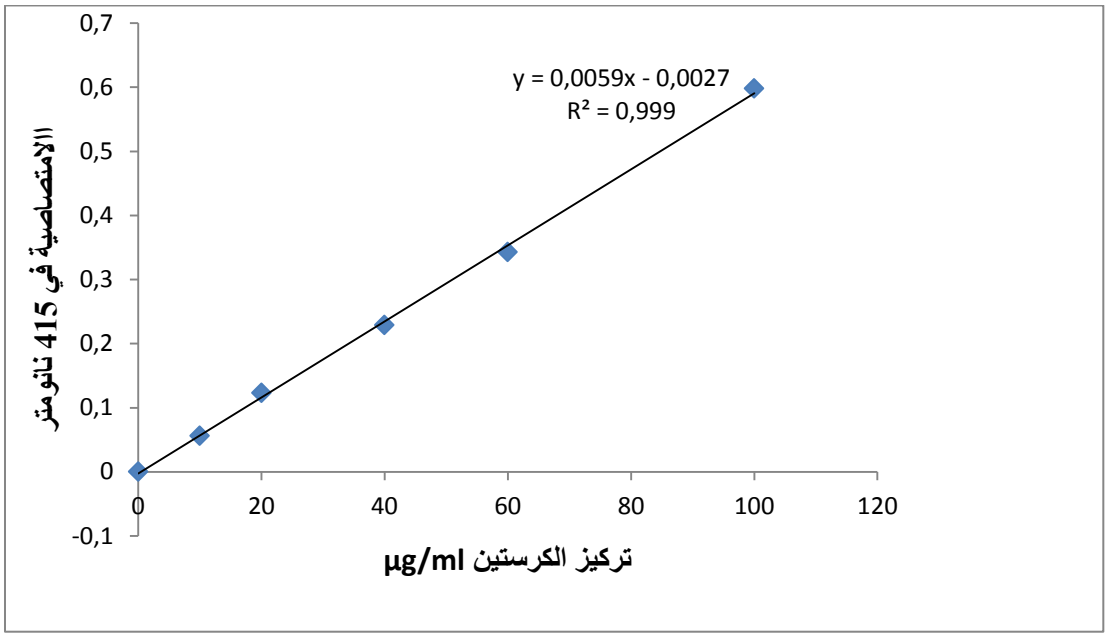
وجد Djeridane et al. (2006) أن نسبة الفلافونوييدات في المستخلص الميثانولي لدرنات نبات *Aristolochia longa* L. تقدر بـ 0,81±0,02 مغRE /غ المستخلص الجاف، لكن النتائج التي تحصلنا عليها كانت أعلى من هذه النتائج وقد نفسرهذا الاختلاف باختلاف العوامل سالفة الذكر (المنطقة و المناخ).



شكل46. منحنى العيارية للكرستين لتقدير الفلافونويدات

III-4-2-3 تقدير الفلافون والفلافونول

يعبرعن مقدار الفلافون و الفلافونول بالميكروغرام الموافق للكرستين في ميليغرام من المستخلص، تحصلنا على منحنى العيارية (شكل47) ذو المعادلة التالية (R^2=0,999) A=0,059X-0,0027 . تتراوح قيم الفلافون والفلافونول كما هو موضح في الجدول (6) بين 21,64 ± 1,19و85,37 ±5,03 ميكروغرام كرستين/مغ من المستخلص الجاف، وقد لاحظنا من النتائج أن المستخلصات المائية تحتوي على كمية قليلة من هذه المركبات مقارنة مع المستخلصات الميثانولية والأسيتونية أين نجد أكبر كمية في المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي(EMF) بـ85,37±5,03 و 75,45±4,35 mg/µg في المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي(ESF) ، النتائج التي تحصلنا عليها في المستخلص الميثانولي للدرنات كانت مرتفعة مقارنة مع النتائج التي تحصل عليها.Djeridane et al (2006) مع نفس النبات ونفس المستخلص حيث قدرت بـ 0,41±0,002مغRE/ غ المستخلص الجاف.



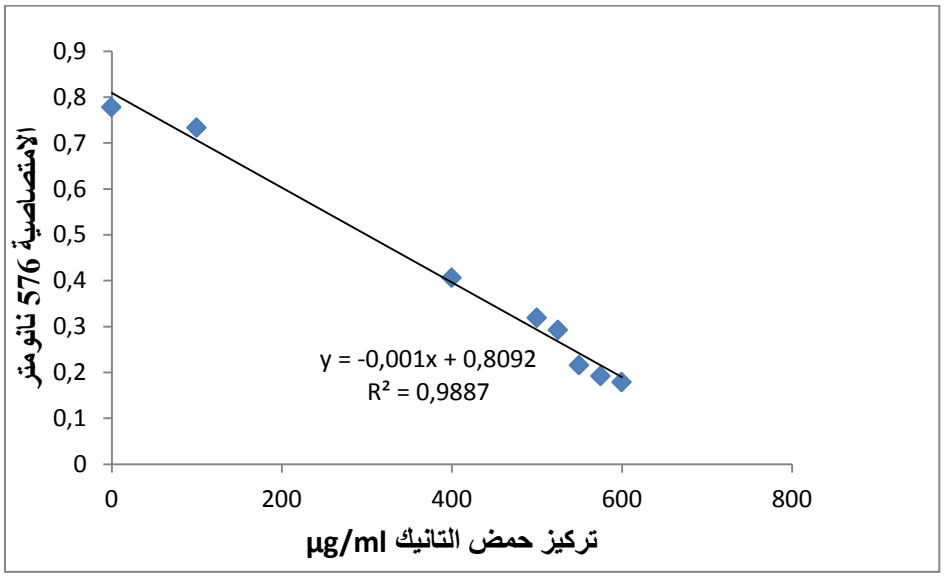
شكل 47. منحنى العيارية للكرستين لتقدير الفلافون والفلافونول

III-4-2-4 تقدير مواد الدباغة

تقدر مواد الدباغة باتباع طريقة ترسيب الهيموغلوبين، حيث يعتمد هذا الاختبار على ترسيب هيموغلوبين كريات الدم الحمراء المنفجرة، بفعل مواد الدباغة للمستخلصات النباتية مما ينتج عنه جزء طافي فاقد لونه يعكس محتوى النبات من هذه المواد.

يعبر عن مواد الدباغة بالميكروغرام الموافق لحمض التانيك في ميليغرام من المستخلص، حيث تحصلنا على منحنى العيارية ذو المعادلة التالية(شكل48) : A= -0,01X+0,8092 وr^2 =0, 9887

أظهرت النتائج(جدول6) أن هناك تفاوت في كمية مواد الدباغة حسب المستخلصات، حيث تميزت المستخلصات الميثانولية بأعلى النسب خاصة المستخلص الميثانولي للدرنات (EMT) الذي كانت لديه أكبر نسبة (4,61±206,93)ميكروغرام حمض التانيك /مغ من المستخلص، وقد يرجع هذا الإختلاف في النتائج إلى نوع المذيب والجزء النباتي المختبر، حيث أشار seidel (2005) أن الماء والميثانول التي تعتبر من المحاليل القطبية تستعمل خاصة في استخلاص كل من الفلافونويدات الغليكوزيدية و مواد الدباغة، علما أن هذه الأخيرة تصنف حسب Brunetone(1999) إلى دباغ قابلة للذوبان في الماء وأخرى مكثفة لا تذوب في الماء.



شكل 48. منحنى العيارية لحمض التانيك لتقدير مواد الدباغة

جدول 6. محتوى المركبات الفينولية في مستخلصات نبات *Aristolochia longa* L.

المركبات الفينولية المستخلص	الفينولات الكلية **مكافئ ميكروغرام حمض الغاليك لكل مغ من المستخلص**	الفلافونويدات **مكافئ ميكروغرام كرستين لكل مغ من المستخلص**	**الفلافون وفلافونول** **مكافئ ميكروغرام كرستين لكل مغ من المستخلص**	مواد الدباغة **مكافئ ميكروغرام حمض التانيك لكل مغ من المستخلص**
المستخلص المائي للجزء الهوائي(EAF)	8,86±396,88	0,23 ± 9,92	0,7 1 ± 27,40	2 ± 54 ,4
المستخلص المائي للثمار(EAFr)	14,93 ± 518,54	0,15 ± 5,81	1,19 ± 21,64	0,09 ± 14,14
المستخلص المائي للدرنات(EAT)	9,90± 293,82	0 ± 4,86	0,71 ± 23,16	1,52 ± 21,2
المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي(EMF)	3,77 ± 132,33	0,94 ± 52,37	5,03 ± 85,37	2.78 ± 99,36
المستخلص الميثانولي للثمار(EMFr)	8,49 ± 260,25	0 ± 9,33	0,35 ± 74,94	5.10 ± 155,46
المستخلص الميثانولي للدرنات(EMT)	13,49 ± 224,29	0,47 ± 15,42	1,91 ± 62,15	4,61 ± 206,93
المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي(ESF)	29,6 ± 525,43	0,98 ± 37,54	4,35 ± 75,45	5.12 ± 132,3
المستخلص الأسيتوني للثمار(ESFr)	4,27 ± 264,91	0,25 ± 6,13	0,23 ± 37,23	3.96 ± 130,8
المستخلص الأسيتوني للدرنات(EST)	51,50 ± 427,31	0,19 ± 7,63	1,79 ± 31,05	0,64 ± 14,98

المركبات الفينولية لديها القدرة على إزاحة الجذور الحرة وهذا راجع لامتلاكها مجموعة الهيدروكسيل، وهي معروفة بقدرتها المضادة للأكسدة (Sushila Devi et al.,2014). المركبات الفينولية مثل الدباغ و الفلافونويدات تعتبرمن أهم العوامل المساهمة في القدرة المضادة للأكسدة للنبات، كذلك النشاطية البيولوجية للنباتات مثل النشاطية المضادة للبكتيريا تستطيع أيضا أن تكون مرتبطة بالمركبات الفينولية (Khaled-Khodja et al., 2014).

III-4-2-5- تحديد وجود الليكوبين، بيتا كاروتان ، كلوروفيل أ و كلوروفيل ب

اعتمدت هذه الطريقة على طول موجة امتصاص الألوان، ويتضح من النتائج المبينة في جدول (7) أن كل من بيتا كاروتين(ß-caroténe) و الليكوبين (lycopéne) وجدت بنسب قليلة حيث تراوحت قيم المركب الأول بين0,023 ±0,001 و36 1,0±0,1 mg/µg من المستخلص، وقدتميز كل من المستخلص الميثانولي والأسيتوني للجزء الهوائي بأكبرنسبة (36 1,0±0,1 و0,947 ±0,067mg/µg) على الترتيب،في حين كانت قيم المركب الثاني ليكوبان على شكل آثار فقط (0,0065±0,0005 و0,690 ±0,045mg/µg) وقد غاب هذا المركب في كل من المستخلص المائي والميثانولي للدرنات.

أما فيما يخص تقدير الكلوروفيل، فقد ارتأينا تحديد كميته في المستخلصات النباتية ومعرفة مدى تأثير عملية الاستخلاص ونوع المذيب المستعمل في كمية الكلوروفيل المتواجدة في النبات، توضح النتائج المدونة في شكل (7) أن المستخلصات المائية تميزت عموما بكمية قليلة لكل من كلوروفيل أ وب، مقارنة مع المستخلصات الميثانولية و الأسيتونية حيث هذه الأخيرة تميزت بأعلى نسبة، وقد نفسر هذا الإختلاف في النتائج بأن الكلوروفيل لا يذوب بصفة جيدة في الماء، أما بالنسبة للمستخلصات الميثانولية فإن الطريقة المتبعة في الاستخلاص تتضمن مرحلة لفصل الكلوروفيل، وفي الأخير الأسيتون يعتبر مذيب عضوي و جيد للكلوروفيل.

جدول7. كمية الليكوبين، بيتا كاروتان ، كلوروفيل أ و كلوروفيل ب المتواجدة في المستخلصات

المستخلص / النتائج (µg/mg)	المستخلص المائي			المستخلص الميثانولي			المستخلص الأسيتوني		
	هوائي EAF	ثمار EAFr	درنات EAT	هوائي EMF	ثمار EMFr	درنات EMT	هوائي ESF	ثمار ESFr	درنات EST
الكلوروفيل أ	0,0295 ± 0,0005	0,069 ± 0,004	0,0395 ± 0,0005	±1,708 0	±0,001 0	±0,068 0,001	±2,122 0,0485	±0,455 0,015	0,287 ± 0,001
الكلوروفيل ب	0,111 ± 0,001	±0,049 0,001	±0,223 0,028	±0,882 0,001	±0,093 0,004	±0,051 0,001	±3,15 0,05	0, 332 0,002±	0,673 0,003±
ß-كاروتين	0,393 ± 0,004	±0,023 0,001	±0,039 0,001	±1,0 36 0,1	±0,549 0,006	±0,638 0,032	±0,947 0,067	±0,88 0,008	0,484 ± 0,016
الليكوبان	±0,0213 0,001	±0,015 0,001	-	±0,305 0,005	±0,0065 0,0005	-	±0,690 0,045	±0,105 0,005	±0,122 0,002

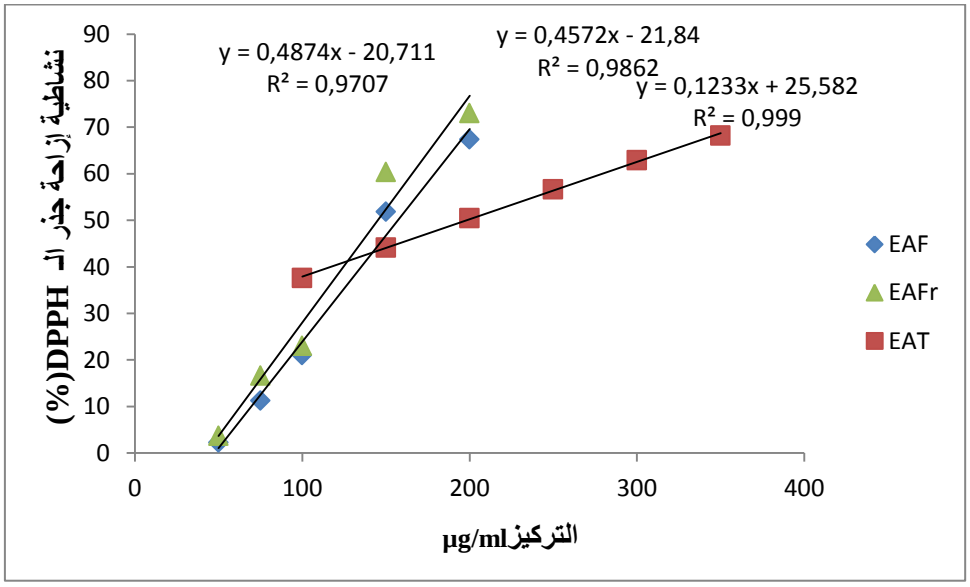
III-5 دراسة النشاطية المضادة للأكسدة Activité antioxydante

إن استعمال عدة طرق بآليات مختلفة يكون جيد من أجل تقييم النشاطية المضادة للأكسدة للنبات، لهذا في دراستنا استعملنا ثلاث طرق تتمثل في في اختبار ازاحة جذرDPPH و تبييضβ –carotene وإرجاع الحديد.

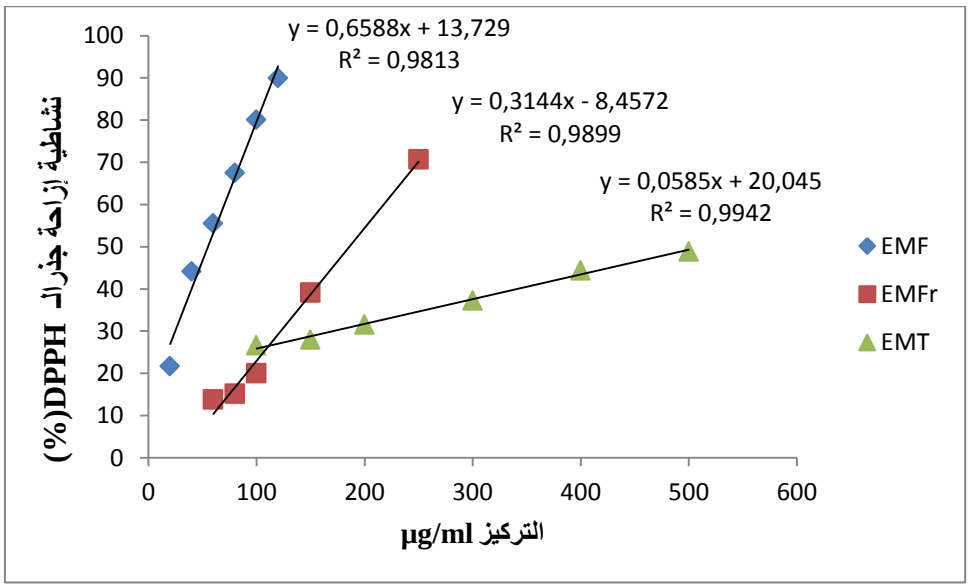
III-5-1إختبار إزاحة جذرDPPH

استعملنا طريقة إزاحة جذر الـDPPH لكونها من أشهر الطرق السهلة والسريعة (لا تتطلب الكثير من الخطوات والكواشف) وغير مكلفة(Alam et al.,2013). تأثير المستخلصات النباتية المدروسة على إزاحة جذرDPPH يقدربـ IC_{50}، حيث المستخلص الذي يملك أقل قيمة من IC_{50}، يحقق أقوى نشاطية مزيحة للجذور.

تم الحصول على منحنيات العيارية لمختلف المستخلصات والشاهد الموجب الموضحة في الأشكال (49،50،51 و52) و التي من خلالها يتم حساب نسبة التثبيط IC_{50} (شكل53) و(جدول8).

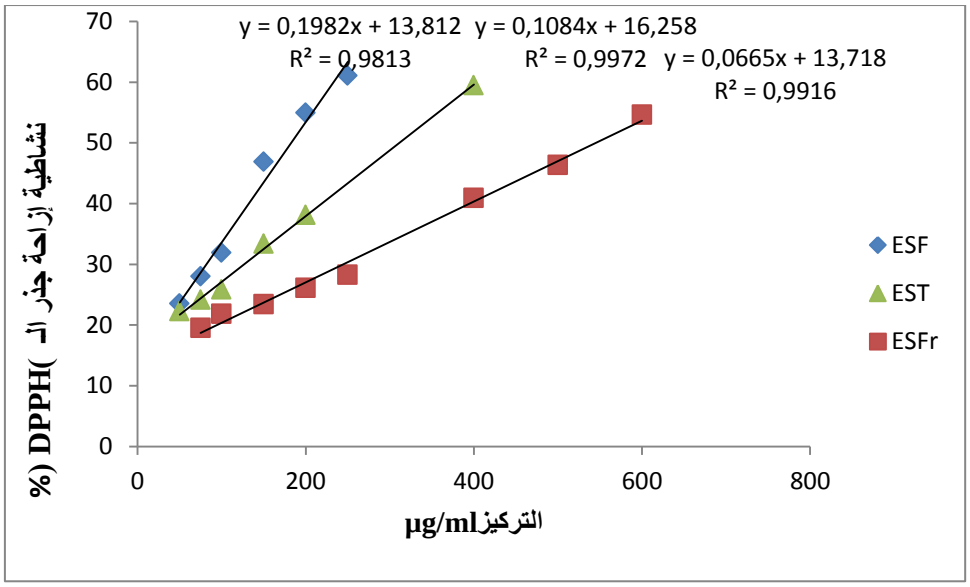


شكل49 . التأثير الإزاحي لمستخلصات المائية *Aristolochia longa* L. (الجزء الهوائيEAF، الثمارEAFr والدرناتEAT) على جذر DPPH



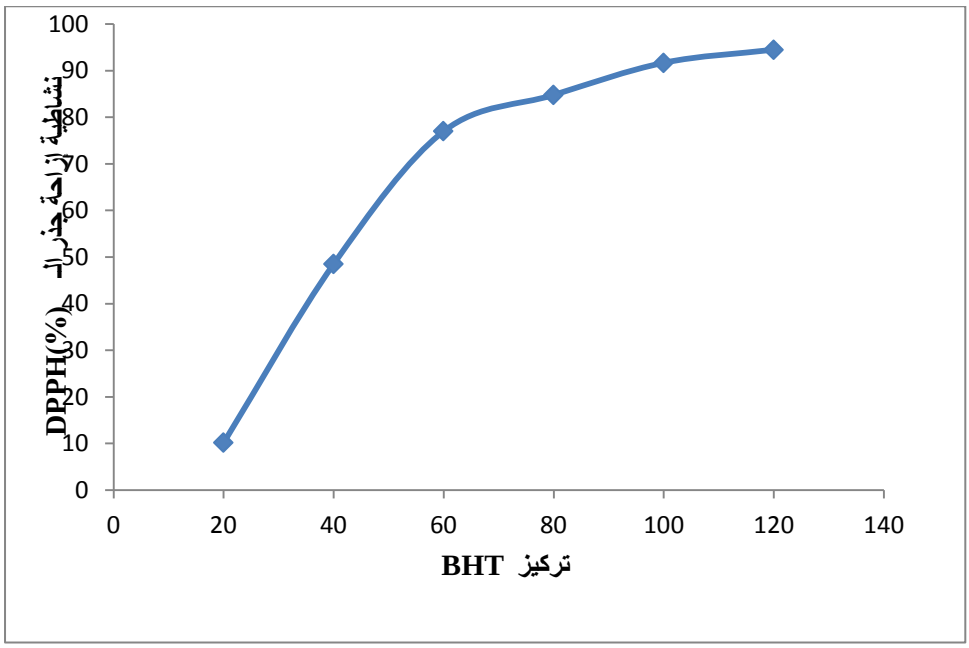
شكل50 . التأثير الإزاحي لمستخلصات الميثانولية *Aristolochia longa* L.

(الجزء الهوائيEMF، الثمارEMFr والدرناتEMT) على جذر DPPH

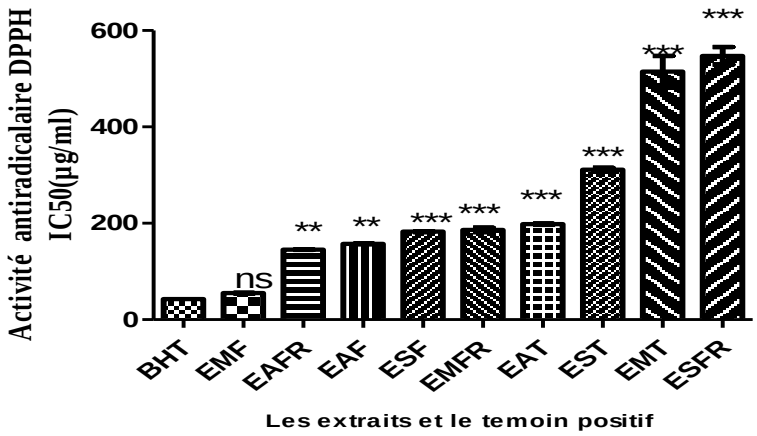


شكل51 . التأثير الإزاحي لمستخلصات الأسيتونية *Aristolochia longa* L.

(الجزء الهوائيESF، الثمارESFr والدرناتEST) على جذر DPPH



الشكل52. التأثير الإزاحي لـ BHT على جذر DPPH



شكل53. تركيز مستخلصات L. ***Aristolochia longa*** المزيحة لـــــــ 50 %من جذرDPPH.

(***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, ns: $p > 0.05$)

جدول 8. النشاطات المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية لـ*Aristolochia longa* L.

المستخلص	**DPPH (µg/ml) IC50**	**القدرة على الإرجاع (mg/ml) EC50**	**اختبار ابيضاض المركب الـβ- Carotène %**
المستخلص المائي للجزء الهوائي(EAF)	157,13 ± 0,26 **	0,632 ± 0,012 ***	30 ±1,73 ***
المستخلص المائي للثمار(EAFr)	145,15 ± 0,78 **	1,862 ± 0,067 ***	16 ± 1,51 ***
المستخلص المائي للدرنات(EAT)	198,06 ± 1,7 ***	5,999 ± 0,075 ***	12 ± 1,65 ***
المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي(EMF)	55,04 ± 1,29 ns	0,200 ± 0,019 ns	33 ± 1,02 ***
المستخلص الميثانولي للثمار(EMFr)	186,21 ± 6,24 ***	1,535 ± 0,035 ***	28 ± 2,83 ***
المستخلص الميثانولي للدرنات(EMT)	514,58 ± 46,38 ***	2,645 ± 0,09 ***	22 ± 2,22 ***
المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي(ESF)	182.59 ± 1,20 ***	1,237±0,09 ***	57 ± 1,79 ***
المستخلص الأسيتوني للثمار(ESFr)	547,29 ± 25,82 ***	2,427 ±0,003 ***	36 ± 3,37 ***
المستخلص الأسيتوني للدرنات(EST)	311,27 ± 5,83 ***	2,499 ± 0,137 ***	23 ± 1,8 ***
(µg/ml) BHT	42,85 ± 0,15	-	
(mg/ml) BHA	-	0,053 ± 0,0009	84 ± 5,45
الكرستين (mg/ml)	-	0,053 ± 0,0001	

***:** فرق معنوي $p< 0.05$ ، ** : فرق جد معنوي $p < 0.01$ ، *** : فرق معنوي عالي جدا $p<0.001$، ns: لايوجد فرق معنوي. IC50 (µg/ml) يوافق تركيزالمستخلص الذي يعطي 50% من النشاطية المضادة للأكسدة، القدرة على الارجاع يعبر عنها بالتركيز الذي يعطي إمتصاصية تعادل 0,5(EC50 (mg/ml).

يعتبرالجذرDPPH (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) الكاشف الأكثراستعمال لتقدير نشاطية إزاحة الجذور الحرة للمركبات (Duan et al.,2006)، وهو بمثابة الجذر الحر الثابت الذي يشهد امتصاصية مميزة عند طول موجة 517 نانومتر، التي تنقص حينما تتعرض لمعطي لذرة هيدروجين أو إلكترون لتصبح جزيئة ثابتة. أثناء الإرجاع محلول الـDPPHيتحول من اللون البنفسجي إلى اللأصفر. وهكذا تدل أقل إمتصاصية عند درجة 517 نانومترعلى أقوى نشاطية مزيحة للجذور للمستخلصات النباتية(Sushila Devi et al., 2014).

القدرة على إزاحة جذرDPPHبمختلف التركيزات لمختلف مستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. تقارن بالمركب المعيار المضاد للأكسدةBHT، النتائج يعبرعنها بـIC_{50} (µg/ml) و هذه القيمة توافق تركيز المستخلص النباتي الذي يحقق 50% من النشاطية المضادة للأكسدة ،كما هو مبين في جدول(8) و شكل (52).

يتضح من نتائج اختبارDPPH المبينة في جدول(8) أن كل المستخلصات تمتلك نشاطية مضادة للأكسدة تختلف من مستخلص إلى آخر، حيث تراوحت قيم IC50 بين 145,14 و547,29 µg/ml ذات فرق معنوي($P < 0.05$) مقارنة مع IC_{50} الـBHT الذي قدر بـ 42,85 µg/ml، كما حقق المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي قدرة مزيحة للجذوربنسبة 89,98 ± 0,1 % (شكل 50) وبذلك فقد حقق أحسن نشاطية مزيحة للجذور بـ IC_{50} تعادل 55,04 µg/ml(شكل53) وبذلك فلم يكن لديه فرق معنوي ($p>0.05$) مقارنة مع BHTالذي كانت نسبة إزاحته لجذر DPPH تقدربـ 94,51 ± 2 % (شكل 52) وIC50 بـقيمة 42,85 µg/ml(شكل53)، المعادلة الخطية للمنحنى العياري للـ BHT $Y=1,671x-21,612$ ($R^2=0,9928$)

علما أن أقل قيمة من IC50 تدل على أعلى قدرة مضادة للأكسدة للمستخلص النباتي. حسب الدراسة التي قام بها Djeridane et al.(2006) على المستخلص الميثانولي لدرنات نبات.*Aristolochia longa* L أنه كان له قدرة مزيحة للجذور ضعيفة مقارنة مع نباتات أخرى مدروسة بـ IC50 يعادل 90µM/L وهذا يتوافق مع دراستنا أين نجد نشاطية ضعيفة بـ IC50 (514,58 µg/ml).

ترجع النشاطية المزيحة للجذور للمركبات الفينولية خاصة الأحماض الفينولية والفلافونويدات (djeridane et al.,2006)، وهذا يتناسب مع دراستنا حيث المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي الذي حقق أقل قيمة من IC_{50} يمتلك أكبرنسبة من الفلافونويدات، فلافون وفلافونول. تتطابق نتائج دراستنا مع الدراسات السابقة التي تشيرإلى أن ليس فقط الكمية الكلية للمركبات الفينولية بل نوعيةهذه المركبات وتوزيعها النسبي في النبات هي التي تتحكم في النشاطية البيولوجية (Bhatt et Negi., 2012).

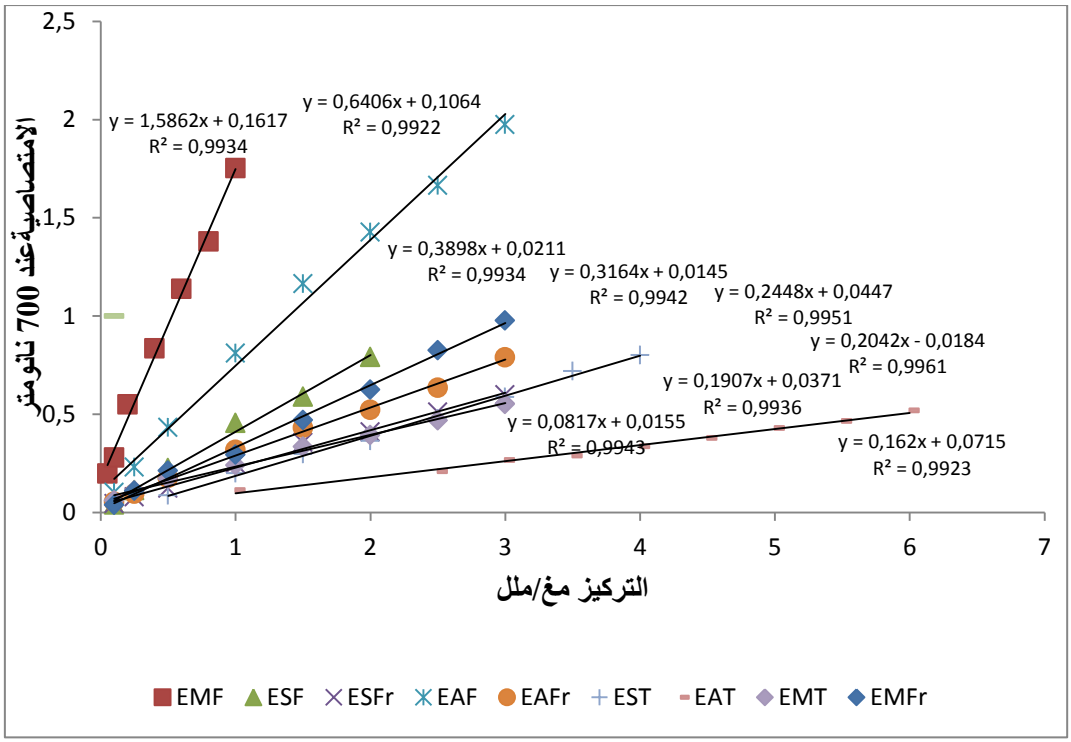
III-5-2-اختبار إرجاع الحديد(Reducing power)

القدرة على إرجاع المركبات دليل على النشاطية المضادة للأكسدة القوية (Sushila Devi et al., 2014) وتعتبرالآلية التي نقيس بها تحويل المركب Fe^{+3}/ferricyanide إلىFe^{+2} في وجود مرجع (مضاد للأكسدة) في العينة المختبرة، حيث ظهور اللون الأزرق المخضر دليل على تشكيلFe^{2+} ويتم قياسه في

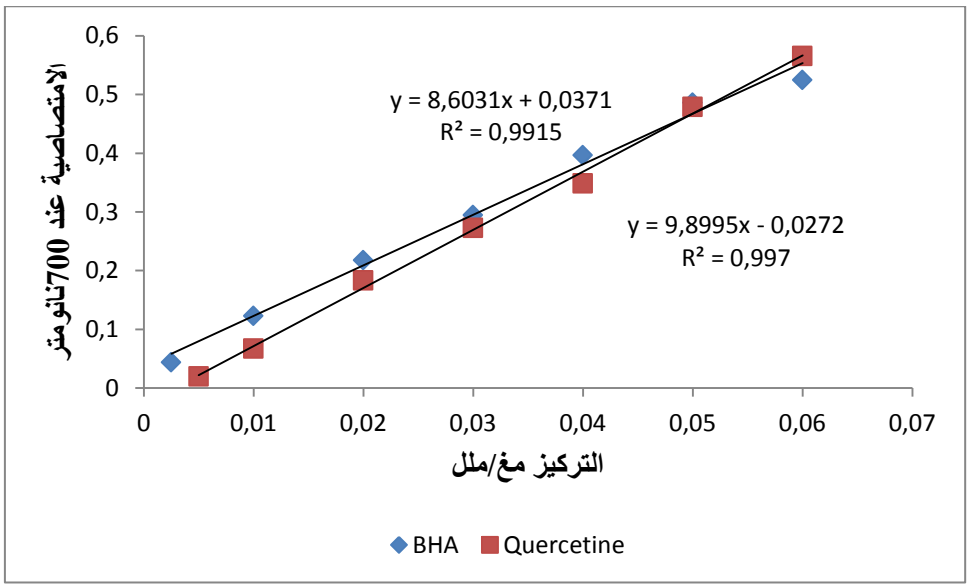
طول موجة 700 نانومتر، مع العلم أن أكبر امتصاصية عند طول موجة 700نانومتر مرتبطة بقوة الإرجاع. يستعمل هذا الإختباردائما لتقييم قابلية المضاد للأكسدة على إعطاء إلكترون (Benmanssour et al.,2013).

$Fe(TPTZ)_2(III) + ArOH \longrightarrow Fe(TPTZ)_2(II) + ArOH^+$ (Sharif Ali et al.,2008).

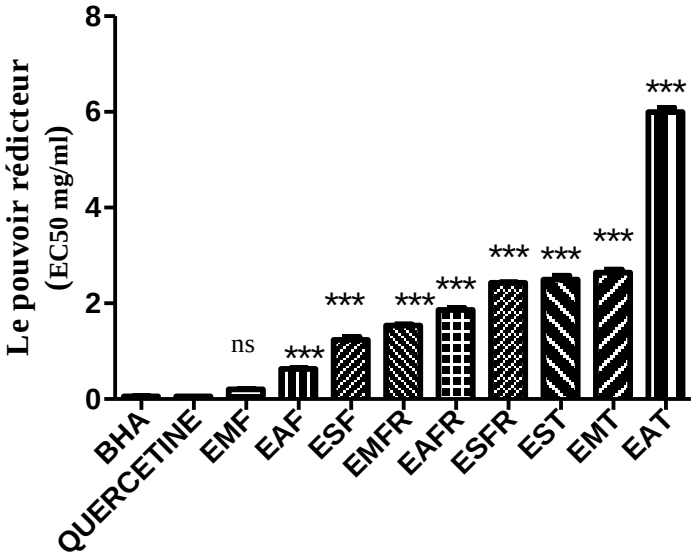
يوضح كل من الشكل(54) و الشكل(55) قدرة إرجاع مختلف مستخلصات نبات *Aristolochia longa* L.، وBHA والكرستين، كما تراوحت قيم EC_{50} بين 0,012±0,632 و0,075±5,999 مغ/ملل(جدول8) وكان الفرق معنوي مقارنة مع BHA والكرستين(شكل56)، أما المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي كانت لديه قوة إرجاع عالية أين كانت EC_{50} تساوي0,019±0,2مغ/ملل وكان الفرق غيرمعنوي مقارنة مع BHA والكرستين (EC_{50} يعادل 0,0009±0,053 و0,0001±0,053 مغ/ملل على الترتيب)، هذه النتائج ممثالة لنتائج النشاطية مزيحة للجذور.



شكل54. قدرة إرجاع مستخلصات *Aristolochia longa* L.



شكل.55.قدرة إرجاع الكرستين(Quercetine) وBHA

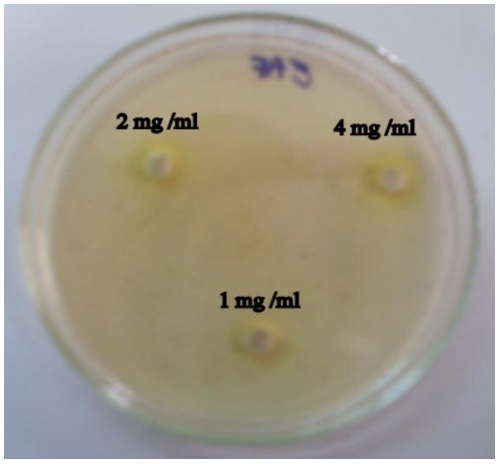


Les extraits et les temoins positifs

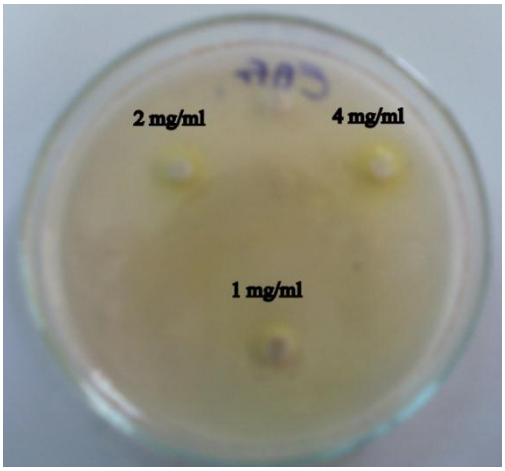
شكل56. القوة الإرجاعية للمستخلصات المائية، الميثانولية و الأسيتونية لنبات الـ*Aristolochia longa* ولكل من BHA وQuercetine عند طول موجة 700 نانومتر. القيم هي معدل لثلاث تكرارات± SD. المقارنة تمت مع BHAوالكرستين،P<0,001 : *** ، ns :فرق غير معنوي.

III-3-5-تقديرالنشاط المضاد للأكسدة نوعيا: إبيضاض الـ β- carotène

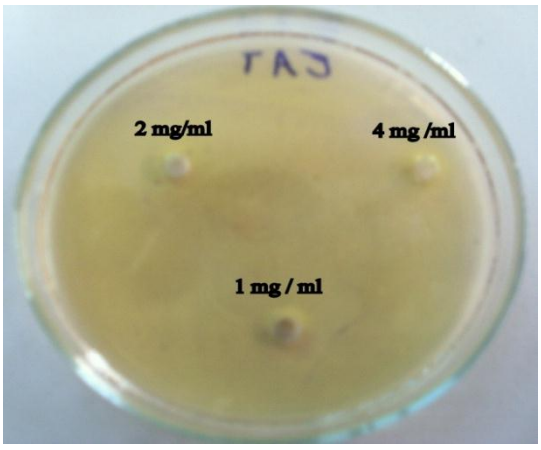
سمح تقديرالنشاط المضاد للأكسدة نوعيا لإبيضاض β- كاروتين (β- carotène) الذي تم على مستوى أطباق بتري الحصول على هالات ذات لون برتقالي حول الآبار الموجودة على مستوى الجيلوز والتي تحتوي على تراكيز مختلفة من مختلف مستخلصات النبات *Aristolochia longa*L(1،2 و 4 مغ/ملل) وتم وضع 30µl من كل تركيز (شكل57) وأيضا من الشواهد الموجبة من الكرستين و BHA بتركيز 2مغ/ملل.



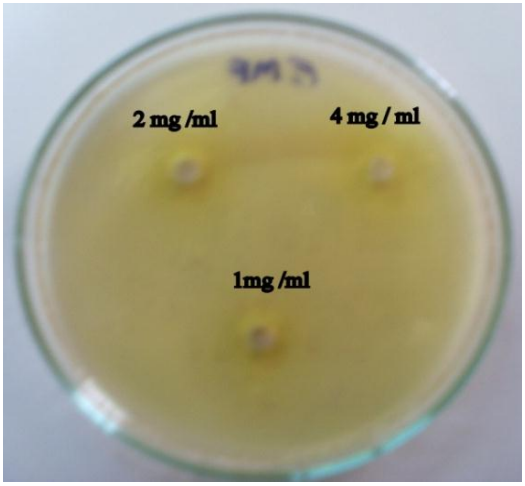
المستخلص المائي للجزء الهوائي(EAF)



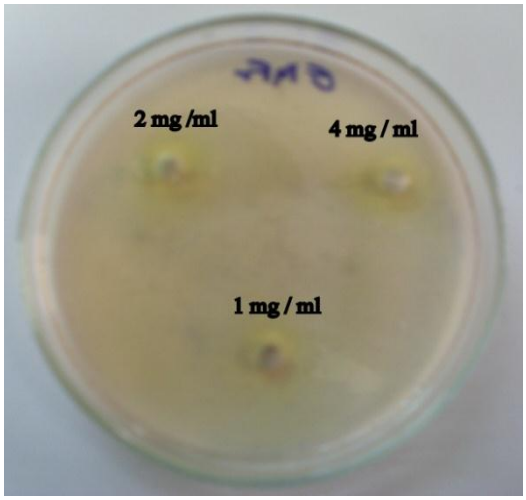
المستخلص المائي للثمار(EAFr)



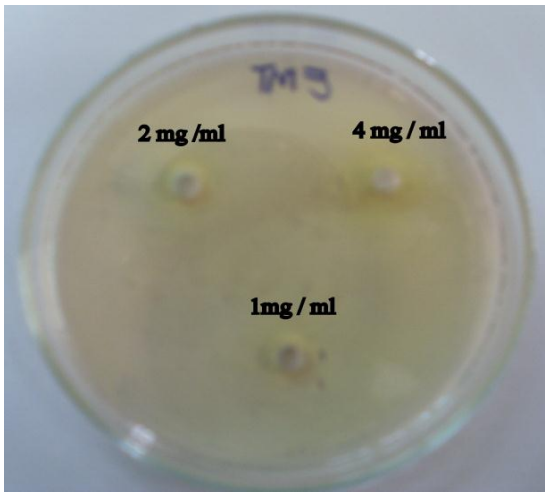
المستخلص المائي للدرنات(EAT)



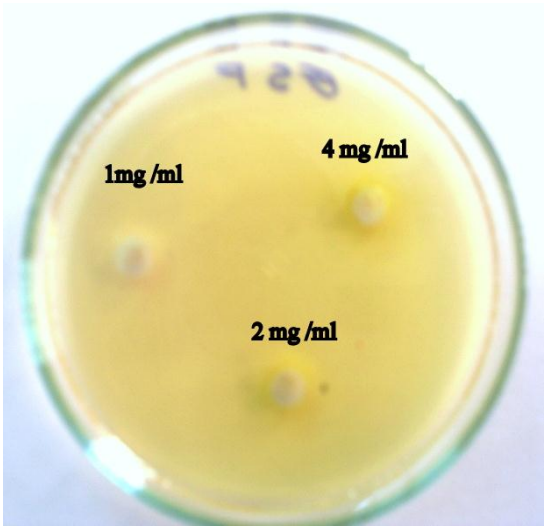
المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي(EMF)



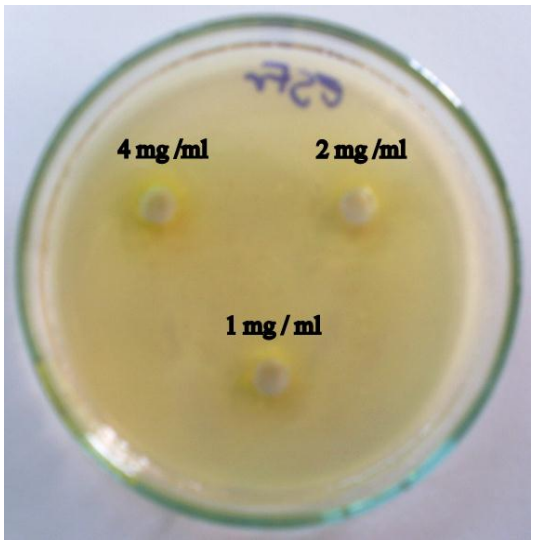
المستخلص الميثانولي للثمار (EMFr)



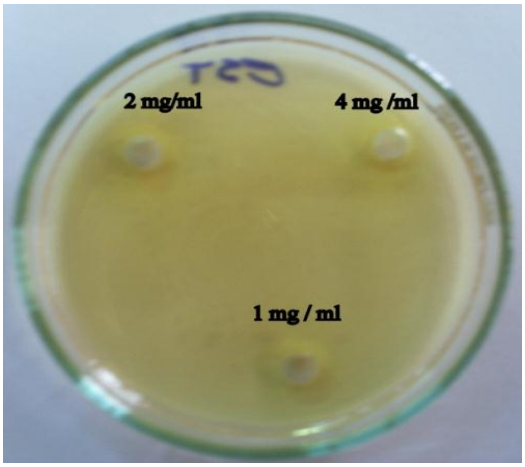
المستخلص الميثانولي للدرنات(EMT)



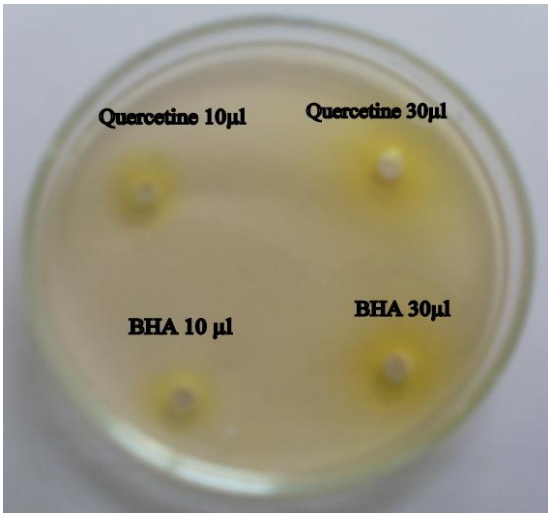
المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي(ESF)



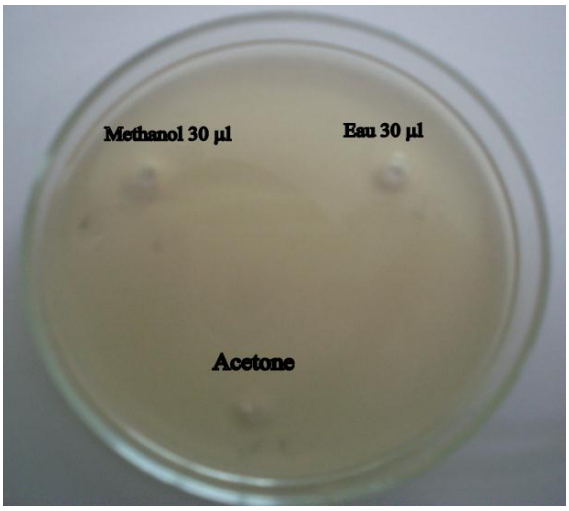
المستخلص الأسيتوني للثمار (ESFr)



المستخلص الأسيتوني للدرنات (EST)



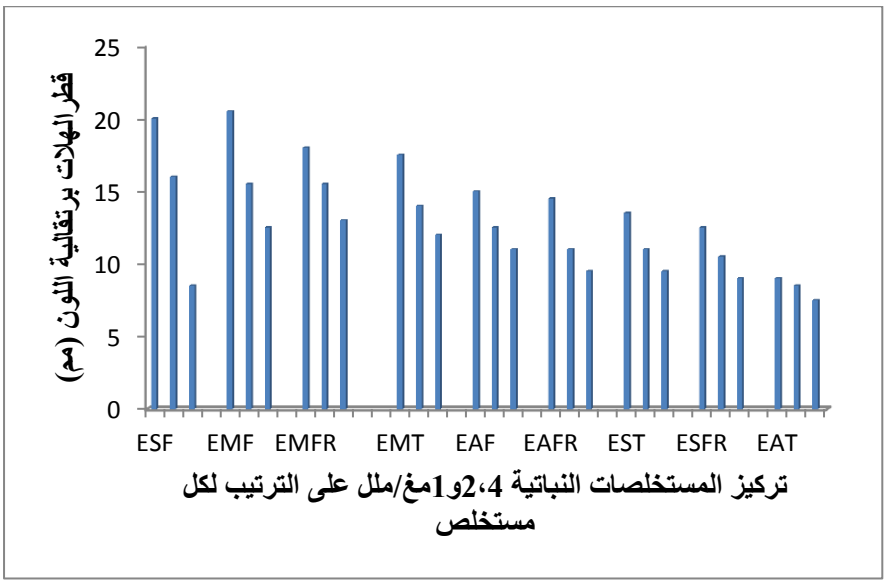
الشواهد الموجبةالكرستين و BHA



الشواهد السالبة الماء،الميثانول والأسيتون

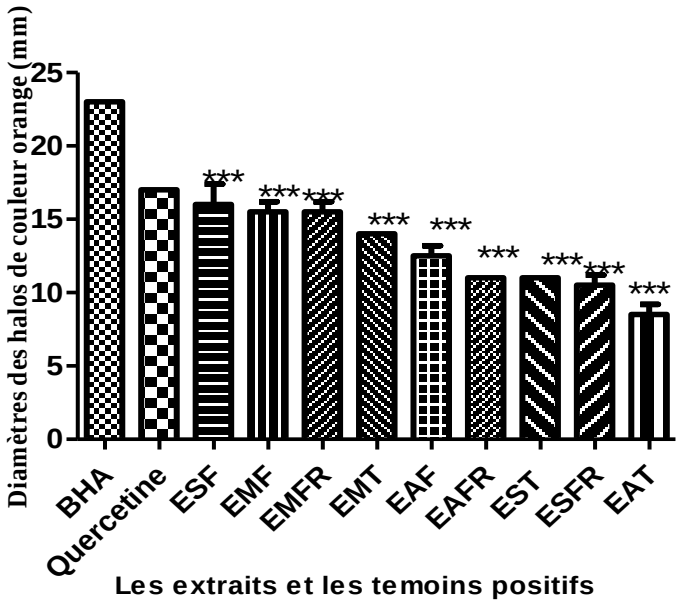
شكل57.نتائج الاختبار النوعي للـ β- carotène للمستخلصات المائية،الميثانولية والأسيتونية على الترتيب والشواهد الموجبة (الكرستين وBHA) والشواهد السالبة الماء،الميثانول والأسيتون.

من خلال النتائج المبينة في شكل (58) نلاحظ أن هناك تناسب طردي بين تركيز المستخلص و قطر الهالات برتقالية اللون، حيث كلما زاد تركيز المستخلص زاد قطر الهالة البرتقالية، كما أن هناك إختلاف حسب نوع المستخلص.



شكل58. مقارنة أقطار الهالات برتقالية اللون حسب تراكيز مختلفة1، 2 و4مغ\ملل للمستخلصات

أعطت المستخلصات المائية أصغر قطرحيث عند تركيز4مغ/ملل كان القطر في المستخلص المائي للأوراق (EAF)يعادل15ملم، وبالنسبة للمستخلص المائي للثماروالدرنات كان القطر على الترتيب 14,5 و9 ملم وبذلك تكون لديه أضعف نشاطية مضادة للأكسدة، أما بالنسبة للمستخلصات الميثانولية كان قطر الهالة عند تركيز 4 مغ/ملل في مستخلص الجزء الهوائي (EMF) 20,5 ملم، بالنسبة للمستخلص الميثانولي للثماروالدرنات يكون القطر 18ملم و17,5ملم على الترتيب، وهذا دليل على قوة الشاطية التأكسدية وهذه النتائج مشابهة لنتائج المستخلص الأسيتوني حيث كان قطر الهالات البرتقالية في تركيز 4مغ/ملل 20ملم بالنسبة للجزء الهوائي، أما بالنسبة لمستخلص الثمارو الدرنات 12,5 ملم و13,5ملم على الترتيب. بالمقابل كانت الأقطار المتحصل عليها مع كل من BHA والكرستين هي 23مم و17مم على الترتيب في تركيز 2مغ/ملل. بينت الدراسة الإحصائية لقطر الهالات برتقالية اللون لكل من المستخلصات و الشواهد الموجبة BHAوكرستين الشكل(59) الموالي :



شكل 59. مقارنة قطر الهالات برتقالية اللون بتركيز 2 مغ/ملل لكل من المستخلصات و الشواهد الموجبة BHA و Quercètine كل قيمة هي معدل لثلاث اختبارات ±SD، المقارنة تمت مع BHA، P<0,001 : ***

وافقت دراستنا دراسة Belhattab (2007) حيث وجد المستخلصات المائية لـ *O. glandulosum* و *M .vulgare* كانت لها أقطارللهالات البرتقالية أقل من أقطار المستخلصات الأسيتونية. كذلكSharififar et al. (2009) وجد عند دراسة النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصات الميثانولية لنبات *Teucrium polium* أقطار الهالات برتقالية اللون تقدربـ 26مم. وهذه النتائج تكون قريبة من نتائج المستخلص الميثانولي والأسيتوني للجزء الهوائي.

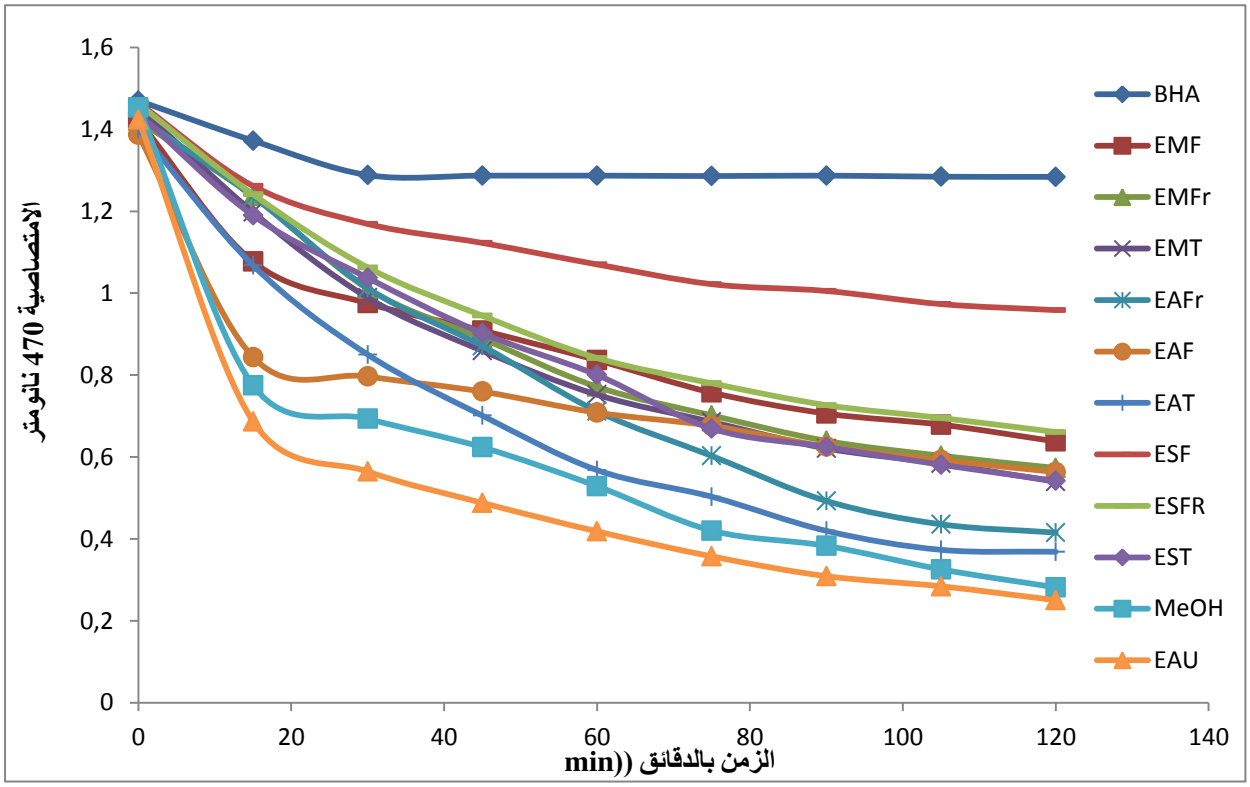
تبين هذه النتائج أن مستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. لديها نشاطية مضادة للأكسدة أحسنها المستخلص الميثانولي والأسيتوني للجزء الهوائي، كما نلاحظ أنه عدا المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي فإن المستخلص الميثانولي لمختلف أجزاء النبات أحسن المستخلصات قدرة على تثبيط الأكسدة(شكل59) وهذا قد يرجع إلى المركبات الفينولية وخاصة الفلافونوويدات التي تثبت جذر البيروكسيد بواسطة ذرة هيدروجين (Al-Farsi et al., 2005).

III-5-4- اختبار كمي للـ β- carotène

تعتمد هذه النشاطية المضادة للأكسدة على مهاجمة الجذر الحرلحمض اللينولييك جزيئات الـ β- carotène غير المشبعة. إن وجود مضادات للأكسدة مختلفة تستطيع أن تمنع ابيضاض مركب β- carotène بواسطة تعديل الجذور الحرة الناتجة من حمض اللينولييك(linoleate) و جذور حرة أخرى ناتجة خلال هذه العملية(Duan et al.,2006). إن اختبارالأكسدة الذي يعتمد على ابيضاض الـ β- carotène يستعمل بصفة واسعة لقياس النشاطية المضادة للمركبات الفعالة لأن مركب الـβ- carotène حساس جدا للجذرالحر

الناتج من أكسدة حمض لينولييك. كذلك مركب الـ β- carotène الذي يستعمل كملون غذائي في المشروبات، فإن ابيضاضه ينقص بصفة ملحوظة نوعية هذه المنتوجات.

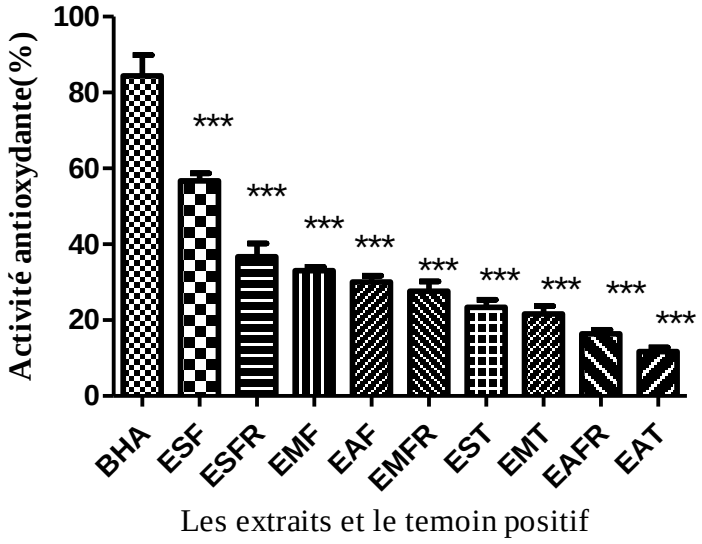
في هذا الاختباريتعرض مركبβ- carotène لفقدان سريع للون في غياب مضاد الأكسدة، مما ينتج عنه تناقص في امتصاصية المستخلص المختبرأثناء وقت التفاعل. وجود مضاد للأكسدة يمنع ابيضاض الـ β- carotène بتعديل الجذر الحر لحمض لينولييك الناتج (Bougatef et al., 2009). وهذا ما ظهر في شكل(60). كما تصنف القدرة المضادة للأكسدة بالعالية أوالقوية إذ كانت النسبة أكبر70%، متوسطة إذا تراوحت النسبة بين (40 – 70%) وبضعيفة إذا كانت النسبة أقل من 40%.



شكل60. إختبارإبيضاض β-carotene/حمض اللينولييك في وجود مستخلصات نبات *A.longa* L. و الشاهد الموجب (BHA) والسالب (الماء ،الميثانول) عند طول موجة 470 نانومتر كل قيمة هي معدل لثلاث اختبارات ±SD.

تبين النتائج الموضحة في جدول(8)، أن كل مستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. المدروسة بنفس التركيز 2مغ/ملل تثبط أكسدة الـ β- Carotène بدرجات مختلفة (شكل61)، أين حقق المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي (ESF) أكبر نسبة تثبيط لابيضاض مركبβ- Carotène 57% مقارنة مع باقي المستخلصات، أما الـBHA فقد قدرت نشاطيته المضادة للأكسدة بـ 84%.

إن التغيرفي النشاطية المضادة للأكسدة يمكن أن يرجع إلى كمية المركبات الفينولية الموجودة في كل مستخلص، كما يمكن أن يرتبط أيضا بنوعية عديدات الفينول، الفلافونويدات وموادالدباغة. إن استعمال مذيبات ذات قطبية مختلفة يسمح باستخلاص مواد مضادة للأكسدة بنوعية جيدة (Zhou et Yu, 2004).



الشكل61. نسب النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبات.L *A.longa* و الشاهد الموجب (BHA) والسالب (الماء ،الميثانول) بعد مرور 2 ساعة من بدأ إختبار β-carotene/حمض اللينولييك. كل قيمة هي معدل لثلاث اختبارات ±SD، المقارنة تمت مع BHA ***: P<0,001

III-6 النشاطية المضادة للإلتهاب في المخبر Activité antiinflammatoire invitro

III-6-1 طريقة تثبيط تخريب البروتينات

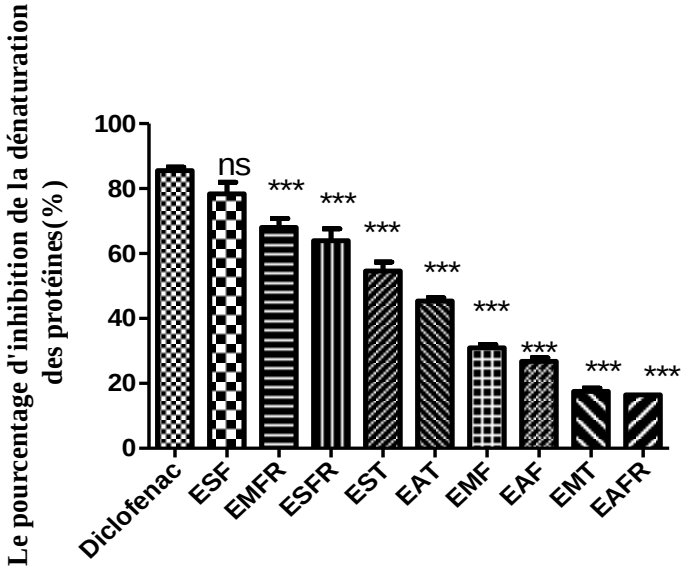
تفاوتت نسبة تثبيط تخريب البروتينات بين مختلف أنواع مستخلصات نبات .L *A.longa* عند تركيز500µg/ml (جدول9)، حيث نلاحظ أن المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي أظهر أعلى نسبة تثبيط لتخريب البروتينات (78,35±6,18)% وكان لديه فرق غير معنوي (p>0.05) مقارنة مع الدواء المضاد للإلتهاب ديكلوفيناك الصوديوم (Diclofenac sodium) وهذا الأخير يشهد أقصى قيمة لتثبيط تخريب البروتينات (85,56±1,7) % في نفس التركيز، يليه المستخلص الميثانولي للثمار بـ (68,04 ±4,72) %(شكل62)، و قد وافقت هذة الدراسة النتائج الي تحصل عليها Murugan et Parimelazhagan (2014) أين استطاع المستخلص الميثانولي لنبات *Osbeckia parvifolia* المحضرباستعمال جهاز السوكسلي (Soxhlet) أن يحمي البروتينات الغشائية من التخريب بفعل الحرارة والقلويات مقارنة مع الديكلوفيناك، للتذكيرأن المستخلصات الأسيتونية في دراستنا محضرة بجهاز(Soxhlet).

جدول9. النشاطية المضادة للإلتهاب لمستخلصات نبات *Aristolochia longa* L.

المستخلص (μg/ml)	المـــــــائي			الميثانـــــــــــولي			الأسيـــــــــــتوني			ديكلوفيناك الصوديوم (μg/ml)
	هوائي EAF	ثمار EAFr	درنات EAT	هوائي EMF	ثمار EMFr	درنات EMT	هوائي ESF	ثمار ESFr	درنات EST	
نسبة تثبيط تخريب البروتينات %	***26,80 ± 1,78	***16,49 ± 0	***45,36 ± 1,78	***30,92 ± 1,78	***68,04 ± 4,72	***17,52 ± 1,78	ns78,35 ± 6,18	***63,91 ± 6,43	***54,63 ± 4,72	85,56 ± 1,78

القيم هي تكرارلثلاث إختبارات(±SD) .تمت المقارنة مع ديكلوفيناك الصوديوم (Diclofenac Sodium)

*** *p*<0.001، ns : فرق غير معنوي



شكل62. النشاطية المضادة للإلتهاب لمستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. في المخبر،المقارنة تمت باستعمال ديكلوفيناك الصوديوم ، *** *p*<0.001، ns : فرق غير معنوي

يعتبرتخريب البروتينات سبب من أسباب الإلتهاب (Kar et al.,2012)، كما أشار كل من Murugan et Parimelazhagan(2014) أن إنتاج المستضدات الذاتية في بعض أمراض إلتهاب المفاصل قد يرجع إلى تخريب البروتينات. ربما تتضمن آلية تخريب البروتين تغيير الهيدروجين الالكتروستاتيكي، و تغيير الروابط الكارهة للماء وثنائية الكبريت(Williams et al., 2008).

النباتات الطبية المستعملة في الطب الشعبي لعلاج حالات الإلتهاب تبدو بديل منطقي وقابل للتطبيق في البحث عن عوامل مضادة للالتهاب آمنة وفعالة(Alhakmani et al.,2013).

كما أشار Sosa et al. (2002) إلى أن النباتات التابعة لجنس *Aristolohia* تحتوي على حمض أرستولوشيك، وهذا المركب لديه خصائص محفزة للمناعة و مضادة للإلتهاب، كما أثبت في دراسته السريرية على الفئران أن مستخلصات أوراق وقلف نبات*Aristolochia* trilobata المتحصل عليها باستعمال الميثانول، الهكسان والكلوروفورم لديها نشاطية جيدة مضادة لإلتهاب الأذن خاصة مستخلصات الكلوروفورم لأوراق هذا النبات، كما ذكر أن المستخلصات المحبة للدهون يمكن اعتبارها مصدر مهم لعوامل فعالة مضادة للإلتهاب.

III-7 النشاطية ضد ميكروبية لمستخلصات *Aristolochia longa* L.

III-7 -1 النشاطية ضد بكتيرية لمستخلصات *Aristolochia longa* L.

III-7 -1 -1- تقنية اللمس المباشر Technique par contact direct

بينت نتائج النشاطية ضد بكتيرية للمستخلصات النباتية المنجزة بطريقة الانتشارفي وسط صلب بطريقة الأقراص (méthodes des disques) جدول(10) إختلاف تأثير المستخلصات حسب المذيب المستعمل، الجزء النباتي و أيضا حسب التركيز، حيث كان التأثير الضد بكتيري للمستخلصات المعبر عنه بقطر التثبيط بالمم يتناسب عكسيا مع التخفيف، أي أن التأثير يزداد كلما زاد تركيز المستخلص(النتائج المبينة في الجدول هي معدل لثلاث إختبارات).

حسب Ponce et al. (2003) تصنف حساسية الكائن الدقيق حسب قطر التثبيط: كائن دقيق معدوم الحساسية عند قطر أقل من 8 مم، حساس إذا تراوح القطر بين 9 – 14 مم، حساس جدا إذا كان القطربين 15 - 19 مم، أما اذاكان القطر أكبر من 20مم فان الحساسية شديدة.

جدول 10. النشاطية ضد بكتيرية لمستخلصات *Aristolochia longa* L.

قطرمنطقة التثبيط (مم)																	
***Bacillus cereus* ATTC10876**				***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**				***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**				***Escherichia coli ATCC25922***					
تركيز المستخلص مغ/ملل																المستخلص	الجزء النباتي
25	50	100	200	25	50	100	200	25	50	100	200	25	50	100	200		
	-	-	7		15	1±18	1±22		-	0.5±8	±11,6 0.57		-	-	-	المستخلص المائي	الجزء EAF الهوائي
	-	-	8		8	1±14	±16,3 0.57		-	-	-		-	-	-		الثمار EAFR
	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		الدرنات EAT
	-	8		-	-	8		-	-	-		-	-	-		المستخلص الميثانولي	الجزء الهوائي EMF
13	14	15		12	17	±18,5 0.7		13	15	20		-	-	-			الثمار EMFR
07	09	±12,5 0.7		-	-	-		-	-	-		-	-	-			الدرنات EMT
12	15	±17,5 0.7		9	11	14		13	17	19		-	-	-		المستخلص الأسيتوني	الجزء الهوائي ESF
12	14.5 0.7±	17		9	11	15		9	11	17		-	-	-			الثمار ESFR
-	7	9		-	-	-		-	-	-		-	-	-			الدرنات EST
24				30				25				35					Gentamicin
تأثير مثبط (S)																	نوع التثبيط البكتيري
+				+								+					DMSO

القيم هي تكرارلثلاث إختبارات(±SD)

S : تأثير مثبط (effet bactériostatique)

+ : نمو

- :عدم وجود تثبيط

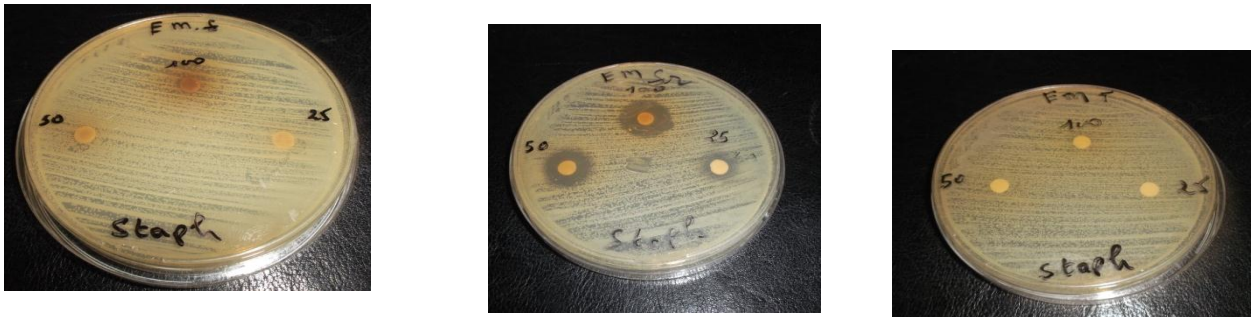
نلاحظ من الجدول بالنسبة للمستخلص الميثانولي أنه اختلف تأثيره على البكتيريا حسب الجزء النباتي حيث أعطى المستخلص الخاص بالثمار(EMFr)نشاطية قوية مثبطة لبكتيرياالـ *Pseudomonas aeruginosa* حيث قدر قطر المناطق المثبطة في التركيز 100مغ/ملل بـ 20مم و هي بذلك حساسية شديدة، أما بالنسبة لبكتيريا *Staphylococcus aureus* و بكتيريا *Bacillus cereus* فحدد قطر التثبيط بـ 18.5 و15مم على الترتيب وهي بذلك جد حساسة، أما بالنسبة لبكتيريا *Escherichia coli* فكانت مقاومة لهذا المستخلص، الجزء الهوائي(EMF) لم يكن فعالاعلى كل أنواع البكتيريا المختبرة، أما في مستخلص الدرنات(EMT) فقد كانت بكتيريا *Bacillus cereus*حساسة وقد قدر قطرالتثبيط بـ 12.5مم عند تركيز 100مغ/ملل ومعدومة الحساسية بالنسبة لباقي أنواع البكتيريا، أما بالنسبة للمستخلص الأسيتوني فكان

تأثيرالجزء الهوائي(ESF) والثمار(ESFr) تقريبا متساوي حيث كان قطر التثبيط بالنسبة لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* 19مم و17مم على التوالي و هي بذلك حساسة جدا، كذلك بالنسبة لبكتيريا *Staphylococcus aureus*كان قطرالتثبيط يقدربـ 14 و 15مم على الترتيب وبالنسبة *Bacillus cereus*فكان قطر التثبيط 17.5و17مم وهي بذلك حساسةجدا أيضا، أما *Escherichia coli* فكانت مقاومة لهذين المستخلصين، أما المستخلص الأسيتوني للدرنات(EST) فكان غير فعال على كل أنواع البكتيريا، حيث أظهر فقط نشاطية محدودة بقطر 9مم عند تركيز 100مغ/ملل في بكتيريا*Bacillus cereus*. في الأخيربالنسبة للمستخلص المائي فقد إرتأينا أن نرفع من قيمة التركيز حتى 200مغ/ملل، لأن التركيز100مغ/ملل لم يعطينا نتائج ملموسة، وقد كان تأثير المستخلص المائي للجزء الهوائي (EAF) على بكتيريا *Staphylococcus aureus* كبير، حيث كانت حساسية هذه البكتيريا شديدة و قدر قطر التثبيط عند تركيز 200مغ/ملل بـ 22مم، بالنسبة للـ *Pseudomonas aeruginosa* فكانت حساسة و قدر قطر التثبيط بـ 11.6 مم، أما التأثيرعلى *B.cereus* فكان معدوما حيث قدر قطر التثبيط بـ 7مم، في حين كانت البكتيريا*Staphylococcus aureus* حساسة جدا للمستخلص المائي للثمار(EAFr) وكان قطر التثبيط 16.3مم، ونشاطية معدومة*B.cereus* بقطر8مم، و كانت كل من البكتيريتين *Pseudomonas aeruginosa*و*Escherichia coli* مقاومة لهذا المستخلص، وفي الأخير المستخلص المائي للدرنات (EAT) لم يؤثر على أنواع البكتيريا الأربعة.

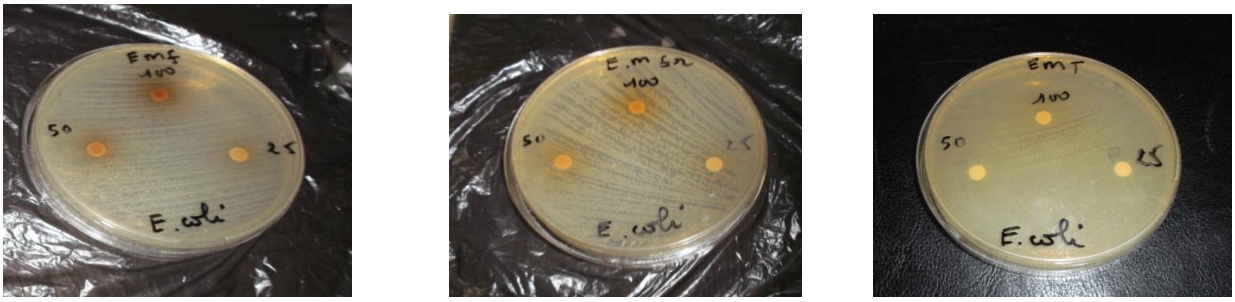
كمقارنة بين تأثير مختلف المستخلصات نلاحظ أن كل المستخلصات لم تكن فعالة ضد بكتيريا*Escherichia coli*، أي هذه الأخيرة كانت مقاومة وغيرحساسة، و فيما يخص مستخلص الدرنات سواء كان مائي أو ميثانولي أو الأسيتوني لم يكن له تأثير على البكتيريا المختبرة، أما بالنسبة لمستخلصات النبات الميثانولية فكانت الثمارهي الجزء الأكثر تأثير من الجزء الهوائي و الدرنات (جدول10)، وهي تتقارب في التأثير مع كل من المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي و الثمار، أما المستخلص المائي للجزء الهوائي فقد أثر على *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas aeruginosa* و اقتصر تأثير مستخلص الثمار على *Staphylococcus aureus* فقط. كما تبين النتائج الموضحة في جدول (10) أن الجزء الهوائي للمستخلص الميثانولي كان غيرفعال مقارنة مع كل من المستخلص المائي و المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي.

طبيعة تأثير المستخلصات على أنواع البكتيريا المختبرة كان تأثيرا مثبطا. أما بالنسبة للمضاد الحيوي Gentamycine فلديه نسبة تثبيط عالية على كل السلالات البكتيرية المختبرة (جدول 10)(شكل 66) مقارنة مع المستخلصات النباتية. أما بالنسبة للـمذيب المستعمل DMSO فلم يكن له أي تأثير على نمو البكتيريا المختبرة(شكل 67). الشكل(63، 64 و65) يوضح مناطق التثبيط للبكتيريا بتأثيرمختلف المستخلصات.

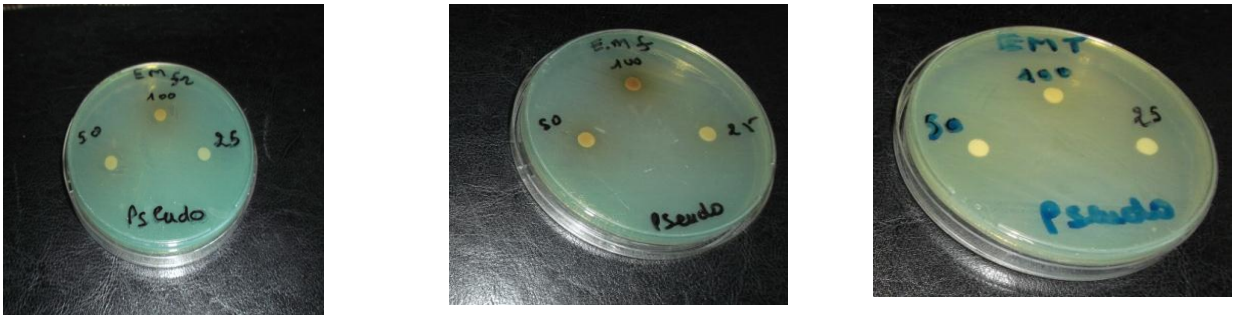
تأثير المستخلصات الميثانولية EMT،EMFrوEMF على *Bacillus cereus*



تأثير المستخلصات الميثانولية EMT،EMFrوEMF على *Staphylococcus aureus*



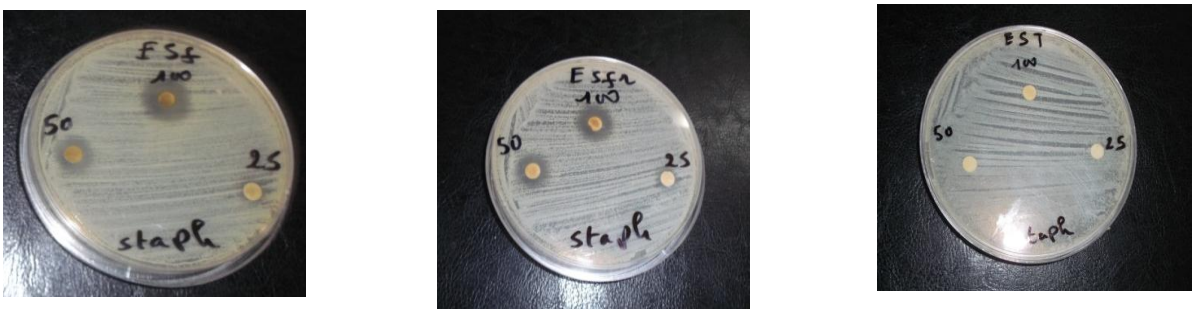
تأثير المستخلصات الميثانولية EMT،EMFrوEMF على *E.coli*



تأثير المستخلصات الميثانولية EMT،EMFrوEMF على *pseudomonas aeruginosa*

شكل 63. النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات الميثانولية

تأثير المستخلصات الأسيتونية EST،ESFrوESF على *Bacillus cereus*



تأثير المستخلصات الأسيتونيةEST،ESFrوESF على *Staphylococcus aureus*

تأثير المستخلصات الأسيتونية EST،ESFrوESF على *E.coli*

تأثير المستخلصات الأسيتونيةEST،ESFrوESF على*pseudomonas aeruginosa*

شكل64. النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات الأسيتونية

تأثير المستخلصات المائية EAT،EAFr وEAF على *Bacillus cereus*

تأثير المستخلصات المائيةEAT،EAFr وEAF على *Staphylococcus aureus*

تأثير المستخلصات المائية EAT،EAFr وEAF على *E.coli*

تأثير المستخلصات المائيةEAT،EAFr وEAF على *pseudomonas aeruginosa*

شكل 65.النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات المائية

شكل66.تأثير الشاهد الموجب Gentamycine على كل من*Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* ، *E.coli* و *pseudomonas aeruginosa* على الترتيب

شكل67. تأثير الشاهد السالب DMSO على كل من*Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* ، *E.coli* و *pseudomonas aeruginosa* على الترتيب

III-7-1-2 طريقة المزج في وسط سائل

يحددالتركيز الأدنى المثبط (CMI) لمستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. التي شهدت أحسن نشاطية مضادة للبكتيريا بالنسبة للسلالات المختبرة بإستثناء بكتيريا *E. coli* ATCC 25922 التي كانت مقاومة لكل المستخلصات .

النتائج المتحصل عليها في طريقة المزج في وسط سائل من أجل تحديد قيم التراكيز الدنيا المثبطة (CMI) لمستخلصات النبات المائية، الميثانولية والأسيتونية موضحة في الجدول (11)، حيث أظهر المستخلص الميثانولي أضعف تركيزمثبط للبكتيريا المختبرة حيث تراوح CMI بين 3,125 مغ/ملل بالنسبة لبكتيريا *P. aeruginosa* و*S.aureus* و 6,25 مغ/ملل بالنسبة لبكتيريا*Bacillus cereus* ليليه المستخلص الأسيتوني بتركيزأدنى مثبط لجميع الأنواع البكتيرية قدربـ 12,5 مغ/ملل في حين أبدى المستخلص المائي تراكيزدنيا مثبطة أعلى مقارنة ببقية المستخلصات حيث قدرتCMI للمستخلص المائي للجزء الهوائي(EAF) بـ 50 مغ/ملل و12,5 مغ/ملل لكل من بكتيريا *P. aeruginosa* و*S. aureus* على الترتيب، أما CMI المستخلص المائي للثمار(EAFr) فقدر بـ50 مغ/ملل بالنسبة لـ*S. aureus* . كان التأثير تثبيطي فقط على البكتيريا

المختبرة وقد دام التأثير على بكتيريا مدة 7 أيام. كما أشار Coulidiati et al. (2009) أن أقوى نشاطية مضادة للبكتيريا تمثل بـ أدنى تركيز مثبط للبكتيريا (CMI).

جدول 11 . التراكيز الدنيا المثبطة لـمستخلصات نبات *Aristolochia longa* L.

Bacillus cereus ATTC10876	**Staphylococcus aureus ATCC 25923**	**Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853**		
التركـــــــــــــــيزالأدنى المثبط (CMI) مغ/ ملل			**المستخلص**	**الجزء النباتي**
-	12.5	50	**المستخلص مائي**	**الجزء الهوائيEAF**
-	50	-		**الثمار EAFr**
6,25	3,125	3,125	**المستخلص الميثانولي**	**الثمار EMFr**
12.5	12,5	12,5	**المستخلص الأسبتوني**	**الجزء الهوائيESF**
12,5	12.5	12.5		**الثمارESFr**
تأثير مثبط (S)			**نوع التثبيط البكتيري**	

تمت مقارنة دراستنا مع دراسة Camporese et al. سنة 2003 على قلف(écorce) نبات *Aristolochia trilobata* وقد أثر المستخلص الميثانولي بقيمة 2.5مغ/ملل وهي مقاربة لما تحصلنا عليه. أما Gadhie et al. (1999) فلم يتحصل على أي تثبيط لبكتيريا

*Pseudomonas aeruginosa*و *Staphylococcus aureus* وكذلك*Bacillus subtilis* مع نبات *Aristolochia paucinervis pomel* بالنسبة للمستخلص الميثانولي و المائي للدرنات و الأوراق بتركيز 1مغ/ملل، وهذا التركيزكان غير كاف لتثبيط هذه البكتيريا.

نستطيع أن نفسر نتائج النشاطية ضد بكتيرية لكل هذه المستخلصات، أن هذه النشاطية تعتمد إلى حد كبيرعلى تركيز المستخلصات، السلالات البكتيرية ونوع المستخلصات النباتية.

كل المستخلصات لها القدرة على تثبيط نمو واحدة أو أكثر من السلالات البكتيرية المختبرة بنسبة معينة. في دراستنا حقق المستخلص الميثانولي للثمار أكبر نشاطية ضد *P. aeruginosa* و*S. aureus* بـ CMI يقدر بـ 3,125 مغ/ملل وقدر هذا الأخير في بكتيريا *Bacillus cereus* بـ 6.25مغ/ملل. إضافة إلى ذلك فإن *P. aeruginosa* تعرف بأنها ممرضة وخطيرة بسبب مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية وقدرتها على الحصول على المزيد من المقاومة ضد العوامل المضادة للجراثيم التي أدخلت حديثا، وتعتبر هذه البكتيريا المسؤولة عن عدوى المستشفيات(Sahu et al.,2012)،وبالنسبة لـنتائج *S. aureus* فتعتبرمهمة لأن هذا الكائن الدقيق يسبب عادة التهابات الجلد(Camporese et al.,2003)، في حين*Bacillus cereus* و *Bacillus*

subtilis تعرف على أنها عوامل مسببة للإلتهاب في العديد من الأمراض كما تكون مسؤولة عن التسمم الغذائي(Kumar et al.,2006).

أظهرت دراسات سابقة لـ .Campores et al (2003) نشاط مضاد للبكتيريا مثير للإهتمام لمستخلصات نبات *Aristolochia trilobata* ضد بعض بكتيريا الموجبة والسالبة الغرام، وقد أثر المستخلص الميثانولي لقلف هذا النبات بقيمة CMI 2,5 مغ/ملل وهي مقاربة لما تحصلنا عليه. كما ذكر. Gadhi and al (1999) في دراسته أن النبات (*Aristolochia paucinervis* pommel(syn. *A. longa* L. ssp paucinervis بمثابة عقار جيد مضاد للميكروبات، وقد وافقه في ذلك .Angalaparameswari et al(2011)حيث وجد أن مستخلصات الميثانول و أسيتات الإثيل لنبات *Aristolochia bracteata*تعتبر عامل جيد مضاد للبكتيريا.

من جهة أخرى، أفادت الدراسات أن النباتات التابعة لجنس *Aristolochia* تحتوي على حمض الأرستولوشيك(acide aristolochique) (Chen et Zhu, 1987; Hashimoto et al., 1999)، وقد أثبت .Cherif et al (2009) أن نبات .*Aristolochia longa* L يحتوي على حمض الأرستولوشيك. يمتلك هذا المركب خصائص محفزة للمناعة ومضادة للإلتهاب (Sosa et al.,2002).

وقد ذكر,.Hinou et al (1990) أن هذا المركب المعزول من نبات *Aristolochia longa* يكون نشط ضد مختلف أنواع البكتيريا الهوائية. نفس المركب المعزول من مستخلصات الميثانول و أسيتات الإيثيل لـ *Aristolochia bracteata*أظهر نشاطية جيدة مضادة للبكتيريا الموجبة والسالبة الغرام (Angalaparameswari et al.,2011).

يوجد حمض الأرستولوشيك في المستخلصات الميثانولية ومن المحتمل أيضا في التحضيرات المائية للجزء الهوائي لأنواع النباتات التابعة لجنس *Aristolochia* المستعملة في الطب الشعبي (Balick and Arvigo,1998). من هذه الدراسات السابقة يمكن أن يكون هذا المركب مسؤول عن نتائج النشاطية المضادة للبكتيريا التي تحصلنا عليها.

من جهة أخرى، نلاحظ أن النشاطية المضادة للبكتيريا تعتمد إلى حد كبير على تركيز المستخلصات، السلالات البكتيرية، نوع المستخلص النباتي و نوع المذيب المستعمل.

وقد يرجع الإختلاف الملاحظ بين هذه المستخلصات إلى وجود المركبات البيولوجية النشطة مثل الفلافونوييدات، القلويدات، الصابونين و مواد الدباغة وتركيزها أيضا. وحسب ما ذكره Levy (1994) أن هذه المركبات تعتبر العامل المضاد للميكروبات الأكثر أهمية.

لاحظنا أن المستخلصات النباتية باستعمال المذيب الأسيتون لديهم طيف واسع للنشاطية (مستخلصات الجزء الهوائي ومستخلص الثمار)، مقارنة مع المستخلصات الميثانولية (إلا مستخلص الثمار) جدول(10)، هذه النتائج يمكن أن ترجع إلى نمط المركبات الفينولية وتوزيعها النسبي وليس لكميتها ووفقا لـ .Taguri et al(2004) فإن بنية الفينولات تؤثر على مقاومة البكتيريا لهذه المركبات، علما أن دراسة كيميائية سابقة للمستخلصات الأسيتونية لـ*A.elengans* أسفرت عن وجود لينيان(lignanes)، ديتربان

كوران (kaurane diterpenes)، وسسكتربان نيروليدول وكابرابيديول (caparrapidiol) (Vila et al.,1997).

نفس النتائج تحصل عليها Bhatt et Negi (2012) و Koruthu et al. (2011) حيث شهدت المستخلصات النباتية الأسيتونية نشاطية عالية وقد أرجع السبب إلى الزيوت الطيارة التي تحتوي على مجموعة متنوعة من المكونات الكيميائية مع وظائف مختلفة.

وجدنا في دراستنا هذه أن الميثانول والأسيتون كانا أفضل المذيبات وهذا ينطبق على غيرها من الدراسات التي أشارت أن الميثانول، ميثانول – ماء والأسيتون هي من أحسن المذيبات المستعملة في استخلاص المركبات المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة (المركبات القطبية مثل الفينولات) من النباتات (Eloff, 1998; Deng et al., 2014 ; Al-Zoreky et Al-Taher, 2015).

إن عملية ضبط قطبية المذيبات العضوية وشروط الإستخلاص يمكن أن تسفرعن مكونات مع إنتقائية وذات تأثير عالي مضاد للبكتيريا (Koruthu al., 2011).

شهدت المستخلصات المائية أضعف قطر لمناطق تثبيط البكتيريا أو انعدامها(مستخلص الدرنات) عند كل التراكيز مقارنة مع المستخلصات الأخرى، هذا يتفق مع الدراسة التي ذكرت بأن الماء يكون أقل فعالية من المذيبات العضوية عند استخلاص المركبات الفعالة من النباتات(Sukumarn et al.,2011)، كذلك ذكر Sridhar et al(2012) أن المستخلصات المائية لأوراق *Aristolochia bracteata* Retz. لم تحقق أي نشاطية ضد بكتيرية أو ضد فطرية.

شهدت دراسات أخرى أنه على الرغم من أن الماء له أقصى قطبية، فإنه يذيب الفلافونوييدات (معظمهما من الأنتوسيان) التي لايكون لها نشاطية مضادة للبكتيريا بصفة معنوية، حيث الماء يذيب الفينولات التي لها أهمية كمركبات مضادة للأكسدة فقط(Yamaji et al., 2005). حسب نتائج دراستنا نوافق في الرأي Vaghasiya et Chanda (2007) حيث ذكر أن المعالجين الشعبيين يستخدمون الماء كمذيب في المقام الأول، لكن من دراسته السابقة وجد أن المستخلصات النباتية المستخلصة باستعمال المذيبات العضوية أظهرت نشاطية ضد بكتيرية جد متميزة عن المستخلصات المائية.

Nisa et al. (2013) أشاروا إلى أن ضعف النشاط المضاد للبكتيريا في بعض تراكيزالمستخلص النباتي ليس بالمفاجئ، حيث العديد من مستخلصات النباتية التي وجدت غير فعالة ضد ميكروبات مختبرة معينة بتراكيز ضعيفة ويمكن إرجاع السبب إلى وجود كميات قليلة من المركبات المضادة للميكروبات.

أظهرت نتائج دراستنا أن بكتيريا *E.coli* ATTC 25922 كانت مقاومة لكل المستخلصات المختبرة، وقد طابقت هذه النتائج بعض الدراسات السابقة، Camporese et al. (2003) أن هذه البكتيريا لم تثبط من طرف مستخلصات الكلوروفورم لقلف وأوراق نبات *Aristolochia trilobota*، وكذلك لم يجد Gadhi et al (1999) . أي نشاطية بالنسبة لكل المستخلصات المختبرة لنبات *Aristolochia paucinervis* Pomel(syn. *A. longa* L. ssp paucinervis) ضد *E.coli* و كذلك Suliman Mohamed et al.(2014) أثبت أن

مستخلصات *Aristolochia bracteolate* لم تثبط نموهذه البكتيريا وكذلك *Bacillus cereus*، وتحصل Wiart et al. (2004) على نفس النتيجة لكل من *A. corymbosa* L و*A. tomentosa* . كذلك ذكر Sridhar et al.(2012) أن المستخلصات الميثانولية لأوراق *Aristolochia bracteata* Retz. لم يكن لها أي تأثير على بكتيريا *E.coli* لكنها شهدت نشاطية ضد *Pseudomonas aeruginosa* (38مم). أما في دراسة Vaghasiya et Chanda (2007) ذكرأن المستخلصات الأسيتونية والميثانولية لكل من *A. bracteolata* و *A. indica*لم تحقق أي تثبيط على *E.coli*.

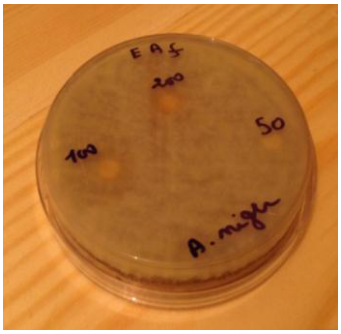
نفس النتائج في دراسة Metrouh-Amir et al.(2015) أين كانت الـ *E.coli* مقاومة لكل المستخلصات المختبرة، كذلك Koruthu et al. (2011) لم يحصل على أي نشاطية لمعظم المستخلصات النباتية المختبرة. قد نرجع سبب الإختلاف في نتائج النشاطية ضد بكتيرية المتحصل عليها إلى المكونات النشطة أو الفعالة الموجودة في هذا النبات، حيث حسب Vaghasiya et Chanda (2007)النشاطية المضادة للبكتيريا التي أظهرتها النباتات المدروسة قد ترجع إلى وجود مكونات فعالة أو نشطة في النباتات نفسها قد تكون منفردة أو مجتمعة.

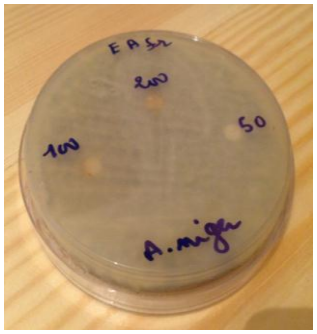
يمكن تفسير تأثير النشاطية المضادة للبكتيريا بالإضطراب المحدث في نفاذية الغشاء البكتيري (Hayek et Ibrahim, 2012). في الواقع، المكونات الفعالة منفردة أو مجتمعة تمنع الكثيرمن العمليات الحيوية للميكروبات، عن طريق الإرتباط بجزيئاتها البروتينية، تعمل كعوامل للاستخلاب، تخريب في أنظمتها االبيوكيميائية ومنع الاستفادة من العناصر الغذائية المتاحة للميكروبات (Garrod et al., 1995). يرتبط التأثير المضاد للبكتيريا للمركبات الفينولية بالتفاعل مع الأنزيمات، الإدمصاص بالأغشية الخلوية ومنع الإستفادة من المواد والأيونات المعدنية (Scalbert, 1991).

في الأخير، توافقت نتائج دراستنا مع الدراسات السابقة التي تشيرإلى أن النشاطية المضادة للبكتيريا للمستخلصات النباتية ترتبط بطريقة الإستخلاص، طبيعة المذيب والسلالة البكتيرية المختبرة (Hayouni et al., 2007; nisa et al., 2013; Metrouh-Amir et al., 2015)

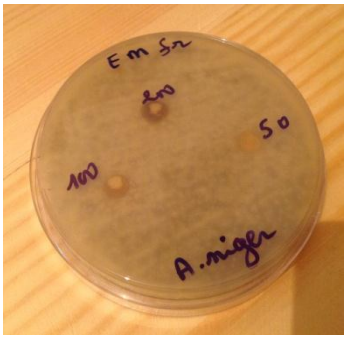
III-7 -2- النشاطية ضد فطرية لمستخلصات *Aristolochia longa* L.

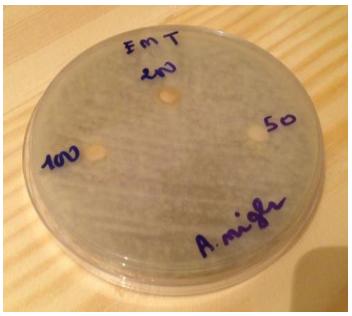
كانت نتائج النشاطية ضد فطرية سلبية بالنسبة لكل المستخلصات المختبرة، ولم نلاحظ أي مناطق تثبيط بعد إنقضاء مدة الحضن، وهذا يعني أن كل المستخلصات سواء المائية أو الميثانولية أو الأسيتونية للأجزاء الثلاثة للنبات الدرنات، الجزء الهوائي والثمار بتركيز 200مغ/ملل لم تكن فعالة ضد الفطريات *Aspergillus flavus* NRRL 391، *Aspergillus niger* 2CA 936 والخميرة *Condida albicans* ATCC1024 (شكل 68،69،70و71).



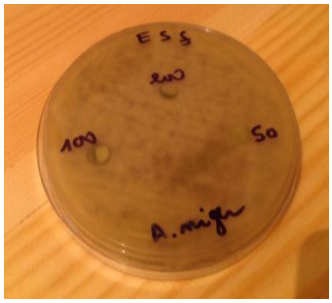


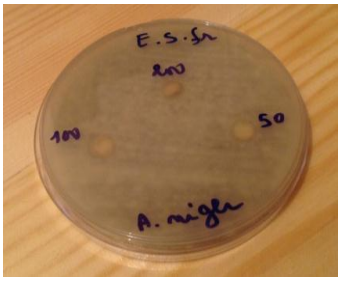
تأثير المستخلصات المائية EAT،EAFrوEAF على *Aspergillus niger*





تأثير المستخلصات الميثانولية EMT،EMFrوEMF على*Aspergillus niger*

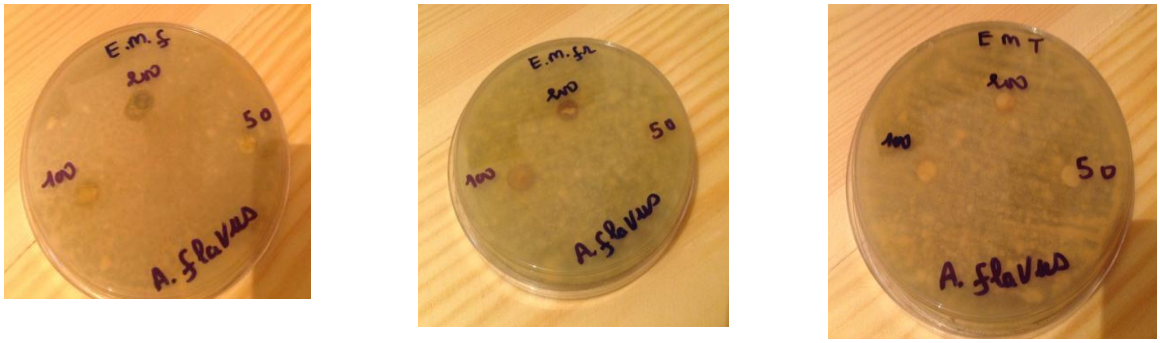




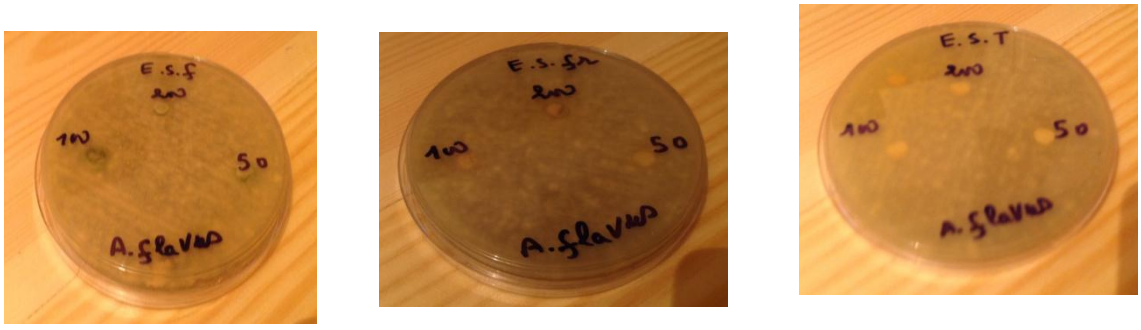
تأثير المستخلصات الأسيتونيةEST،ESFrوESF على *Aspergillus niger*

شكل68. النشاطية المضادة للفطريات للمستخلصات المائية والميثانولية والأسيتونية لفطر *A.niger*

تأثير المستخلصات المائية EAT،EAFr وEAF على *Aspergillus flavus*

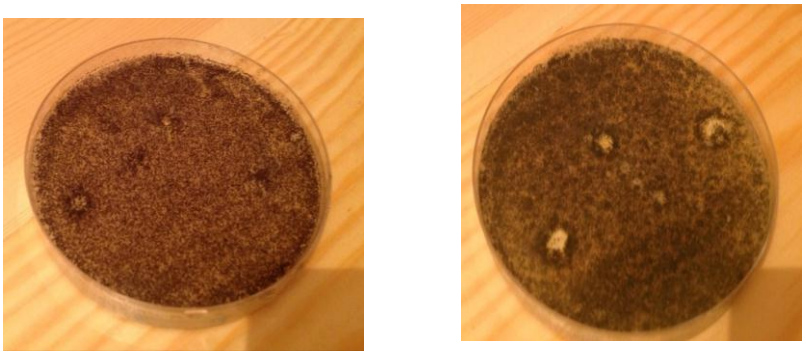


تأثير المستخلصات الميثانولية EMT،EMFr وEMF على *Aspergillus flavus*



تأثير المستخلصات الأسيتونية EST،ESFr وESF على *Aspergillus flavus*

شكل69. النشاطية المضادة للفطريات للمستخلصات المائية والميثانولية والأسيتونية لفطر *A.flavus*



شكل70. ظهور النمو الفطري لكل من *A.flavus A.niger*

تأثير المستخلصات المائية EAT،EAFrوEAF على ***Candida albicans***

تأثير المستخلصات الميثانولية EMT،EMFrوEMF على ***Candida albicans***

تأثير المستخلصات الأسيتونيةEST،ESFrوESF على *Candida albicans*

شكل71. النشاطية المضادة للفطريات للمستخلصات المائية والميثانولية والأسيتونية لخميرة *Candida albicans*

هذا يتفق مع دراسة Duraipandiyan et Ignacimuthu(2011) أين مستخلصات الهكزان (hexane)، أسيتات الإيثيل والميثانول لنبات *Aristolochia tagala* cham. لم تشهد أي نشاطية ضد MTCC 1344 *Aspergillus niger* و*C.albicans* MTCC 227. كذلك Suliman Mohamed et al.(2014) أثبت أن مستخلصات *Aristolochia bracteolate* لم تثبط نمو كل الفطريات المختبرة بما فيهم *A.niger* و*C.albicans* وكذلك وجد Wiart et al.(2004) أن مستخلصات الميثانولية لأوراق و قلف نبات

Aristolochia corymbosa L. لم تؤثر على *C.albicans*. في دراسة Sridhar et al. (2012) لم تحقق المستخلصات المائية لأوراق *Aristolochia bracteata* Retz. أي نشاطية ضد فطرية، وكذلك المستخلصات الميثانولية لم يكن لها تأثير على الفطرA.niger ، لكن كانت هناك نشاطية ضد فطر *A.flavus*في تركيز200 مغ/ملل وهذه النتيجة الأخيرة كانت عكس ما تحصلنا عليه في دراستنا، كذلك Kumar et al. (2006) لم يجد أي نشاطية اتجاه *C.albicans* (MTCC 10231) بالنسبة لمستخلص درنات نبات *Aristolochia indica* L. . كذلك في دراسة Vaghasiya et Chanda (2007) ذكرأن المستخلصات الأسيتونية والميثانولية لكل من *A. bracteolata* و*A. indica* لم تحقق أي تثبيط على C.albicans.في الأخيرنوافق في الرأي Suliman Mohamed et al.(2014) حيث يمكن تفسيرهذه النتائج السلبية للنشاطية بعدم وجود كمية كافية من المركبات الفعالة أو النشطة في المستخلصات النباتية المدروسة.

III- 8- تقييم سمية النبات *Aristolochia longa* L.

تعتبرالسمية الحادة من أولى الخطوات لدراسة سمية مادة غير معروفة، حيث يكون مؤشر السمية الحادة هو DL50 (Mridulla et al., 2011).

III-8 -1- السمية الحادة لدرنات نبات *Aristolochia longa* L. Toxicité aiguë

في هذه الدراسة لم نسجل أي حالة وفاة بالنسبة للفئران المحقونة بمستخلص المائي للدرنات.

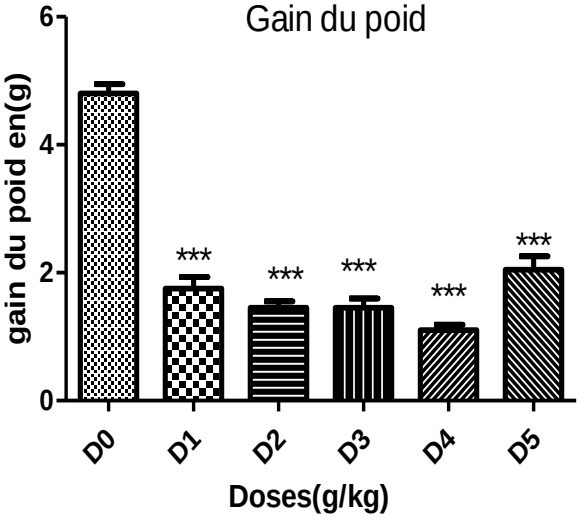
III-8 -1- 1- تطور الوزن خلال التجربة

تبين من مراقبة وزن الفئران خلال التجربة أي في بداية التجربة قبل اعطاء المستخلص للفئران وبعد الحقن أي لمدة 14 يوم لاحظنا ان هناك زيادة في الوزن بالنسبة لكل الأفواج ولكن مقارنة مع الشاهد نلاحظ ان الزيادة في هذا الاخير كانت اكبر مقارنة مع الأفواج الأخرى المعالجة حيث قدرت نسبة زيادة الوزن في الفوج غير المعالج بـ 16,49± 1,06%، وفي الفوج1بـ 5,95± 1,58% والفوج 2 و3بـ 4,49±0,78 و4,61 ± 1,15% على الترتيب والفوج 4 بـ 3,35 ± 0,66%، أما الفوج 5بـ 7,48 ±1,92%(شكل73)، وقد أكدنا هذه النتائج بحساب الوزن المكتسب لكل الافواج في مدة 14 يوم، حيث قدرالوزن المكتسب بـ 4,8غ (شكل72)بالنسبة للفوج الشاهد وكانت أعلى قيمة مقارنة مع الأوزان المكتسبة للأفواج المعالجة وكان هذا الفرق معنوي مقارنة مع الوزن المكتسب للأفواج المعالجة كما هو موضح في الجدول أدناه .

جدول12. تطور وزن الفئران للفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة

الافواج	الوزن قبل المعالجة (غ) ز0	الوزن بعد المعالجة (غ) ز14	الوزن المكتسب (غ)
الفوج الشاهد(جرعة0)	0,79±29,1	1.01± 33,9	0,35±4,8
الفوج 1(جرعة1)	0,48±29,45	0,40±31,2	***0,44±1,75
الفوج 2(جرعة2)	0,17±32,26	0,28±33,74	***0,25±1,45
الفوج 3(جرعة3)	0,14±31,4	0,33±32,85	***0,36±1,45
الفوج 4(جرعة4)	0,50±32,8	0,96±33,1	***0,20±1,1
الفوج 5(جرعة5)	0,77±27,45	0,77±29,5	***0,50±2,05

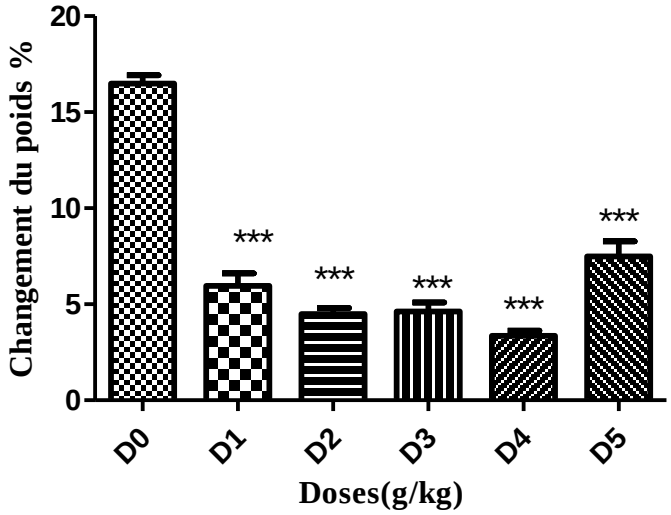
كل قيمة تمثل معدل لـ 6 عينات (ن=6) ± SD، P<0. 001: *** مقارنة مع الوزن المكتسب للشاهد، جرعة 1 (2غ/كغ)،جرعة 2(4 غ/كغ)،جرعة 3(6 غ/كغ)،جرعة 4(8غ/كغ)،وجرعة 5(12غ/كغ).



شكل72. الوزن المكتسب لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة،

P<0. 001: *** ،D_0 (0غ/كغ)، D_1 (2غ/كغ)، D_2 (4 غ/كغ)، D_3(6 غ/كغ)، D4 (8غ/كغ)، وD_5(12غ/كغ).

نلاحظ من الجدول (12) والشكل (72) أنه لم يكن هناك فقدان للوزن وهذا دليل على أن هذا النبات لم يؤثر بالسلب على الفئران.



شكل73. النسب المئوية للزيادة في الوزن لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة، P<0.001 : *** D_0 (0غ/كغ)، D_1 (2غ/كغ)، D_2 (4 غ/كغ)، D_3(6 غ/كغ)، D4(8غ/كغ)، وD_5(12غ/كغ).

III --8 -1- 2-الكتلة النسبية للأعضاء Masse relative des organes

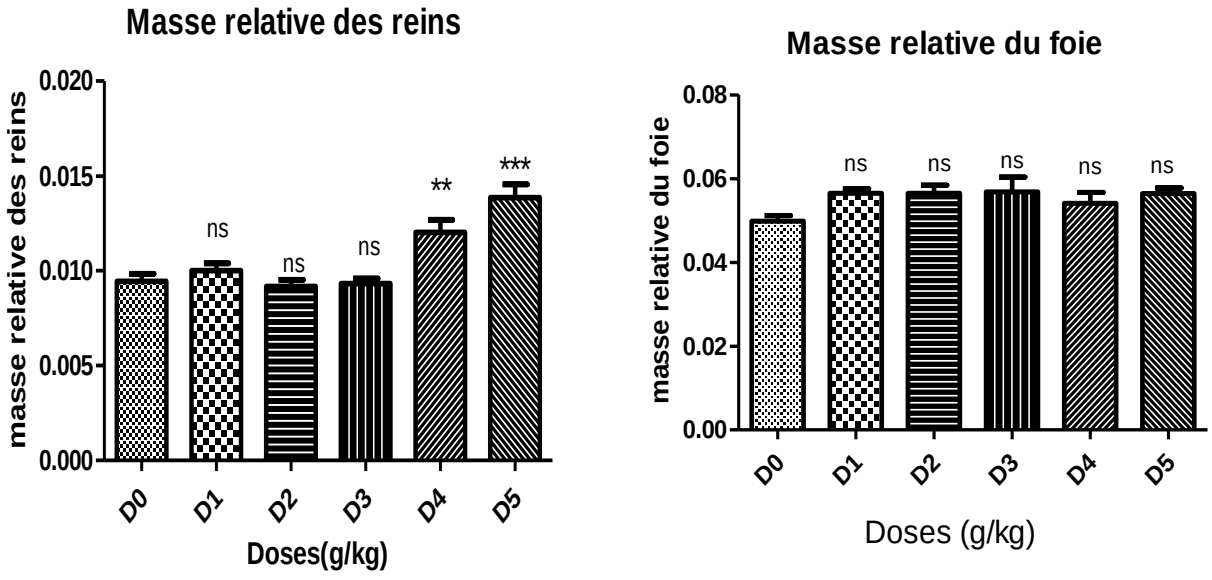
بعد قتل الفئران في آخر يوم من التجربة، قمنا باستئصال كل من الكبد والكليتين وتم فحصهما مباشرة بالعين المجردة، وتبين أن كل من الشكل، الحجم، اللون وكذلك الوزن كانت عادية. نؤكد هذه الملاحظات بعد تحديد الكتلة النسبية للأعضاء التي تمثل النسبة بين وزن الكليتين أووزن الكبد ووزن الفأر، الموضحة في الجدول(13) التالي:

جدول 13. الكتلة النسبية لأعضاء الفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي لدرنات نبات *A.longa* L.

الأفواج	الكبد	الكلى
الفوج الشاهد(جرعة0)	0,003 ±0,04983	0,001± 0,009443
الفوج 1(جرعة1)	^{ns}0,002 ± 0,05653	^{ns} 0,0009± 0,01001
الفوج 2(جرعة2)	^{ns}0,005 ± 0,05650	^{ns} 0,0009± 0,009169
الفوج 3(جرعة3)	^{ns}0,008 ± 0,05683	^{ns} 0,0007± 0,009319
الفوج 4(جرعة4)	^{ns}0,006 ± 0,05409	** 0,001± 0,01202
الفوج5(جرعة5)	^{ns}0,003 ± 0,05641	*** 0,001± 0,01386

كل قيمة تمثل معدل لـ 6 عينات (ن=6) ± SD، ^{ns} p> 0.05، *** P<0.0001

جرعة 1 (2غ/كغ)،جرعة 2(4 غ/كغ)،جرعة 3(6 غ/كغ)،جرعة 4(8غ/كغ) وجرعة 5 (12غ/كغ).



شكل74.تغيرات الكتلة النسبية للكبد والكلى للجرعات المختلفة اثناء إختبارالسمية الفورية بالمستخلص المائي لنبات *Aristolochia longa* L. .القبم هي معدل لـ ±(ن=6).النجوم تمثل الفرق المعنوي ns أي الفرق غير معنوي .(P<0.01) ** ،(P<0.001)*** حسب إختبار ANOVA: الجرعة0 (D0)(0غ/كغ)، الجرعة1 (D1)(2غ/كغ)، الجرعة2 (D2)(4غ/كغ)، الجرعة3 (D3)(6غ/كغ)،الجرعة 4(D4)(8غ/كغ) ، الجرعة5(D5) (12غ/كغ).

نلاحظ من الجدول (13) ومن الشكل(74) أنه لايوجد فرق معنوي بين الكتلة النسبية للكبد للفوج الشاهد وبين الأفواج المختبرة، أما بالنسبة للكلى فنلاحظ أن هناك ارتفاع معنوي في الكتلة النسبية للأفواج المعالجة بالجرعة 4 (8غ/كغ) والجرعة 5 (12غ/كغ)، بنسبة 27,29% و46,77% على الترتيب. هذه النتائج تجعلنا نقترح أن هذا النبات له تأثير على الكلى في الجرعات ذات التركيز الكبير.عموما يعتبرالتغيرفي وزن الأعضاء الداخلية كمؤشر للسمية بعد التعرض لمادة سامة (Raza et al., 2002;Teo et al.,2002).

III-8 -1- 3- الاختبارات البيوكيميائية

بينت نتائج التحاليل المخبرية لدم الفئران، أنه لم يكن هناك فرق معنوي في التحاليل الخاصة بنسبة السكر في الدم، الكولسترول وثلاثي الغليسريد عند مقارنة الفوج الشاهد (الجرعة 0) بالأفواج المعالجة بمختلف الجرعات، أما بالنسبة للتحاليل الكبدية (ALT,AST,PAL) فنلاحظ أنه لم يكن هناك فرق معنوي في اختبار فوسفتاز ألكلين PAL (Phosphatase alcaline)، أما مع الجرعة الخامسة(12غ/كغ) في اختبار أسبرتات أمينوترنسفيراز AST(Aspartate aminotransférase) فسجلنا فرق معنوي واضح، أي هناك ارتفاع واضح في نسبة هذا الأنزيم وكان واضحا أيضا مع الجرعة الخامسة في اختبار ألانين أمينوترنسفيراز ALT(Alanine aminotransférase) ومتوسطا في الجرعة الثالثة (6غ/كغ)، فيما يخص تحاليل الكلى اليوريا(urée) و كرياتين(créate) فكان فرق معنوي ضعيف في الجرعة الخامسة(12غ/كغ) بالنسبة للكرياتين(Create) حيث كان ارتفاع بسيط في نسبته مقارنة مع الشاهد، أما اليوريا (urée)

فلاحظنا انخفاض في نسبته حيث كان الفرق متوسط في في كلتا الجرعتين 2 و3 بتركيز 4 و6غ/كغ على الترتيب و الفرق معنوي واضح في الجرعة 4 و5 بتركيز 8 و12 غ/كغ على الترتيب. التحاليل البيوكيميائية الموضحة في الجدول (14) تبين أن هناك اضطراب العوامل البيوكيميائية خاصة في الجرعات الكبيرة.

جدول 14. التحاليل البيوكيميائية للفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي لدرنات نبات *A.longa* L. خلال دراسة السمية الحادة

الجرعة / الاختبارات	ج 0	ج1	ج2	ج3	ج4	ج5
(UI/l) ALT	5,83±44	^{ns}6,92±56,5	^{ns}4,71±36,67	^{ns}6,95±46	^{ns} 6±47	***11,19±72
(UI/l) AST	21,15±166,5	^{ns}29, 55±180,5	^{ns}22,63±131,5	*36,13±228,5	^{ns}13,77±175,5	***44,21±323,5
(UI/l) ALP	12.32±154,5	^{ns}16, 21±124	^{ns}13,45±152	^{ns}12,02±144	^{ns}21,34±140	^{ns}26,89±177
(mg/l) CREATE	^{ns}0.40±5,05	^{ns}1, 11±6	^{ns}0,64±6,2	^{ns}0,23±5,65	^{ns}0,75±5,75	*0,65±6,4
(mg/l) UREE	0,029±0,385	^{ns}0, 03±0,35	**0,05±0,3	**0,02±0,3	***0,02±0,285	***0,03±0,235
(g/l) CHOLESTEROL	0,08±1,052	^{ns}0, 117±1,18	^{ns}0,165±1,18	^{ns}0,06±1,29	^{ns}0,16±1,19	^{ns}0,17±1,115
(g/l) TRIGLYCERIDE	0,19±1,28	^{ns}0, 18±1,15	^{ns}0,27±1,65	^{ns}0,22±1,6	^{ns}0,24±1,55	^{ns}0,17±1,25
(g/l) GLYCEMIE	0,15±1,46	^{ns}0, 15±1,35	^{ns}0,24±1,515	^{ns}0,17±1,51	^{ns}0,22±1,58	^{ns}0,12±1,51

المعطيات معبر عنها بمعدل ±SD (ن=6) ،nsغير معنوي ،(P<0.05) *،P<0.01** ،P<0.001 ***،

ألانين أمينوترنسفيرازALT (Alanine aminotransférase) ،أسبرتات أمينوترنسفيراز Aspartate(AST aminotransférase)، فوسفتاز ألكلين PAL (Phosphatase alcaline)، كرياتين (Créatine)، اليوريا(Urée)، الكوليسترول (Cholestérol)، ثلاثي الغلسريد (Triglyceride)، نسبة السكر في الدم (Glycemie). ج$_0$:0غ/كغ ،ج$_1$:2غ/كغ ، ج$_2$:4غ/كغ ،ج$_3$: 6غ/كغ ، ج$_4$: 8غ/كغ ،ج$_5$: 12غ/كغ.

- **III-8 -2- السمية الحادة المستخلص المائي لكل من الجزء الهوائى وثمارنبات *Aristolochia longa* L.**

عند حقن الفئران بجرعة 2غ/كغ من مستخلص الجزء الهوائي(الأوراق والسيقان) و الثمار لم نلاحظ أي تغيرفي حالة أو سلوك الفئران حيث بقيت الفئران بحالة جيدة طيلة 14 عشر يوم.

2-أما فيما يخص حقن الفئران بجرعة 5غ/كغ من مستخلص المائي للثمار، لم نلاحظ أي أعراض غير طبيعية عكس المستخلص المائي للأوراق الذي عند حقن الجرعة 5غ/كغ حيث لاحظنا في نصف الساعة الأولى خفقان سريع لقلب الفأر و حركة بطيئة جدا، واستمر على هذه الحالة حيث نقص حجمه وأصيب بقشعريرة عل الجلد والشعر. وتوفي في اليوم التالي من الحقن.

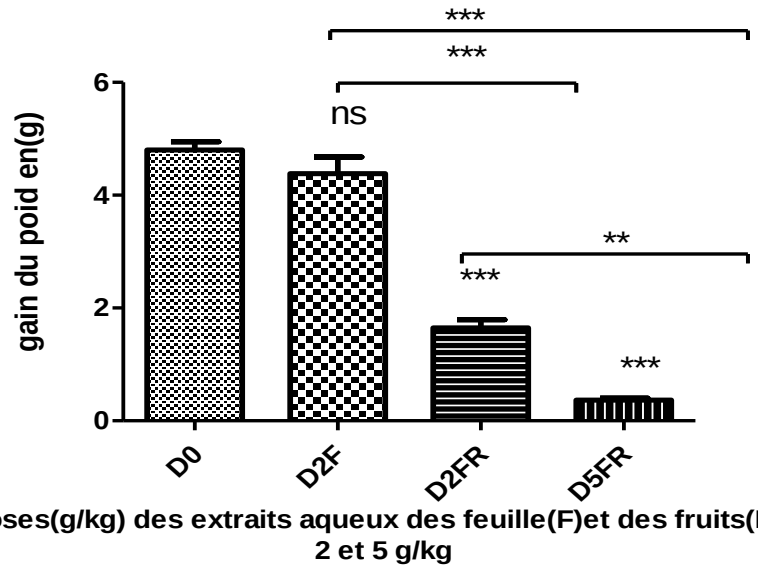
III-8 -2- 1- تطور الوزن خلال التجربة

تبين من مراقبة وزن الفئران خلال التجربة أي في بداية التجربة قبل إعطاء المستخلص للفئران وبعد الحقن أي لمدة 14 يوم لاحظنا ان هناك زيادة في الوزن بالنسبة لكل الفئران ولكن مقارنة مع الشاهد نلاحظ ان الزيادة في هذا الاخير كانت اكبر مقارنة مع الأفواج الاخرى المعالجة حيث قدرت نسبة الزيادة في الفوج غير المعالج بـ 16,49%±1,06، وفي الفوج1 الخاص بالمستخلص المائي للثماربجرعة 2غ/كغ بـ 4,78±0,53 % والفوج 2 الخاص بمستخلص المائي الأوراق بجرعة 2غ/كغ قدرت بـ 16,63± 2,32 % والفوج3 الخاص بالمستخلص المائي للثمار بجرعة 5غ/كغ كانت النسبة ضعيفة جدا وقدرت بـ 1,23± 0,19%(شكل76) ، وقد أكدنا هذه النتائج بحساب الوزن المكتسب لكل الأفواج في مدة 14 يوم، حيث قدر الوزن المكتسب بـ 4,8غ بالنسبة للفوج الشاهد(شكل75) وكانت أعلى قيمة مقارنة مع الأوزان المكتسبة للأفواج المعالجة وكان هذا الفرق معنوي بالنسبة للفوج الأول والثالث ولكنه غير معنوي مع الفوج الثاني حيث قدر الوزن المكتسب بـ 4,38غ كما هو موضح في الجدول(15).

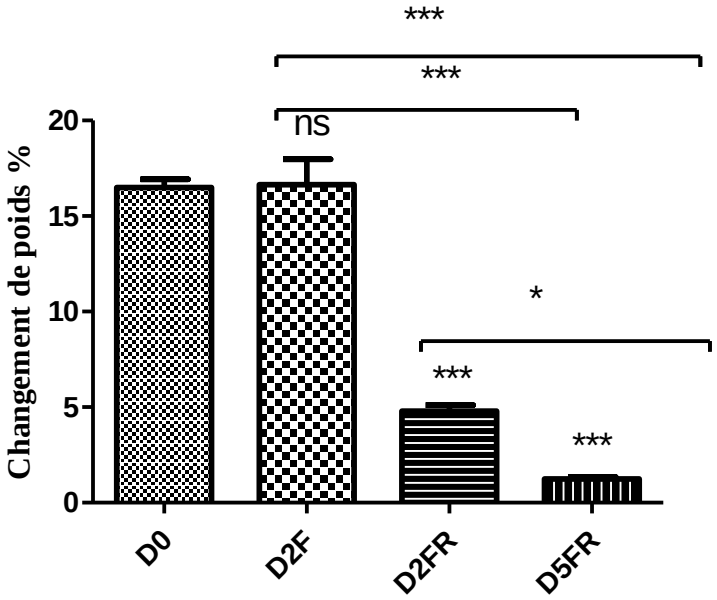
جدول15. تطور وزن الفئران للفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة

الافواج	الوزن قبل المعالجة (غ) ز0	الوزن بعد المعالجة (غ) ز14يوم	الوزن المكتسب (غ)
الفوج الشاهد(جرعة0) D_0	1.13±28,9	1.01±33,9	0,35±4,8
الفوج1(جرعة2غ/كغ ثمار)D_2FR	1,35±34,35	1,6±36	*** 0,25±1,65
الفوج2(جرعة2غ/كغ أوراق)D2F	2,20±26,45	2,32±30,83	ns 0,5±4,38
الفوج 3(جرعة5غ/كغ ثمار)D_5 FR	0,7±29,7	1,1±29,8	***0,05±0,36

كل قيمة تمثل معدل لـ 3 عينات (ن=3) ± SD، P<0.0001 مقارنة مع الوزن المكتسب للشاهد جرعة 1 (2غ/كغ ثمار)،جرعة 2(2 غ/كغ أوراق)،جرعة 3(5 غ/كغ ثمار)



شكل75. الوزن المكتسب لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة، P<0. 001 : ***، P<0. 01 :**. D_0 (0غ/كغ)، D_2F (2غ/كغ من مستخلص الجزء الهوائي)، D_2 FR (2 غ/كغ من مستخلص الثمار)، D_5 FR(5غ/كغ من مستخلص الثمار).



شكل76. النسب المئوية للزيادة في الوزن لفئران الفوج الشاهد والأفواج المعالجة خلال مدة التجربة، .P<0 001: ***، D_0*p<0,05 (D_0غ/كغ)، D_2F (2غ/كغ من مستخلص الجزء الهوائي)، D_2 FR (2 غ/كغ من مستخلص الثمار)، D_5 FR(5غ/كغ من مستخلص الثمار).

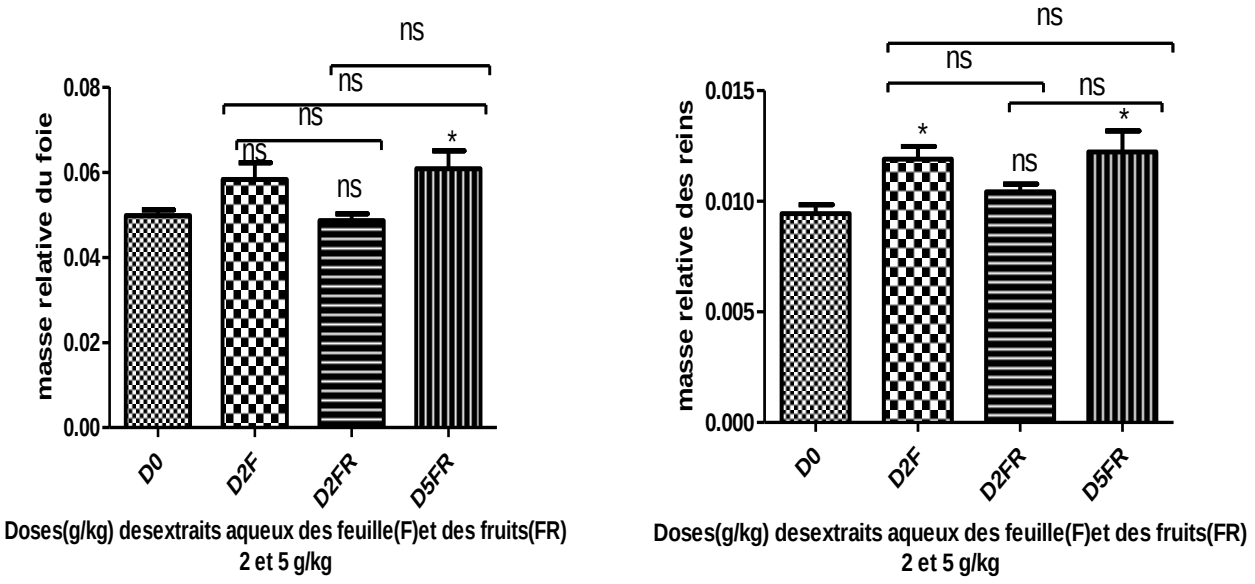
III-8 -2- 2- الكتلة النسبية للأعضاء Masse relative des organes

بعد قتل الفئران في آخر يوم من التجربة، قمنا باستئصال كل من الكبد والكليتين وتم فحصهما مباشرة بالعين المجردة، وتبين أن كل من الشكل، الحجم، اللون وكذلك الوزن كانت عادية. نؤكد هذه الملاحظات بعد تحديد الكتلة النسبية للأعضاء الموضحة في الجدول(16).

جدول16. الكتلة النسبية لأعضاء الفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي للجزء الهوائي وثمار نبات.*A.longa* L

الأفواج	الكبد	الكلى
الفوج الشاهد(جرعة0)D_0	0,003 ±0,04983	0,001± 0,009443
الفوج 1(جرعة1) D_2FR	^{ns}0,002 ±0,04866	^{ns} 0,0005±0,010433
الفوج 2(جرعة2)D_2 F	^{ns}0,006 ±0,05827	*0,0009±0,01191
الفوج 3(جرعة3) D_5 FR	*0,007 ±0,06080	*0,001±0,012236

كل قيمة تمثل معدل لـ 3 عينات (ن=3) ± SD، ^{ns} p> 0.05 ، p<0,05 * مقارنة مع الوزن المكتسب للشاهد، جرعة 1 (2غ/كغ ثمار)،جرعة 2(2 غ/كغ الجزء الهوائي)،جرعة 3(5 غ/كغ ثمار).



شكل77. تغيرات الكتلة النسبية لكبد وكلى الفئران عند الجرعات المختلفة اثناء اختبار السمية الفورية بالمستخلص المائي لنبات *Aristolochia* longa L. .القيم هي معدل لـ ±(ن=3).النجوم تمثل الفرق المعنوي، ns أي الفرق غير معنوي. p<0,05*، (P≤0.01) ** ،(P≤0.001)*** حسب إختبار ANOVA;الجرعة0 (الشاهد D0)، الجرعة1(D2FR)(2غ/كغ بالنسبة لمستخلص الثمار)، الجرعة2 (D2F)(2غ/كغ مستخلص الجزء الهوائي)، الجرعة3 (DFR 5)(5غ/كغ مستخلص الثمار).

نلاحظ من الجدول(16) ومن الشكل(77) أنه لايوجد فرق معنوي بين الكتلة النسبية للكبد للفوج الشاهد وبين اللأفواج المختبرة إلا فيما يخص الفوج المعالج بنسبة 5غ/كغ فكان هناك ارتفاع معنوي في الكتلة النسبية للكبد قدرب22,01%، ونفس الشئ بالنسبة للكلى فنلاحظ أن هناك ارتفاع معنوي في الكتلة النسبية للأفواج المعالجة بالجرعة (5غ/كغ) بنسبة 29,58% على الترتيب، كذلك لاحظنا أنه فرق معنوي بالنسبة للجرعة 2غ/كغ للمستخلص المائي للجزء الهوائي حيث قدرنا الإرتفاع في الكتلة النسبية للكلى بنسبة 26,10% مقارنة مع الكتلة النسبية للشاهد.

هذه النتائج تجعلنا نقترح أن هذا النبات له تأثير على الكلى في التركيز الكبيربالنسبة للثمار(5غ/كغ) وكذلك عند التركيز 2 غ/كغ بالنسبة للجزء الهوائي. عموما يعتبرالتغيرفي وزن الأعضاء الداخلية كمؤشر للسمية بعد التعرض لمادة سامة (Raza et al., 2002;Teo et al.,2002).

III-8 -2- 3- **الاختبارات البيوكيميائية**

يلخص الجدول التالي مختلف الإختبارات البيوكيميائية، التي تبين أن نتائج التحاليل بالنسبة للجرعة 1 وهي 2 غ/كغ من المستخلص المائي للثمار لم تكن مختلفة عن نتائج الفوج الشاهد، إلا بالنسبة للكرياتينين حيث كان هناك فرق معنوي بسيط، كذلك بالنسبة للجرعة الثانية والتي تخص المستخلص المائي للجزء الهوائي بجرعة 2غ/كغ فقد لاحظنا أن هناك فرق معنوي بالنسبة لتحليل الكرياتنين وكذلك بالنسبة لنسبة السكر في الدم الذي ظهرت مرتفعة قليلا، أما الجرعة الأخيرة 5غ/كغ بالنسبة للمستخلص المائي للثمار فكان التأثير واضح على الإختبارات الخاصة بالكبد (ALT، ALP)، كذلك إختبار الكرياتينين الخاص بالكلية الذي ظهربفرق جد معنوي. التحاليل البيوكيميائية الموضحة في الجدول(17) تبين أن هناك اضطراب العوامل البيوكيميائية خاصة في الجرعة 5غ/كغ .

جدول 17. التحاليل البيوكيميائية للفئران غير المعالجة والمعالجة بالمستخلص المائي لدرنات نبات *A.longa* L. خلال دراسة السميةالحادة

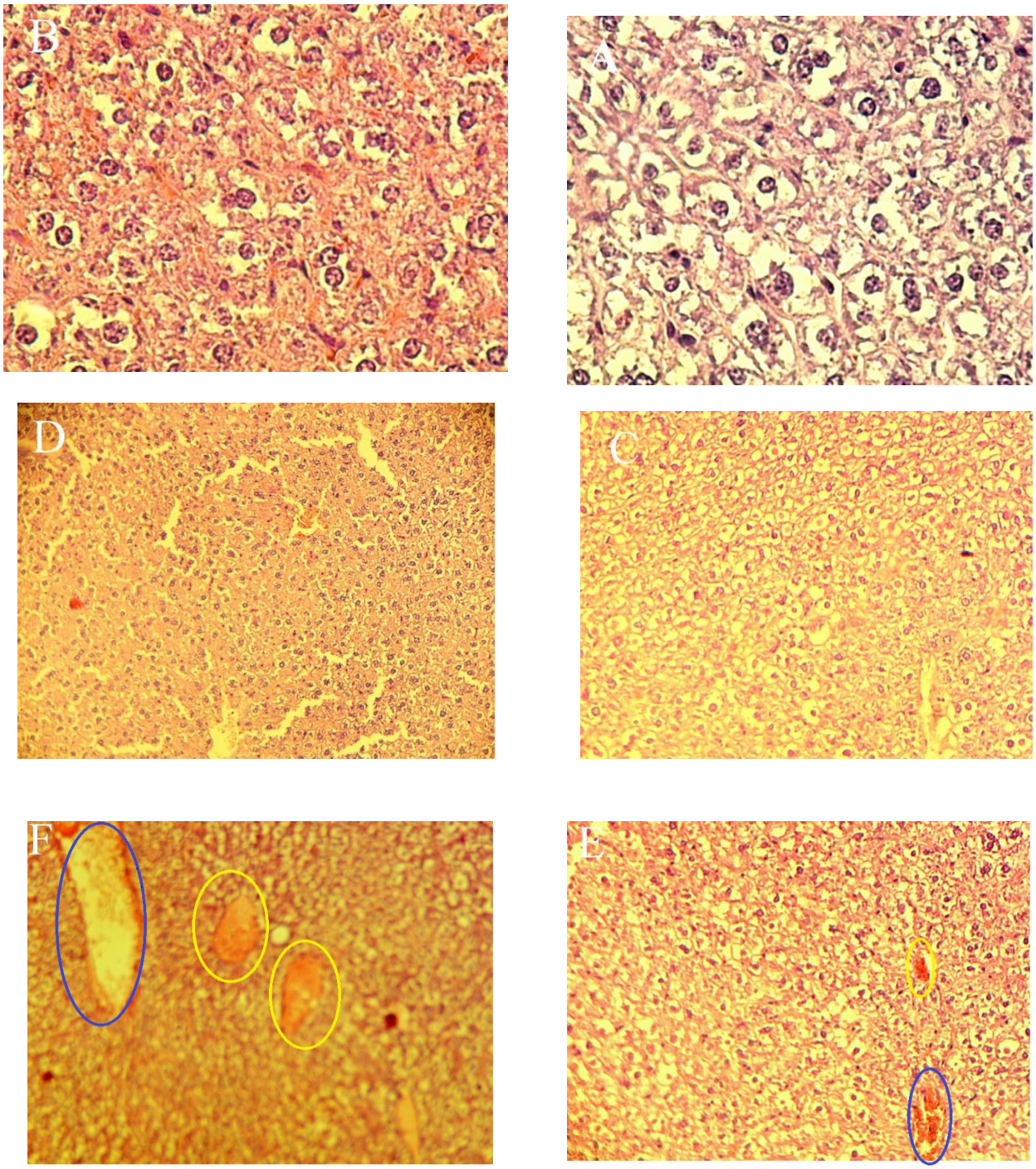
الجرعة / الاختبارات	ج0	ج1 D2FR	ج2 D2F	ج3 D5FR
(UI/l) ALT	5,83±44	^{ns}2,5±42,5	^{ns}6,5±45,5	**8,5±66,5
(UI/l) AST	21,15±166,5	^{ns}5,5±143,5	^{ns} 32,72±203,7	^{ns}2±168
(UI/l) ALP	12.32±154,5	^{ns}3,5±154,5	^{ns}11,5±166,5	**8±186
(mg/l) CREATE	0.40±5,05	*0,15±6,25	**0,23±6, 26	***0,72±7,1
(mg/l) UREE	0,029±0,385	^{ns}0,04±0,345	^{ns}0,005±0,355	^{ns}0,03±0,36
(g/l) CHOLESTEROL	0,08±1,052	^{ns}0,05±1,15	^{ns}0,04±0,915	^{ns}0,05±1,14
(g/l) TRIGLYCERIDE	0,19±1,283	^{ns}0,15±1,35	^{ns}0,05±1,55	^{ns}0,15±1,23
(g/l) GLYCEMIE	0,15±1,46	^{ns}0,025±1,825	**0,32±2,03	*0,07±1,88

المعطيات معبر عنها بمعدل ±SD (ن=3)، nsغير معنوي، *P≤0.05)، **P≤0.01، *** P≤0.0001)، ألانين أمينوترنسفيرازALT (Alanine aminotransférase)، أسبرتات أمينوترنسفيرازAST (Aspartate aminotransférase)، فوسفتاز ألكلين PAL (Phosphatase alcaline)، كرياتين (Créatine)، اليوريا(Urée)، الكوليسترول (Cholestérol)، ثلاثي الغلسريد (Triglyceride)، نسبة السكر في الدم (Glycemie).ج$_0$:0غ/كغ، ج1ثمار :2غ/كغ ، ج$_2$ أوراق:2غ/كغ، ج$_3$ ثمار:5غ/كغ.

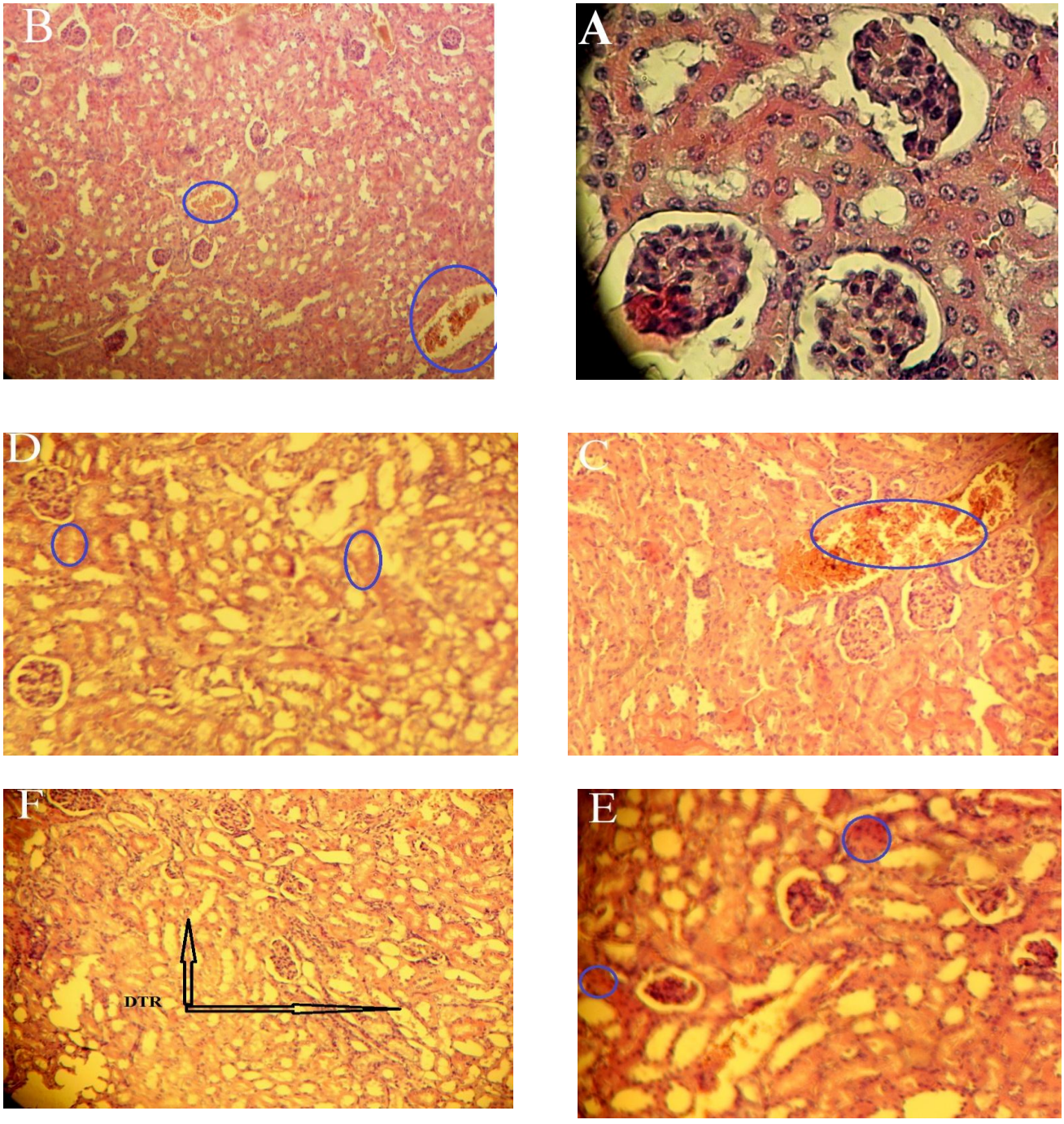
II-8 - 3- دراسة الأنسجة

النتائج البيوكيميائية (اضطراب العوامل البيوكيميائية) نأكدها بنتائج الفحص النسيجي لكل من الكلى والكبد حيث تدل مقاطع الأنسجة على تأثر كل من أنسجة الكبد والكلى خاصة عند الجرعات العالية (Cherif et al.,2014).

الفحص االنسيجي لكل من كبد وكلى الفئران المعالجة بالمستخلص المائي للدرنات والفئران الشاهدة بين أن برانشيما الأعضاء لكل من الفوجين كان سليما باستثناء بعض االملاحظات مثل الإحتقان االدموي والنكرزة وهذا وفقا للجرعة المحقونة. لم تسبب الجرعات (1،2 و3) أثر يذكر في مقاطع الأنسجة لكل من الكبد والكلى شكل (78و79)، حيث ظهرت بنية النسيج البرانشيمي محفوظة في كل من الكبد والكلية، لكن هناك بعض المميزات في الأنسجة بالنسبة للجرعات الكبيرة الجرعة 4 (8غ/كغ) والجرعة 5(12 غ/كغ) وهذا مايبينه شكل (78) بالنسبة لنسيج الكبد ظهرت في الجرعة (8غ/كغ) نكرزة موضعية وكذلك إحتقان دموي وظهور إبيضاض في بعض الخلايا الكبدية، كذلك في الجرعة الخامسة(12غ/كغ) ظهرت مناطق للنكرزة واضحة ومواضع احتقان الأنابيب الكبدية مع ابيضاض في معظم الخلايا الكبدية (clarification des cellules hepatiques). أما بالنسبة لنسيج الكلى (79) فلم يكن الأثر كبير فكانت في الجرعات الثلاث الأولى بنية النسيج محفوظة مع ظهور مواضع للإحتقان الدموي، انتفاخ في الأنابيب الكلوية مع انكماش في بعض الكبيبات(glomérules) وكان هذا الأثر أكثر وضوح في الجرعة الثالثة(6غ/كغ)، الجرعة الرابعة تميزت بوجود توسع كيسي للأنابيب الكلوية (dilatation des tubes renaux)، كذلك تميزت الجرعة الخامسة باحداث انتفاخ أكثر وضوح في الأنابيب الكلوية مع انكماش في بعض الكبيبات.

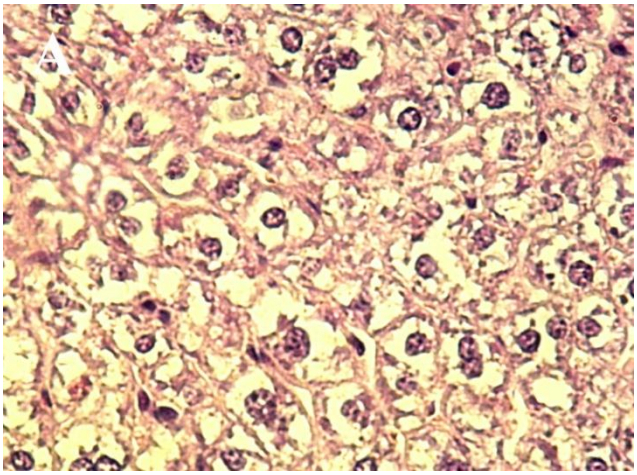


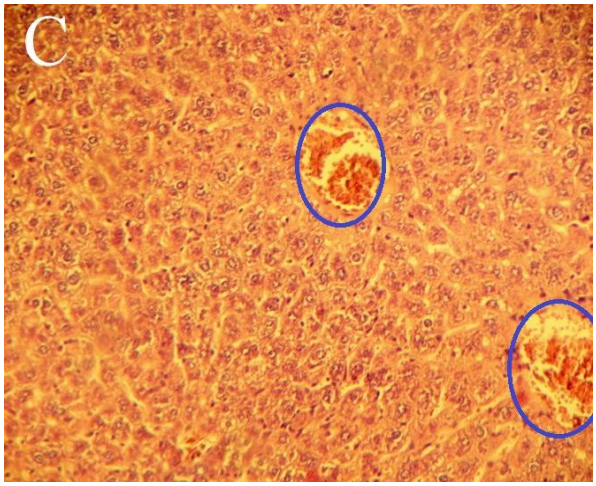
شكل 78. تأثير المستخلص المائي لدرنات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكبد للفئران المختبرة مدة 14 يوم : A نسيج كبد الشاهد، B نسيج في جرعة 2غ/كغ، C نسيج في الجرعة 4غ/كغ، D نسيج في جرعة 6غ/مغ، E نسيج في جرعة 8غ/كغ، F نسيج في جرعة 12غ/كغ التكبير 40× و100 × ، الحلقات الزرقاء :إحتقان دموي(congestion)، الحلقات الصفراء:نخر أو نكرزة(nécrose).

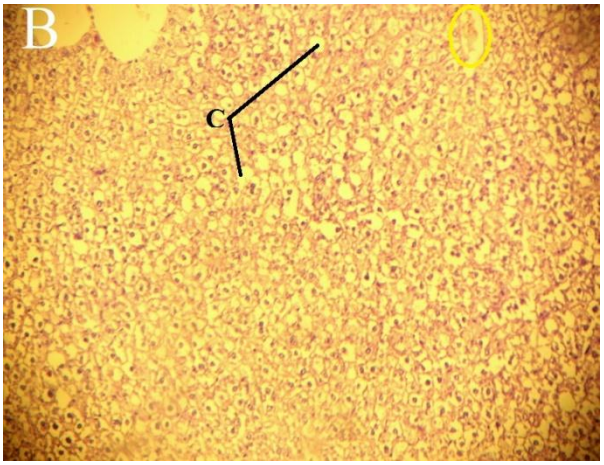


شكل 79. تأثير المستخلص المائي لدرنات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكلى للفئران المختبرة مدة 14 يوم : A نسيج كبد الشاهد، B نسيج في جرعة 2غ/كغ، C نسيج في الجرعة 4غ/كغ، D نسيج في جرعة 6غ/مغ، E نسيج في جرعة 8غ/كغ، F نسيج في جرعة 12غ/كغ .التكبير 40× و100 × ، الحلقات الزرقاء :إحتقان دموي(congestion)، الحلقات الصفراء:نخر أو نكرزة(nécrose)، DTR :انتفاخ في أنابيب الكلى(distention des tubes renaux).

أما فيما يخص المقاطع النسيجية للكبد بالنسبة للمستخلص المائي للثماربجرعة 2غ /كغ كما يظهر في الشكل(80B) أن بنية النسيج البرانشيمي محفوظة مع ظهورموضع صغير للنكرزة مع ابيضاض لبعض الخلايا الكبدية، أما المستخلص المائي للجزء الهوائي بنفس الجرعة 2غ /كغ فظهر ببنية نسيجية محفوظة مع ظهور بعض مواقع الإحتقان الدموي (شكل80C).

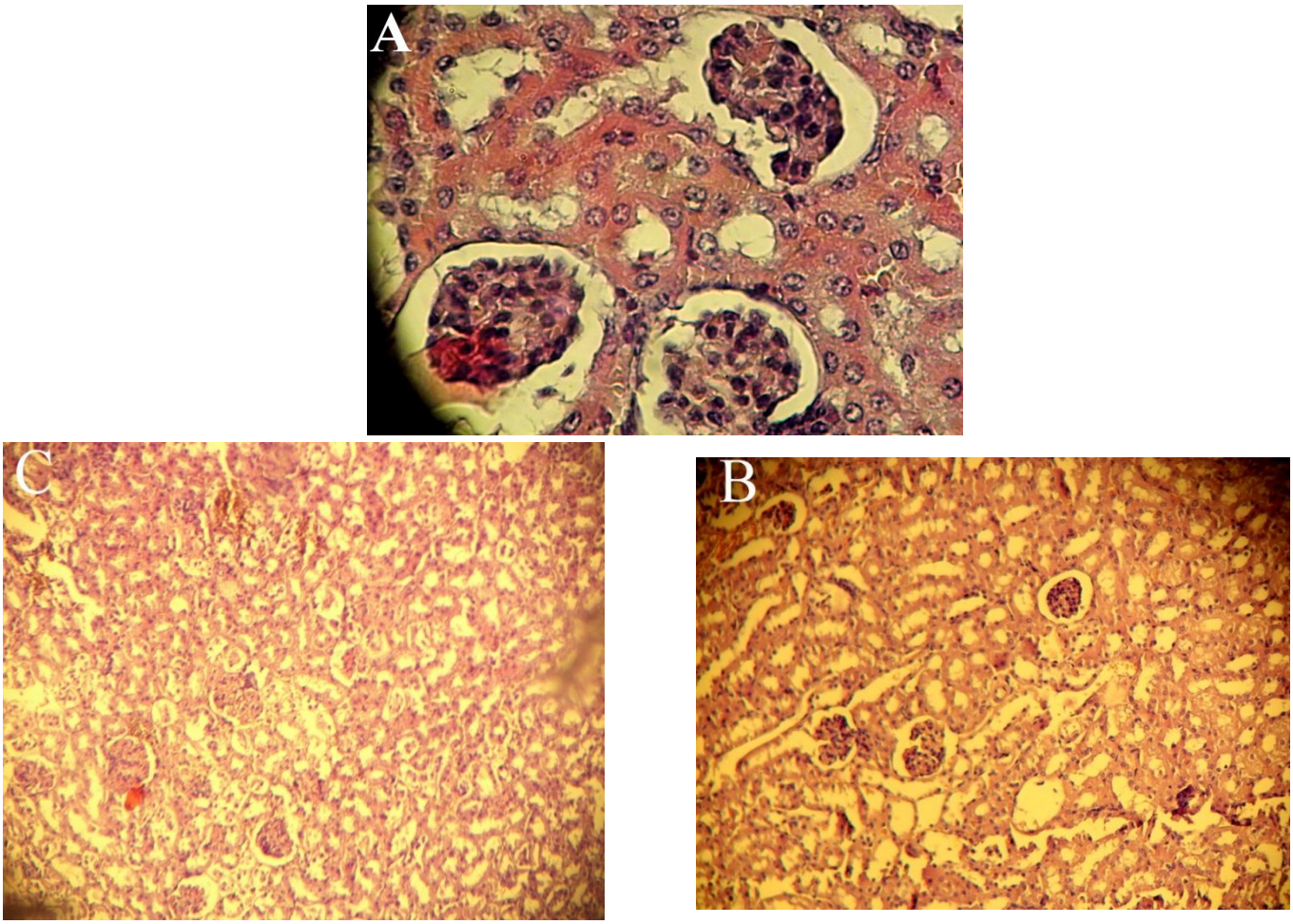






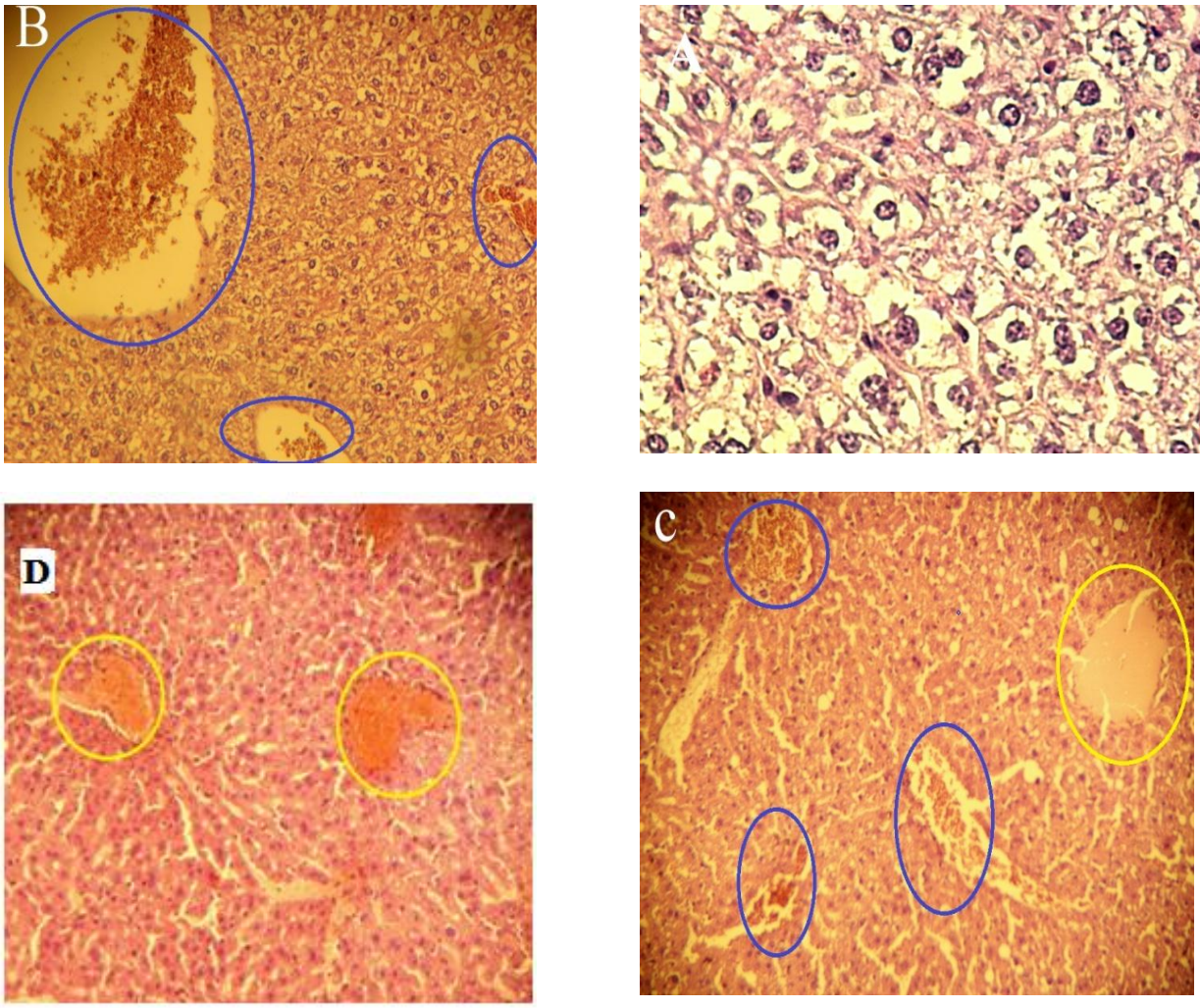
شكل 80. تأثير المستخلص المائي لثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكبد للفئران المختبرة مدة 14 يوم : A نسيج كبد الشاهد، B نسيج في جرعة 2غ/كغ من المستخلص المائي للثمار ، C نسيج في الجرعة 2غ/كغ من المستخلص المائي للجزء الهوائي.التكبير 40× و100 ×.
الحلقات الزرقاء :إحتقان دموي(congestion)، الحلقات الصفراء:نخر أو نكرزة(necrose)، c : ابيضاض الخلايا الكبدية (clarification des cellules hepatiques).

أما فيما يخص المقاطع النسيجية للكلى بالنسبة للمستخلص المائي للثماربجرعة 2غ /كغ كما يظهر في الشكل(B81) أن بنية النسيج البرانشيمي محفوظة مع ظهورتوسع كيسي في خلايا النسيج البرانشيمي بأحجام مختلفة وقد يرجع هذا إلى تقنية عمل المقاطع، أما المستخلص المائي للجزء الهوائي بجرعة 2غ /كغ فظهر ببنية نسيجية محفوظة حيث ظهر نسيج برانشيمي عادي(81C).



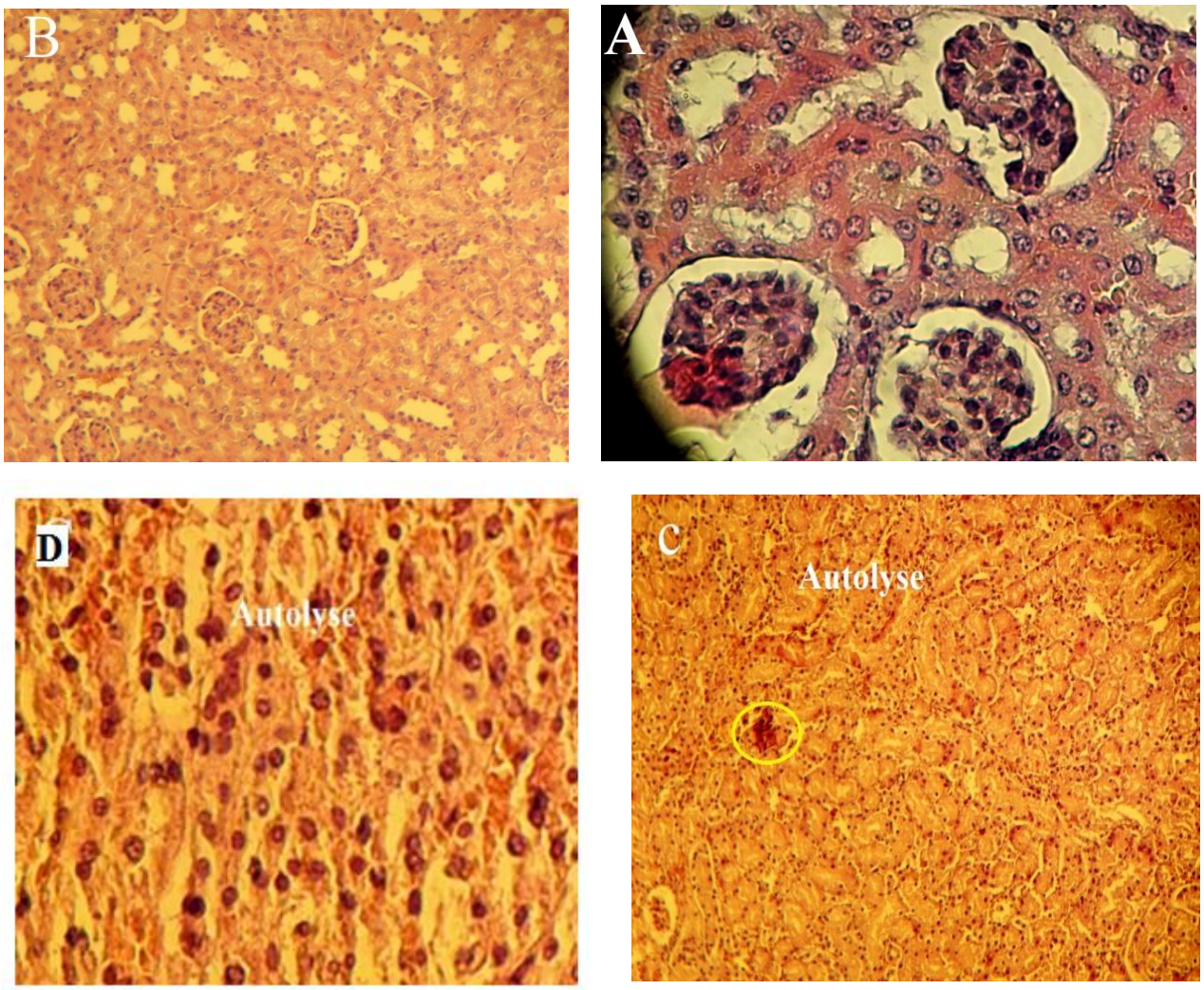
شكل 81. تأثير المستخلص المائي لثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكلى للفئران المختبرة مدة 14 يوم : A نسيج الكلى الشاهد، B نسيج في جرعة 2غ/كغ من المستخلص المائي للثمار ، C نسيج في الجرعة 2غ/كغ من المستخلص المائي للجزء الهوائي.التكبير 40× و100 ×.

أما فيما يخص المقاطع النسيجية للكبد بالنسبة للمستخلص المائي للثماربجرعة 5غ /كغ كما يظهر في الشكل(B 82) ظهوراحتقان دموي كبيرخاصة في الوريد المركزي والبابي(espace porte) مع ابيضاض لبعض الخلايا الكبدية خاصة في المحيط، أما المستخلص المائي للجزء الهوائي بجرعة 5غ/كغ شكل(82 C،D) تميزالمقطع بظهور مواقع للإحتقان الدموي كبيرمع وجود مواضع ممتدة من النكرزة.



شكل 82. تأثير المستخلص المائي للثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكبد للفئران المختبرة مدة 14 يوم : A نسيج كبد الشاهد، B نسيج في جرعة 5غ/كغ من المستخلص المائي للثمار ، C وd نسيج في الجرعة 5غ/كغ من المستخلص المائي للجزء الهوائي.التكبير 40× و100 ×.
الحلقات الزرقاء :إحتقان دموي(congestion)، الحلقات الصفراء:نخر أو نكرزة(nécrose).

أما فيما يخص المقاطع النسيجية للكلى بالنسبة للمستخلص المائي للثماربجرعة 5غ /كغ كما يظهر في الشكل(83B) أن بنية النسيج البرانشيمي محفوظة أي ظهور عادي لنسيج الكلية، أما في جرعة 5غ/كغ للمستخلص المائي للجزء الهوائي فكان الأثر كبير وواضح حيث كانت بنية النسيج متغيرة و ميزنا انحلال ذاتي لخلايا الكلية (autolyse) مع ظهور بعض مواقع النكرزة كما يظهر في شكل (C وD83) .



شكل 83. تأثير المستخلص المائي للثمار والجزء الهوائي لنبات *Aristolochia longa*L. على نسيج الكلى للفئران المختبرة مدة 14 يوم : A نسيج الكلى الشاهد، B نسيج في جرعة 5غ/كغ من المستخلص المائي للثمار ، C وDنسيج في الجرعة 5غ/كغ من المستخلص المائي للجزء الهوائي.التكبير 40× و100 ×.
الحلقات الصفراء:نخر أو نكرزة(nécrose)، Autolyse: انحلال ذاتي للخلايا.

من خلال هذه الدراسة نستنتج بالنسبة للمستخلص المائي لدرنات *Aristolochia longa*L. كان له تأثير على نسيج الكلى والكبد لكن خاصة في الجرعة الرابعة (8غ/كغ) والجرعة الخامسة (12غ/كغ) التي تتميزبوجود مواضع نكرزة واحتقان دموي بالنسبة لخلايا الكبد وكذلك اتساع في أنابيب الكلية وانكماش في الكبيبات لكن مع هذا لم نسجل أي حالة وفاة للفئران المختبرة بقيت عادية جدا من ناحية المظهر والسلوك لمدة 14 يوم مدة التجربة، وهكذا نستنتج أن الجرعة القاتلة لـ 50% (DL_{50}) بالنسبة للمستخلص المائي للدرنات تفوق 12غ/كغ وهذا ما يجعلنا نستطيع أن نصنف المستخلص المائي للدرنات يكون تقريبا غيرسام أو غيرضارنسبيا حسب سلمHodge et Sterner .

أما فيما يخص الجرعة 2غ/كغ و5غ/كغ للمستخلص المائي للثمارحسب المقاطع النسيجية للكبد والكلى فلم يكن أثركبير أو مضر، هذا مايفسر بقاء الفئران بحالة جيدة طيلة مدة التجربة 14 يوم وحسب الملحق 2d والملحق 3 لـ OCDE رقم 423 حددت قيمة DL_{50} بـأكبرمن 5000 مغ/كغ< وحسب سلم Hodge et Sternerيصنف هذا المستخلص على أنه تقريبا غيرسام. أما فيما يخص الجرعة2غ/كغ للمستخلص المائي للجزء الهوائي فكان الأثر غير مضرحيث تميز مقطع نسيج الكلية عادي ونسيج الكبد تضمن بعض مواضع للإحتقان، لكن بالنسبة لجرعة 5غ/كغ فكان لها تأثيرمضر على نسيج الكلية حيث حدث فيها انحلال ذاتي لخلايا الكلية وظهوراحتقان دموي مهم ومواضع نكرزة متسعة وهذا ما أدى إلى موت الفئران بعد 24 ساعة من حقن المستخلص، ومن هذه الدراسة نستنتج بأن الكلى تكون أكثر تأثرا من الكبد عند تناول هذا النبات. وحسب الملحق 3 لـ OCDE فإنه إذا توفي الفأر الأول بعد حقن جرعة 5غ/كغ فإنه يجب اكمال العلاج بـ 2غ/كغ وحسب الملحق 2d لـ OCDE رقم 423 الذي حدد نظام التصنيف العام المتوافق (Systéme de classification globalement harmonisé)(SGH) حيث تم تصنيف المستخلص المائي للجزء الهوائي في صنف 5 الجرعة تكون 2000-5000 مغ/كغ< وحددت قيمة DL_{50} بـ 5000مغ/كغ. و هكذا حسب سلم Hodge et Sterner أن المستخلص المائي للجزء الهوائي قليل السمية.

توافقت نتائج دراستنا بالنسبة للمستخلص المائي للدرنات مع دراسة .Benzakour et al(2011) حيث لم يحدث أي ضرر على الفئران المختبرة أثناء السمية الحادة بتركيز 2,5 غ/كغ، لكن نتائج السمية شبه حادة في نفس التركيز(2,5غ/كغ) كان لها تأثيرسلبي على صحة الفئران، وأثبتت التحاليل البيوكيميائية لكل من ALAT وASAT والكرياتينين قد ارتفعت نسبتها مقارنة مع نسبة الشاهد وهذا دليل على تأثر كل من وظائف الكلى والكبد في التراكيز العالية، حيث لم يحدث أي أثرسلبي على كل من الكبد والكلى في تركيز أقل من 1,25 غ/كغ. كما كانت جرعة 5غ/كغ للمستخلص المائي لدرنات نبات *Aristolochia* longa L. آمنة عند تقديمها للفئران حسب نتائج السمية الحادة المدروسة من طرف .Benraba et al(2012).

كذلك درس .Cherif et al (2014) السمية الحادة لهذا النبات على الفئران بجرعات من 1إلى 5غ/كغ عن طريق الفم وصنف هذا النبات على أنه غير سام أوقليل السمية عند الجرعة الواحدة. كما أكد Bruneton (2005) أن جنس *Aristolochia* لا يسبب أي حالات تسمم عند الإنسان أوالحيوان، ويكون تسمم الحيوانات

نادروبذلك تشكل هذه النباتات خطورة بشكل خاص فقط عند تناولها على مدى فترة طويلة، كما تسبب أمراض تصيب الكلى (Cherif et al., 2014)، وهذا ما أكدته دراستنا ودراسات عديدة منها دراسة السمية شبه فورية لمدة 28 يوم من طرف Benzakour et al. (2011) و كذلك دراسة السمية شبه حادة من طرف Cherif et al. (2014) التي تؤكد انخفاض في وزن الفئران وارتفاع في مستوى الكرياتينين و اليوريا وهذه الزيادة تتناسب طرديا مع الجرعات المقدمة للفئران حيث لم يلاحظ تأثير كبير عند الجرعة 1,5غ/كغ عكس الجرعة 2,5 و3,5غ/كغ .

لاحظ Mridulla et al.(2011) في دراسته للسمية الحادة لمستخلصات الكحولية لأوراق نبات *Aristolochia indica* L. موت الفئران المختبرة عند جرعة 10غ/كغ. أما في السمية شبه المزمنة فقد لوحظ ارتفاع في تحاليل كل منASAT وALT، البروتينات، الكرياتينين، اليوريا لكن حمض اليوريك فقد إنخفض مقارنة مع الشاهد، حيث يؤدي ارتفاع في نسبة كل من الـ ASAT وALT إلى مرض التليف الكبدي، الالتهاب الكبدي الفيروسي، اليرقان الإنسدادي ومرض السرطان، أما الزيادة في نسبة كل من الكرياتينين واليوريا فهي نتيجة لنقص في الوظائف الكلوية وزيادة في تحطم الأنسجة .

الخاتمة

على حد علمنا فإن كل من الدراسة الإثنوطبية، التشريحية والبيولوجية لنبات *Arisolochia longa* L. لم تدرس بعد على مستوى جامعة فرحات عباس بولاية سطيف و المعطيات الممثلة في هذه الدراسة يمكن اعتبارها الأولى من نوعها. ونحن نعتقد أن هذا العمل سيساهم في اكتشاف خصائص هذا النبات.

ركزت هذه الدراسة في بداية الأمر على معرفة مدى استعمال سكان منطقة سطيف لهذا النبات عن طريق القيام بتحقيق ميداني الذي كانت نتيجته أن 50% فقط من الفئة المستجوبة تعرفت على هذا النبات، كما أظهرت الدراسة التشريحية التي أجريت على كل من الدرنة،الساق وأوراق هذا النبات أن الدرنة هي درنة جذر، أما السيقان والأوراق فلديها البنية النموذجية للنباتات ثنائية الفلقة. بالنسبة للدراسة الكيميائية لهذا النبات فقد أظهرت تركيب كيميائي غني ومتنوع من المستقلبات الثانوية أين وجدنا الفينولات الكلية، الفلافونوييدات، مواد الدباغة، التربينوييد، القلويدات،الصابونين. تقدير كل من عديدات الفينول، الفلافونوييدات، الفلافون والفلافونول ومواد الدباغة أظهر تفاوت في القيم بين مختلف المستخلصات لمختلف أجزاء النبات، وقد أظهر المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي أكبر قيمة من عديدات الفينول µg (525,43 ±29,6 /مغ)، أما المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي فقد أظهر أكبر نسبة من الفلافونوييدات (52, 37 ±0,94 µg /مغ)، أما مواد الدباغة فأظهر المستخلص الميثانولي للدرنات أكبر نسبة (206,93 ±4,61 µg /مغ). النشاطية المضادة للأكسدة لمختلف مستخلصات النبات تم تقييمها بثلاث طرق مختلفة، إلتقاط مباشر للجذور الحرة بطريقة إزاحة جذرDPPH ، القدرة على الإرجاع و اختبارابيضاض المركب الـβ- Carotène ، كشفت النتائج عن النشاطية المضادة للأكسدة لكل المستخلصات، أكبرقدرة لإزاحة جذر الـDPPH حققها المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي بـ IC50 تقدر55,04 ± 1,29 µg /مغ حيث كانت هذه القيمة قريبة من IC50 قيمةلـ BHT 42,85 ± 0,15 µg /ملل، كما حقق نفس المستخلص أكبر قوة إرجاع بقيمة 0,200 ± 0,019 مغ/ملل أما الكرستين و BHA فقدرت EC50 بـ 0,053 مغ/ملل لكل منهما. لكن ابيضاض الـβ- Carotène بعد 60 دقيقة من الحضن مع حمض لينولييك قد ثبط بفعالية عند إضافة المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي، هذا المستخلص قام بدور الحافظ بنسبة 57 ± 1,79% مقارنة مع الـ BHA الذي حقق أعلى نسبة(84 ± 5,45%).

أظهر إختبار النشاطية البكتيرية لكل مستخلصات نبات *Aristolochia longa* L. أنها كانت فعالة ضد واحدة أو أكثر من البكتيريا المختبرة إلا المستخلص المائي للدرنات فلم يكن له أي تأثير على كل الأنواع البكتيرية المختبرة، عكس المستخلص الميثانولي للثمار الذي أظهر فعالية جيدة على كل الأنواع البكتيرية المختبرة حيث قدر التركيز الأدنى المثبط(CMI) لكل من *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 بـ 3,125مغ/ملل وبـ 6,25 مغ/ملل بالنسبة لبكتيريا *Bacillus cereus* ATTC10876

أما *Escherichia coli ATCC25922* لم تثبط من طرف كل المستخلصات النباتية، يمكن أن نقترح أن هذه المستخلصات لم يكن لها أي تأثيرعلى جدار هذه البكتيريا.

في حين لم نلاحظ أي تأثير لهذه المستخلصات على الفطريات المختبرة *Aspergillus flavus* NRRL 391، *Aspergillus niger* 2CA 936 والخميرة *Condida albicans* ATCC1024.

إضافة إلى النشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا، فقد قمنا بتقدير النشاطية المضادة للإلتهاب وذلك بتحديد نسبة تثبيط تخريب البروتينات، أين أظهرت كل المسخلصات نسب متفاوتة لتثبيط عملية تخريب البروتينات، لكن المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي حقق أكبر نسبة تثبيط قدرت بـ 78,35±6,18% قريبة من نسبة التثبيط المحققة من طرف الدواء ديكلوفيناك الصوديوم 85,56± 1,78% في نفس التركيز500 µg /ملل،حيث لم يكن هناك فرق معنوي بينهما.

في الأخير، نظرا لاستعمال نبات الـ *Arisolochia longa* L. في علاج بعض الأمراض خاصة مرض السرطان حسب نتائج التحقيق الذي قمنا به، فقد إرتأينا دراسة السمية الحادة لهذا النبات على فئران المخبرالمقدمة من طرف معهد باستور بالجزائر العاصمة لمدة 14 يوما، وذلك باستعمال المستخلص المائي لكل من الدرنات، الجزء الهوائي والثمار. بينت النتائج في حالة استعمال المستخلص المائي للدرنات في جرعات مختلفة جرعة 1 (2غ/كغ)،جرعة 2(4 غ/كغ)،جرعة 3(6 غ/كغ)،جرعة 4(8غ/كغ)،وجرعة 5(12غ/كغ)، لم نسجل أي حالة وفاة،وتم إستنتاج أن الجرعة القاتلة لـ 50% (DL_{50}) بالنسبة للمستخلص المائي للدرنات تفوق 12غ/كغ وهذا ما يجعلنا نستطيع أن نصنف المستخلص المائي للدرنات يكون تقريبا غيرسام أو غيرضارنسبيا حسب سلمHodge et Sterner . أما فيما يخص الجرعة 2غ/كغ و5غ/كغ للمستخلص المائي للثمارفقد حددت قيمة DL_{50} بـأكبرمن 5000 مغ/كغ< حسب OCDE رقم 423 وحسب سلم Hodge et Sterner يصنف هذا المستخلص على أنه تقريبا غيرسام. أما فيما يخص الجرعة2غ/كغ للمستخلص المائي للجزء الهوائي فكان الأثر غير مضر، لكن بالنسبة لجرعة 5غ/كغ فكان لها تأثير مضر مما أدى إلى موت الفئران بعد 24 ساعة من حقن المستخلص ومنه حددت قيمة DL_{50} بـ 5000مغ/كغ حسبOCDE رقم 423. و هكذا حسب سلم Hodge et Sterner أن المستخلص المائي للجزء الهوائي قليل السمية. بالنظرإلى التحاليل البيوكيميائية الخاصة بالكبد(ASTوALT) والخاصة بالكلى اليوريا(urée) و كرياتين(créate)تبين أن هناك اضطراب في العوامل البيوكيميائية خاصة في الجرعات الكبيرة.

هذه النتائج تجعلنا نقترح أن هذا النبات له تأثير على الكلى والكبد في التركيز الكبير بالنسبة للثمار و الجزء الهوائي (5غ/كغ) وكذلك عند التركيز 12 غ/كغ بالنسبة للدرنات.

النتائج البيوكيميائية (اضطراب العوامل البيوكيميائية) نأكدها بنتائج الفحص النسيجي لكل من الكلى والكبد حيث تدل مقاطع الأنسجة على تأثر كل من أنسجة الكبد والكلى خاصة عند الجرعات العالية.هذه النتائج تجعلنا نقترح أن هذا النبات له تأثير على الكبد وخاصة الكلى في الجرعات ذات التركيز الكبير.

استنتجنا من هذه الدراسة أن هذا النبات *Aristolochia longa* L. لديه نشاطية بيولوجية هامة، قد ترجع إلى محتواه من المركبات النشطة الفعالة، طبيعتها،كميتها، بنيتها، وكل التفاعلات الجزيئية التي تتعاون لزيادة وتحسين هذه النشاطية، هذه الدراسة تقترح أن فعالية المستخلصات النباتية لا تعتمد فقط على كمية المركبات الفعالة التي تحتويها وإنما على نوعيتها، نوعية المذيب المستعمل في عملية الإستخلاص والجزء النباتي المدروس. كما استنتجنا أن سمية النبات تتناسب طرديا مع الجرعة المأخوذة، وأن نبات *Aristolochia longa* L. غيرسام بالنسبة للدرنات والثمار، وقليل السمية بالنسبة للجزء الهوائي.

في الأخيرونظرا للنتائج التي تحصلنا عليها في هذه الدراسة والتي تكشف عن خصائص نبات *Aristolochia longa* L. التي تسمح باستعماله في المجال الطبي، فمن ضروري القيام بأبحاث معمقة مثل:

1- عزل وتحديد المركبات الفعالة الموجودة في مستخلصات هذا النبات.
2- دراسة النشاطية المضادة للالتهاب على الفئران.
3- دراسة السمية المزمنة لهذا النبات.
4- استخلاص الزيت الأساسي لهذا النبات ودراسة نشاطه البيولوجي.
5- دراسة إمكانية استعمال هذا النبات في علاج مرض السرطان(النشاطية المضادة للسرطان).

المراجع

المراجع باللغة العربية

أحمد محمد هاشم أحمد 1996 . علم النبات . دار النشر هلا بوك شوب، 71 صفحة.

الباز محمود، الناغي محمد، عامر وفاء، مباشر محمد هاني، عبد الظاهر هاني 2008. أساسيات علم النبات العام. الطبعة الأولى، مطبعة الدار العربية للكتاب، مصر،492 صفحة.

بوغديري العربي 2000. دروس و تطبيقات في علم النبات. ديوان المطبوعات الجامعية، الجزائر،210 صفحة.

جبر محمود محمد، كامل إسماعيل محمد، شبانة عفت فهمي2001. أساسيات علم النبات العام، الشكل الظاهري و التركيب التشريحي تقسيم المملكة النباتية، وظائف أعضاء النبات. الطبعة الأولى، دار الفكر العربي، القاهرة، 579 صفحة.

حمزة علي منصور 2006. النباتات الطبية العالمية (وصفها، مكوناتها،طرق استعمالها وزراعتها.دار النشر منشأة المعارف جلال حزى وشركاه، الإسكندرية، 403 صفحة.

حليمي عبد القادر1997. دليل النباتات الطبية في الجزائر. الوكالة الوطنية لحفظ الطبيعة (A.N.N)، الاتحاد العالمي لحفظ الطبيعة(I.U.C.N). وزارة الفلاحة والصيد البحري، 290 صفحة.

المراجع بالغة الأجنبية

Abdel-Warith, A. A., Younis, E. M., Al-Asgah, N. A., Wahbi, O. M., 2011. Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia,*Oreochromis niloticus*. Scientific Research and Essays 6(17), 3760-3769.

Ait El Cadi, M., Makramb, S.,Ansarc, M., Khabbala, Y., Alaouia, K. , Faouzia, M.A., Cherraha, Y. ,Taoufikc, J., 2012. Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. Annales Pharmaceutiques Françaises 70, 113—116.

Akhila,S. J., Deepa, S., Alwar, M.C., 2007. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. Current Science 93(7), 917 – 920.

Akindele, A.j., Adeneye, A. A., Salau, O. S., Sofidiya, M. O., Benebo, A. S., 2014. Dose and time-dependentsub-chronic toxicity study of hydroethanolic leaf extract of *Flabellaria paniculata* Cav.(Malpighiaceae) inrodents. Ethnopharmacology5(78),1-11.

Alali,F.Q., Tawahab,K., Shehadehb, M.B., Telfaha,S., 2006. Phytochemical and Biological Investigation of *Aristolochia maurorum* L. .Zeitschrift für Naturforschung 61c,685-691.

Alam, Md. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, Md., 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal 21, 143–152.

Alamgeer, Akhtar, M. S., Jabeen, Q. , Akram, M.,Khan, H. U., Karim, S., Malik, M. NH. Mushtaqand, M. N., Salma, U., 2013. Antihypertensive Activity of Aqueous-Methanol Extract of Berberis Orthobotrys Bien Ex Aitch in Rats.Tropical Journal of Pharmaceutical Research June 12 (3), 393-399.

Albano ,S. M., Miguel ,M.G., 2011. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. Industrial Crops and Products. 33, 1-6.

Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., Shahidi, F. (2005). Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, caroténoids, and phenolics of three native fresh and sundrieddate (*Phoenix dactylifera L*.) Varieties grown in Oman. *J. Agric .Food .Chem.* 53,7592-7599.

Alhakmani, F., Kumar,S., Khan,S.A., 2013. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3(8),623-627.

Allen, C.M., Smith, A.M., Clinton, S.K., Schwartz, S.J. 2002. Tomato Consumption Increases Lycopene Isomer Concentrations In Breast Milk and Plasma Of Lactating Women. J. Am. Diet. Assoc. 102, 1257–1262.

Al-zoreky, N. S., Al–Taher, A. Y., 2015. Antibacterial activity of spathe from Phoenix dactylifera L. against some food-borne pathogens. Industrial Crops and Products 65 , 241–246.

Amala Hazel, A.M , Pattarayan,R. , Banumathy, V., 2016. Acute and sub-acute (28-days) oral toxicity studies of *Eraippu noi chooranam.* International Journal of Advanced Research in Biological Sciences3 (6), 106-112.

Amiot, M. J., Riollet, C., Landrier, J. F., 2009. Polyphenols et syndrome metabolique. Médecine des maladies Métaboliques 3(5), 476 -482.

Angalaparameswari, S., Mohamed Saleem, T.S., Alagusundaram, M., Ramkanth, S., Thiruvengadarajan, V.S., Gnanaprakash, K., Madhusudhana Chetty, C., Pratheesh, G., 2011. Anti-microbial Activity of Aristolochic Acid from Root of *Aristolochia bracteata* Retz. World Academy of Science, Engineering and Technology. 57, 1017-1020.

Archana, R.J., Madhulika,V., 2010. Hepatoregenerative effect of *Nyctanthes arbortristis* Linn. on acetaminophen induced oxidative damagein rats. International Journal of PharmTech Research 2(2), 1291-1297.

Archivo,M.,Filesi,**C., Di Benedetto**,**R., Gargiulo,R.,2007.**Polyphenols,dietary sources and bioavailability. Ann Ist super sAnItà 43(4), 348-361.

Arif, A., Howlader, Md. S. I, Dey, S. K., Hira, A., Hossain, Hira, A., Hossain, Md. H., Uddin, M.M. N., 2013. Phytochemical screening and antibacterial activity of different fractions of *Operculina turpethum* root and leaf. Am. J. Sci. Ind. Res., 4(2), 167-172.

Baba aissa,F.,2011. Encyclopédie des plantes utiles,Flores méditerranéenne (Maghreb,Europe méridionale).Substances végétales d'Afrique, s'orient et d'occident. Edition el Maarifa ,471 P.

Balick, M., Arvigo, R., 1998. The Rainforest. Lotus Press, New York.

Barros,L., Ferreira , M. J., Queiros,B., Ferreira , I. C.F.R. , Baptista, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chemistry, 103, 413–419.

Bate-Smith E.C.,1973. Haemanalysis of tannins, the concept of relative Astringency. *phytochemistry,* **12**, 907-912.

Bearnais-Barbry, S.,2001. Etude de la photoréactivité de la méthoxy-p-quinone et de phényl-p-benzoquinones en solution. These de doctorat, Ecole doctorale des sciences chimiques, Université de Bordeaux I, France.

Belaiche, P.,1979. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie.T1, Edition Maloine S.a.,Paris,915p.

Belhattab, R.,Larous, L.,Kalantzakis ,G., Boskou,D., Exarchou ,V.,2004. Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf.extracts.Food,Agriculture & Environment .2 (1),69 -73.

Belhattab, R., 2007. Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et anti-aflatoxinogene d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf.et *Marrubium vulgare* L (familledes Lamiaceae). Thèse de doctorat d'état. Dépt. Biologie, UFA Setif.

Benarba,B., ambroise,G., Aoues,A., Meddah, B. , Vazquez,A.,2012 . *Aristolochia longa* aqueous extract triggers the mitochondrial pathway of apoptosis in BL41 Burkitt's lymphoma cells. International Journal of Green Pharmacy 6, 45-9.

Benarba, B., Meddah,B., Tir Touil,A., 2014. Response of Bone Resorption Markers to *Aristolochia longa*Intake by Algerian Breast Cancer Postmenopausal Women. Advances in Pharmacological Sciences ID 820589, 1-4.

Benarba, B., Meddah,B., 2014. Ethnobotanical study, antifungal activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa.* J Intercult Ethnopharmacol.3(4),150- 154.

Ben Hadda, T., Charrouf Z., Masand V., 2011. A la Recherche des Sites Pharmacophores des Saponines extraites d'Argania spinosa :POM, un Moyen Bioinformatique Efficace,Economique et Rapide pour Prédire et Optimiser l'Activité Biologique des Saponines. Actes du Premier Congrès International de l' Arganier 195- 202.

Ben Mansour,M., Balti,R., Rabaoui,L., Bougatef,A., Guerfel,M., 2013. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory,antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiva* Rob. Lamiaceae. Process Biochemistry 48, 723–729.

Benzakour, G., Benkirane,N., Amrani,M., Oudghiri,M., 2011. Immunostimulatory potential of *Aristolochia longa* L.induced toxicity on liver, intestine and kidney in mice. Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences 3(8), 214-222.

Benzakour,G., Amrani,M., Oudghiri1,M., 2012. A Histopathological Analyses of in vivo Anti-tumor Effect of an Aqueous Extract of Aristolochia longa Used in Cancer Treatment in Traditional Medicine in Morocco. International Journal of Plant Research 2(2), 31-35.

Berger, M. M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant:état des connaissances. Nutrition clinique et métabolisme 20 , 48–53.

Bhatt, P., Negi, P.S., 2012. Antioxidant and antibacterial activities in the leaf extracts of Indian Borage (Plectranthus amboinicus). Food Nutr. Sci. 3, 146–152.

Bliss, J. B., Landherr, L., dePamphilis, C. W., Ma, H., Hu, Y., Maximova, S. N., 2009. Regeneration and plantlet development from somatic tissues of Aristolochia fimbriata. Plant Cell. Tiss. Organ. Cult. 98,105–114.

Bliss, B.J., Wanke, S., Barakat, A., Ayyampalayam, S.,Wickett, N.,Wall, P. K., Jiao, Y., Landherr, L., Ralph, P. E., Hu, Y.,Neinhuis, C., Leebens-Mack,J., Arumuganathan, K., Clifton, S,W., Maximova, S. N., Ma, H.,dePamphilis, C. W., 2013. Characterization of the basal angiosperm Aristolochia fimbriata: a potential experimental system for genetic studies. BMC Plant Biology 13(13),1-25.

Bohm, F., Tinkler, J.H., Truscott, T.G., 1995. Carotenoids Protect Against Cell Membrane Damage by The Nitrogen Dioxide Radical. Nature Med. 1, 98–99.

Bossard, R., cuisance, P.,1977. Botanique et Techniques Horticoles. 4ème édition Ed. j.-B. Baillière, paris, 302P.

Bougandoura,N., Bendimerad,N. 2013. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technologie.9, 14-19.

Bougatef,A., Hajji,M., Balti,R., Lassoued,I., Triki-Ellouz,Y., Nasri ,M.,2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases.
Food Chemistry 114, 1198–1205.

Bruneton, J., 1999.Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème édition Ed.Tec et Doc. Lavoisier, Paris ,1120p.

Bruneton, J. 2005. Plantes toxiques: végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Edition Tec & Doc. Lavoisier, 618 p.

Bruneton, J. ,2009. Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales. 4ème édition Ed. Tec & Doc. Lavoisier,Paris, 1292 P.

Camporese, A., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Morsellino, N., De Simone, F., Tubaro, A.,2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology. 87, 103–107.

Chamba, J.F., Prost, F., 1989. Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite. Lait 69,417 -431.

Chen, Z.-L., Zhu, D.-Y., 1987. Aristolochia alkaloids. In: Brossi, A.(Ed.). The Alkaloids, vol. 31. Academic Press, London, pp. 29- 65.

Cherif,H.S.,Saidi,F.,Boutoumi,H.,Rouibi,A.,Chaouia,C.,2009. Identificatioet caractérisation de quelques composés chimiques chez *Aristolochia longa* L. Agricultura- Ştiinţă şi practicã.3-4,76-82.

Cherif, H.S.,Saidi, F.,Guedioura, A., 2014. Toxicological evaluation of Aristolochia longa L.extract in mice. Indian Journal of Applied Research (5), 26-30.

Chinedu, E., Arome, D., Ameh, FS., 2013. A new method for determining acute toxicity in animal models. Toxicology International 20(3), 224-226.

Chinedu,F.A., Utoh-Nedosa,Au., Onyegbule,AF.,chinasa,C .E.,2013. Preliminary Phytochemical Studies and Evaluation of Antimicrobial Property of the Methanol Extract of the Roobark of *Ritchiea longipedicellata* Gilg Family *Capparidacaea*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 1(6), 6-13.

Choubert,G., 1986. Pigments caroténoides et reproduction des poissons. Bull. Fr. Pêche Piscic. 3 0 0, 2 5 – 32.

Coulidiati, T.H., Millogo-Koné, H., Lamien-Méda, A., Lamien, C.E., Lompo, M.,Kiendrébéogo, M., Bacasso, M., Yougbaré-Ziébrou, M., Millogo-Rasolodimby, J.,Nacoulma, O.G., 2009. Antioxidant and antibacterial activities of Combretumnioroense Aubrév. Ex Keay (Combretaceae). Pak. J. Biol. Sci. 3, 264–269.

Cowan,M.M.,1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical microbiology reviews 12(4), 564–582.

Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15, 7313–7352.

DE Groot,H., Wanke, S., Neinhuis,C., 2006. Revision of the genus *Aristolochia* (Aristolochiaceae) in Africa, Madagascar and adjacent islands. Botanical Journal of the Linnean Society 151, 219–238.

DE Pascual,T.,Urones, J.G.,Fernandez,A. ,1983. An Aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa*.Phytochemistry 22(12),2745 – 2747.

Debelle, F. Vanherweghem, J.-L., Nortier, J., 2009. Néphropathie aux acides aristolochiques :de l'observation clinique au modèle expérimental.Flammarion médecine-sciences – actualités néphrologiques, Université Libre de Bruxelles, Belgique, 187 – 200. (www.medecine.flammarion.com)

Delilli,L.2007. Les plantes médicinales d'Algérie.Edition Berti,Alger,240 P.

Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., Zhao, Y., 2014. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. Food Control 38, 184-191.

Dini,I., Schettino,O., Simioli ,T., Dini, A.,2001. Studies on the constituents of Chenopodium quinoa seeds: isolation and characterization of new triterpene saponins. J. Agric. Food Chem. 49,741-746.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi,B.,Maamri,S.,Djireb,F., Stocker, P., 2006. Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry .21(6), 719–726.

Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., Stocker, P., 2010. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from Cleome arabica in screening the in

vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Food and Chemical Toxicology .48, 2599–2606.

Doat,J.,1978. Les tanins dans bois tropicaux,Revue bois et forets des tropiques 182,37-54.

Duan, x-j., Zhang, W-W., Li, X-M., Wang,B-G.,2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, Polysiphonia urceolata. Food Chemistry 95, 37–43.

Duraipandiyan. V, Ignacimuthu, S., 2011. Antifungal activity of traditional medicinal plants from Tamil Nadu,India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine S204-S215.

Eloff, J.N., 1998. Which extractant should be used for screening and isolation o antimicrobial components from plants? J. Ethnopharmacol. 60, 1–8.

Epa, C.,, Elion Itou, R.D.G., Etou Ossibi, A.W., Attibayéba, Ongoka, P. R., Abena Ange, A.,2015. Effet anti-inflammatoire et cicatrisant des extraits aqueux et éthanolique des écorces du tronc de Buchholzia coriacea Engl. (Capparidaceae). Journal of Applied Biosciences 94,8858 – 8868.

Euro+Med,2016. Euro+Med plantbase .The information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Published on the internet. http:www2.bgbm.org/EuroPlusMed/.

Friedel, M. J., 1921. Relation entre l'anatomie de la fleur et celle de la tige chez deux Aristolochiées, l'Asarum europæum L. et l'Aristolochia Clematitis L., Bulletin de la Société Botanique de France 68(4), 538-543.

Gadhi ,C.A., Weber , M. , Mory , F. , Benharref , A. Lion , C. , Jana, M.,Lozniewski, A., 1999. Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel.Journal of Ethnopharmacology. 67, 87–92.

Garrod, L.P., Lambert, H.P., O'Gray, F., 1995. Antibiotics and Chemotherapy, FourthEd. Churchill: Livingstones, Edinburgh, London, and New York.

Gathwan, K. H., Al Ameri, Q. M. A., Zaidan, H. K., Al Saadi, A. H., Ewadh, M.J.,2012. Heavy metals induce apoptosis in liver of mice. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 3(2) , 146-150.

Genest,L.,2013. Echec au cancer (guide des aliments protecteurs). Edition Les Presses de l'Université Laval (PUL), Canada,535P.

Ghasemzadeh,A., Ghasemzadeh,N., 2011. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Journal of Medicinal Plants Research 5(31), 6697-6703.

Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie 4, 162-169.

Ghourri, M., Zidane,L., Douira,A ., , 2013. Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan -Tan). Journal of Animal &Plant Sciences17(1**:** 23), 88- 2411.

Gilles, L., 2004. Notions de toxicologie. 2ème edition Ed. Québec, Canada, 67P.

Gorenflot, R., 1997.Biologie végétale: Plantes supérieures : appareil reproducteur 4ème édition Ed. Masson, Paris, 278P.

Goze, I., Alim, A., Tepe, A. S., Sokmen, M ., Sevgi, K.,Tepe, B., 2009. Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. From Turkey. Journal of Medicinal Plants Research. 3(4), 246-254.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27, 1–93.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P., 2007. Le stress oxidant. Rev. Med. Liege 62(10), 628-638.

Hashimoto, K., Higuchi, M.,Makino, B., Sakakibara, I., Kubo, M., Komatsu, Y.,Maruno, M., Okada, M., 1999. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds,contained in some medicinal plants. Journal of Ethno pharmacology. 64, 185–189.

Hayek, S.A., Ibrahim, S.A., 2012. Antimicrobial activity of Xoconostle pears(Opuntia matudae) against Escherichia coli O 157:H7 in laboratory medium. Int.J. Microbiol., 1–6.

Hayouni, E.A., Abedrabba Bouix, M., Hamdi, M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phenolicea L. fruit extracts. Food Chem. 105, 1126–1134.

Heinrich, M., Chan, J., Wanke, S., Neinhuis, C., Simmonds M. S.J., 2009. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. Journal of Ethnopharmacology 125, 108–144.

Hemalatha,M., Thirumalai,T., Saranya, R., Elumalai, E.k., David,E., 2013. A review on antimicrobial efficacy of some traditional medicinal plants in Tamilnadu. Journal of Acute Disease 99-105.

Hinou, J., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., 1990. Cytotoxic and anti-microbial principles from the roots of *Aristolochia longa*. International Journal of Crude Drug Research 28, 149–151.

Hobou, D., Fofié, N., N'Guessan, K.,koné,D., 2011. Evaluation de la toxicité de Stachytarpheta indica chez la souris. J. sci. pharm. biol. 12 (1), 6-12.

Hutchinson,J., Dalziel, JM., 1927. Aristolochiaceae. In: *Flora of west tropical Africa*.Vol. 1. Edition Crown Agents, London ,PP 75–78.

Iburg, A., 2006. Les plantes médicinales:ingrédients,propriétés,utilisations.Edition Gründ, Paris, 284p.

Ifeoma, O., Oluwakanyinsola,S., 2013. Screening of Herbal Medicines for Potential Toxicities(Chapter 4), 63 – 88 IN : New Insights into toxicity and drug Testing. Edition Sivakumar Gowder, Publisher :Intech, 252 p.

Ioset, J.-R., Raoelison, G.E. , Hostettmanna, K., 2003. Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. Food and Chemical Toxicology 41, 29–36.

Jayathilake, C., Rizliya, V., Liyanage, R., 2016. Antioxidant and free radical scavenging capacity of extensively used medicinal plants in Sri Lanka. Procedia Food Science 6, 123 – 126.

Kabbaj, F-Z., Meddah,B., Cherrah,Y., Faouzi,M-E.A., 2012. Ethnopharmacological profile of traditional plants used in Morocco by cancer patients as herbal therapeutics. Phytopharmacology 2(2) ,243-256.

Kabran,G.R., Mamyrbekova-Bekro,J.A.,Pirat,J., Bekro,Y., Sommerer,N., Verbaere, A., Meudec, E., 2014. Identification de composés phénoliques extraits de deux plantes de la pharmacopée ivoirienne. J. Soc. Ouest-Afr. Chim. 038, 57 – 63.

Kar,B., Kumar,RB.S., Karmaka,I., Dola,N., Bala,A., Mazumder,U.K., Hadar,P.K., 2012. Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of Mimusops elengi leaves.Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine S976-S980.

Khaled-Khodja,N., Boulekbache-Makhlouf,L., Khodir Madani,K., 2014. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae.Industrial Crops and Products 61 , 41–48.

Khoth H.W., 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Edition Terres, Toulouse,336p.

Kim, D.O., Lee, C.Y., 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. Crit. Rev. Food Sci Nutr.44,253–273.

Koruthu, D. P., Manivarnan, N. K., Gopinath, A., Abraham., R., 2011. Antibacterial evaluation ,reducing essay and phytochemical screening of *Moringa oleifera* extracts :effect of solvent polarity**.** I.J.P.S.R. 2(11), 2991-2995.

Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak,S. ,Vladimir-Knez ,EICS., 2004. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia.*Acta Pharm.*54, 65-72.

Krishnaiah,D., *Sarbatly,R., Nithyanandam,R.*, 2 0 1 1. A review of the antioxidant potential of medicinal plant Species. food and bioproducts processing 8 9, 217–233.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M.,2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry 85, 633–640.

Kumar,V.P., Chauhan,N.S., Padh,H., Rajani, M., 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 107 , 182–188.

Laberche, J.C., 2010.Biologie végétale. 3ème édition Ed.Dunod,Paris, 305 P.

Lahsissene H., Kahouadji, A., Tijane, M., Hseini S. 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). Revue de botanique ,Nouvelle série N° 186-2,Edition Lejeunia,Belgique,25P.

Latha, S., Selvamani, P., Dhivya, P. S., Benaseer Begam, R., 2015. A review on pharmacological activities ofAristolochia species.European journal of biomedical and pharmaceutical sciences 2(5), 160-167.

LE Grand ,A.,1989. Les phytherapies anti-infectieuses de la foret – Savane,Senegal (Afrique occidentale)III :Un résumé des substances photochimiques et l'activité antimicrobienne de 43 species.Journal of Ethnopharmacology25,315-338.

Letondor,C.,2014. Etude des mecanisme histologiques et physiologiques du transfert de la chlordecone(insectecide organochlore)dans les vegetaux. These de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse), Université de Toulouse, France.

Levy, S.B., 1994. Drug Resistance: The New Apocalypse (special issue). Trends Microbiol. 2, 341–425

Levy, J., Bosin, E., Feldmen, B., Giat, Y., Miinster, A., Danilenko, M., Sharoni, Y., 1995. Lycopene is a More Potent Inhibitor of Human Cance Cell Proliferation than either α-carotene or β -carotene. Nutr. Cancer 24, 257–266.

Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan,K.W., Chen, F., Jiang, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**, 771-776.

Maiani, G., Caston, M.J.P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodon, I.G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F.,Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Bohm, V., Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D., Schlemmer,U., 2009. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. Molecular Nutrition & Food Research 53, S194-S218.

Maire, R., 1961. Flore de l'Afrique du Nord. *Encyclopédie Biologique* **7,** 216–226.

Martins , N., Lillian Barros,L., Santos-Buelga , C., Silva ,S., Henriques , M., Ferreira,I. C.F.R.,2015. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme:Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterization.Food Chemistry 167 ,131–137

Masadeh, M. M., Alzoubi, K. H., Khabour, O. F., Al-Azzam, S. I., 2014. Ciprofloxacin-InducedAntibacterial Activity Is Attenuated by Phosphodiesterase Inhibitors. Current TherapeuticResearch77, 14–17.

Matulka, R.A., Hood, A.M., Griffiths, J.C., 2004. Safety evaluation of a natural tomato oleoresin extract derived from food-processing tomatoes. Regulatory Toxicology and Pharmacology 39, 390–402.

Metrouh-Amir, H., Duarte, C. M.M., Maiza,F., 2015. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*.Industrial Crops and Products 67 , 249–256.

Mickymaray,S., Al Aboody,M.S., Rath,P.K., Annamalai,P., Nooruddin,T., 2016. Screening and antibacterial efficacy of selected Indian medicinal plants. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 6(3),185–191.

Mpondo,E., Yinyang, J., Dibong,S.D., 2015. Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). Journal of Applied Biosciences 85,7804–7823.

Mridula, M., Shikha, G., Abid, M.,Ghosh, AK.,2011. Toxicity study of alcoholic extract of the aerial parts of Aristolochia Indica L. International journal of Research in Ayurveda et pharmacy 2(5), 1560-1562.

Murugan,R., Parimelazhagan,T.,2014. Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from Osbeckia parvifolia Arn. – An in vitro approach. Journal of King Saud University – Science 26, 267–275.

Nabors,M., 2009. Structure,foctionnement,écologie et biotechnologies. Edition Nouveaux horizons,ARS ,Paris,614 P.

Nacsa-Farkas,E., Kerekes,E., Kerekes, E.B., Krisch, J., Roxana, P., Vlad,D.C., Ivan, P., Vágvölgyi, C., 2014. Antifungal effect of selected European herbs against Candida albicans and emerging pathogenic non-albicans Candida species. Acta. Biol. Szeged 58(1),61-64.

Nagata, M., Yamashita, I., 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish, 39(10), 925–928.

Nakavuma,J.L., Matasyoh,J.C., Wagara,I.N., Kalema,J., Alinaitwe,L.,2016. Toxicity studies on anti-fungal essential oils extracted from selected aromatic plants fromMabira and Kakamega forests, East Africa. European Journal of Medicinal Plants14(2), 1-14.

Ndiaye,M., SY, G., Dièye, A.M., TOURÉ, M.T., FAYE, B., 2006. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*Annona reticulata*(Annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. Pharm. Méd. Trad. Afr. XIV, 179-186.

Nicol, M., Maudet, M., 2000. Caroténoïdes et vitamine A. Actualités Carotenoids and vitamin A. Latest data. Oil seeds and fats ,corps and lipids journal 7(3), 266-270.

Nisa, H., Kamili, A. N., Bandh, S. A., Amin, S. u., Lone, B. A., Parray, J. A., 2013.Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant efficacy of different extracts of Rumex dentatus L. - A locally used medicinal herb of Kashmir Himalaya.Asian Pac J Trop Dis , 3(6), 434-440.

Nortier,J. , Pozdzik,A., Roumeguere,T., Jean-Louis Vanherweghem ,J-L.,2015. Néphropathie aux acides aristolochiques (« néphropathie aux herbes chinoises »). Néphrologie & Thérapeutique,1-15, http://dx.doi.org/10.1016/j.nephro.2015.10.001(article in press).

OECD, 2001. Organization for Economic Co‐operation and Development.Acute Oral Toxicity - Acute toxic class method, Test Guideline No. 423, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

Oelschla¨gel, B.,Gorb, S., Wanke, S., Neinhuis, C., 2009. Structure and biomechanics of trapping flower trichomes and their role in the pollination biology of Aristolochia plants (Aristolochiaceae). New Phytologist 184, 988–1002.

Ouedraogo,Y.,Nacoulma,O., Guissou, I.P.,Guede Guina,F. ,2001. Evaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'ecorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis*(WilId).O.Ktz(Rubiaceae). Pharm. Méd. Trad. Afr. 11,13-29.

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition 44, 307–315.

Pacheco,A.,G., de Oliveira,P.,M., Piló-Veloso, D., Alcântara, A.F. C., 2009. ^{13}C-NMR Data of Diterpenes Isolated from *Aristolochia* Species. Molecules 14, 1245-1262.

Parekh,J., Karathia, N., Chanda,S.,2006. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegate* L. bark. African Journal of Biomedical Research 9, 53 – 56.

Pincemail, J., Heusele, C., Bonté, F., Limet, R., Defraigne, J.O., 2001. Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. Act. Méd. Int. - Métabolismes -Hormones – Nutrition 7 (4), 158 – 164.

Ponce, A.G., Fritz, R., del Valle, C. Roura, S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LW u.-Technol. 36, 679-684.

Purkayastha, S., Dahiya, P., 2012. Phytochemical Analysis and Antibacterial Efficacy of Babchi Oil(*Psoralea corylifolia*) Against Multi-drug Resistant Clinical Isolates. International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE3 1, 64 -68.

Quézel, P., Santa,S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques meridionales. Vol. 1. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, PP283.

Rabi, T., Bishayee, A., 2009. Terpenoids and breast cancer chemoprevention. Breast Cancer Res. Treat. 115, 223-239.

Rai,V., Pai, V.R., Pratapchandra,k.H.,Hegde,S., 2013. Preliminary phytochemical Screening of Members of Lamiaceae Family:Leucas linofolia,Coleus aromaticus and Pogestemon patchouli. International journal of pharmaceutical Sciences Review and Research 21(1), 131 – 137.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2000. Biologie végétale. Edition De Boeck-Université, New York, 944 p.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., 2007. Biologie végétale. 2ème édition Ed. De Boeck,New York, 733 P.

Raza, M., Al-Shabanah, O.A., El-Hadiyah, T.M., Al-Majed, A.A., 2002. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss *albino* mice. *Scientia Pharmaceutica* 70, 135–145.

Roland, J.C., Roland, F., El Maaroof-Bouteau, H., Boutaeu, F., 2008. Atlas biologie végétale, 2. Organisation des plantes à fleurs.9ème édition Ed. Dunod,Paris, 143P.

Rubin, M., 2004. Guide pratique de phytothérapie et d'aromathérapie.Edition Ellipses, Paris, pp.1-71.

Sahu, M.C., Debata, N. K., Padhy, R. N., 2012. Antibacterial activity of Argemone mexicana L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine S800-S807.

Sakai,S., 2002. *Aristolochia spp*. (Aristolochiaceae) Pollinated by flies breeding on decomposing flowers in Panama. American Journal of Botany 89(3), 527–534.

Sarikurkcu, C., Tepe , B., Daferera , D., Polissiou , M.,Harmandar, M., 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of Marrubium globosum subsp. Globosum (lamiaceae) by three different chemical assays.Bioresource Technology 99 , 4239–4246.

Sathya,M.,Kokilavani R.,Ananta Teepa,K.S., 2012. Acute and subacute toxicity studies of ethanolic extract of *Acalypha indica* Linn in mal wistar Albino rats. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 5(1),97-100.

Saxena,M., Saxena,J.,Nema,R.,Singh,D.,Gupta,A.,2013. Phytochemistry of medicinal plants.Journal of pharmacognosy and phytochemustry 1(6),168-182.

Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 30,3875–3883.

Scarborough, J., 2011. Ancient Medicinal Use of *Aristolochia:*Birthwort's Tradition and Toxicity. Pharmacy in History 53(1),1-21.

Schauenberg, P., Paris, F., 2006 . Guide des plantes médicinales :Analyse ,description et utilisation.Edition Delachaux et Niestlé, Paris, p.10.

Seidel ,V., 2005. Initial and Bulk Extraction. *In*: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 27-37.

Sereme,A.,Millogo-Rasolodimby,J.,Guinko,S.,Nacro,M.,2008. Propriétés thérapeutiques des plantes a tanins du Burkina Faso. Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines,15, 41 – 49.

Sereme,A.,Millogo-Rasolodimby,J.,Guinko,S.,Nacro,M.,2010. Anatomie et concentration des tannins des plantes tanniferes du BurkinaFaso. Journal des Sciences 10(2),24-32.

Shah, B.A., Qazi, G.N., Taneja,S.C., 2009. Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. Nat. Prod .Rep. 26, 72-89

Sharif Ali,S., Kasoju,N., Luthra,A., Singh,A., Sharanabasava,H.,Sahu,A., Bora,U.,2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants.Food Research International 41, 1–15.

Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M., 2009. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. , *Food* Chemistry 112,885-888.

Shi, J., Maguer, M.L., 2000. Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing. *Critical* Reviews in Biotechnology 20(4),293–334.

Shuang-Li,x., Da-Bin, H., Ni, H., Anlin, L.,2012. Preparation and biological activity of saponin from *Ophiopogon japonicas.* African Journal of Pharmacy and Pharmacology 6(26), 1964-1970.

Singh, B., Sharma, R. A., 2015. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis,regulation and clinical applications. 3 Biotech. 5,129–151.

Sosa, S., Balick, M.J., Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G., Tubaro, A., 2002. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central-American plants. Journal of Ethnopharmacology 81,211–215.

Sparg, S.G., Light, M.E., Staden,J.V.,2004. Biological activities and distribution of plant saponins. J. Ethnopharmacol. 94,219-243.

Spichiger,R.-E.,Savolainen,V.-V., Figeat,M., Jeanmonod,D., 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs. 3ème édition Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes,Lausanne, 413P.

Sridhar, S., Deepa, T., Kamalakannan, P., Elamathi, R., Kavitha, R., 2012. Studies on antibacterial, antifungal activity and phytochemical analysis of Aristolochia bracteata Retz. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2012, 4(3):1449-1453.

Su ,X., Duan, J., Jian ,Y., Shi ,J. , Kakuda ,Y., 2006. Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. Journal of Food Composition and Analysis. 19, 348-353.

Sukumarn ,S., Kiruba ,S., Mahesh, M., Nisha ,SR., Miller, PZ., Ben, CP.,et al., 2011. Phytochemical constituents and antibacterial efficacy of the flowers of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Baker ex Heyne. Asian Pac J Trop Med., 4(9), 735-738.

Suliman Mohamed, M., Idriss, M.T., Khedr, A. I.M., Abd AlGadir, H., Takeshita, S., Shah, M.M., Ichinose, Y.,Maki,T.,2014. Activity of *Aristolochia bracteolata* **against** *Moraxella catarrhalis*. International Journal of Bacteriology ID 481686,1-6.

Sushila Devi, L., Adhiraj Dasgupta, Mayukh Chakraborty, Borthakur, S.K., Irabanta Singh, N. 2014. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Schizophyllum Commune.* Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res., 27(2), 173-177.

Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., 2004. Antimicrobial activity of 10 different plantpolyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol. Pharm. Bull. 27(12), 1965–1969.

Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B., 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 7 (3), 1089-1099.

Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats.Toxicology 179, 183–196.

Theis, N., Lerdau, M., 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. Int. J. Plant Sci. 164, S93-S103.

Théron, A.,1964. Botanique.Edition Bordas,Paris,287P.

Thirumal,M.,, Vadivelan,R., Kishore,G., Brahmaji,V.S.,2012. *Aristolochia bracteolata:* An Overview on Pharmacognostical, Phytochemical and Pharmacological Properties.Critical review in pharmaceutical sciences 2(1),70-82.

Thoppil, R. J., Bishayee, A., 2011. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. World J.Hepatol. 3(9), 228-249.

Umapathy, E., Ndebia, E. J., Meeme, A., Adam, B., Menziwa, P.,Nkeh-Chungag, B. N., Iputo, J. E., 2010. An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. Journal of Medicinal Plants Research 4(9), 789-795.

Vaghasiya,Y., Chanda,S.V., 2007. Screening of Methanol and Acetone Extracts of Fourteen Indian Medicinal Plants for Antimicrobial Activity. Turk J Biol.31, 243-248.

Verdcourt, B., 1986. Aristolochiaceae. In: Polhill, RM., *Flora of tropical East Africa*. Edition A.A. Balkema, Rotterdam, 1–11.

Verpoort, R., Alferman,A.W.,2000. Metabolic Engineering of plant secondary Metabolism. Edition Kluwer academic publishers, Dordrecht/Boston/London,293P.

Viau, C., tardif, R., 2003. Toxicologie In :Environnement et santé publique – Fondements et pratiques.EditionTec. &Doc. ,Acton Vale, Paris, PP 119 – 143.

Vijayalakshmi, R., Ravindhran, R.,2012. Preliminary comparative phytochemical screening of root extracts *ofDiospyrus ferrea (Wild.)* Bakh and *Aerva lanata* (L.) Juss. Ex Schultes.Asian Journal of Plant Science and Research 2 (5),581-587.

Vila,R.,Mundina,M.,Muschietti,L.,Priestap,H.A.,Bandoni,A.L.,Adzet,t.,Cañigueral,S.,19 97. Volatile constituents of leaves ,roots and stems from Aristolochia elengans.Phytochemistry 46(6),1127 -1129.

Wadood,A., Ghufran, M., Jamal, SB., Naeem, M., Khan, A., Ghaffar, R.,2013. Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Occurring in Local Area of Mardan. Biochem. Anal. Biochem. 2(144) ,2161-1009.

Wagner, S. T., Hesse, L., Isnard, S., Samain, M.S., Bolin, J., Maass, E., Neinhuis, C., Rowe, N. P. ,Wanke, S., 2014. Major trends in stem anatomy and growth forms in the perianth-bearing Piperales, with special focus on Aristolochia. Annals of Botany 1 -16.

Waller,G.R.,Yamasaki,K.,1996. Saponins used in food and agriculture. Edition plenum press,Newyork,453P.

WHO, 2007. World Health Organisation (WHO) Traditional Medicine. Factsheet 134. Available at:http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/ (accessed on December16, 2007).

Wiart, C., Mogana, S., Khalifah, S., Mahan, M., Ismail, S., Buckle, M., Narayana, A.K., Sulaiman, M., 2004. Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak,Peninsular Malaysia. Fitoterapia 75 ,68–73.

Williams, LAD., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, JA., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H ., Kraus,W.,2008. The *in vitro* Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products andNon-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Detection ofAnti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. West Indian Med J., 57 (4), 327-331.

Winston, J.C., 1999. Health-promoting properties of common herbs. Am. J. Clin.Nutr. 70,491–499.

Yamaji ,K., Ishimoto, H., Usui ,N., Mori, S., 2005. Organic acids and water soluble phenolics produced by *Paxillus* species. Mycorrhiza,15(1),17-23.

Yougbaré-Ziébrou, M.N. , Ouédraogo, N. ,Lompo, M., Bationo, H. , Yaro, B. Gnoula, C. , Sawadogo , W.R. ,Guissou, I.P., 2015. Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de Saba senegalensis Pichon (Apocynaceae). Phytothérapie(Pharmacognosie) 1-7.

Zhou, K., Yu, L., 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. Lebensm. Wiss. Technol. 37, 717–721.

الملاحق

ملحق 1. الأسئلة الخاصة بالتحقيق الميداني

جامعة فرحات عباس – سطيف-

بحث حول نبات برستم (برزطم)

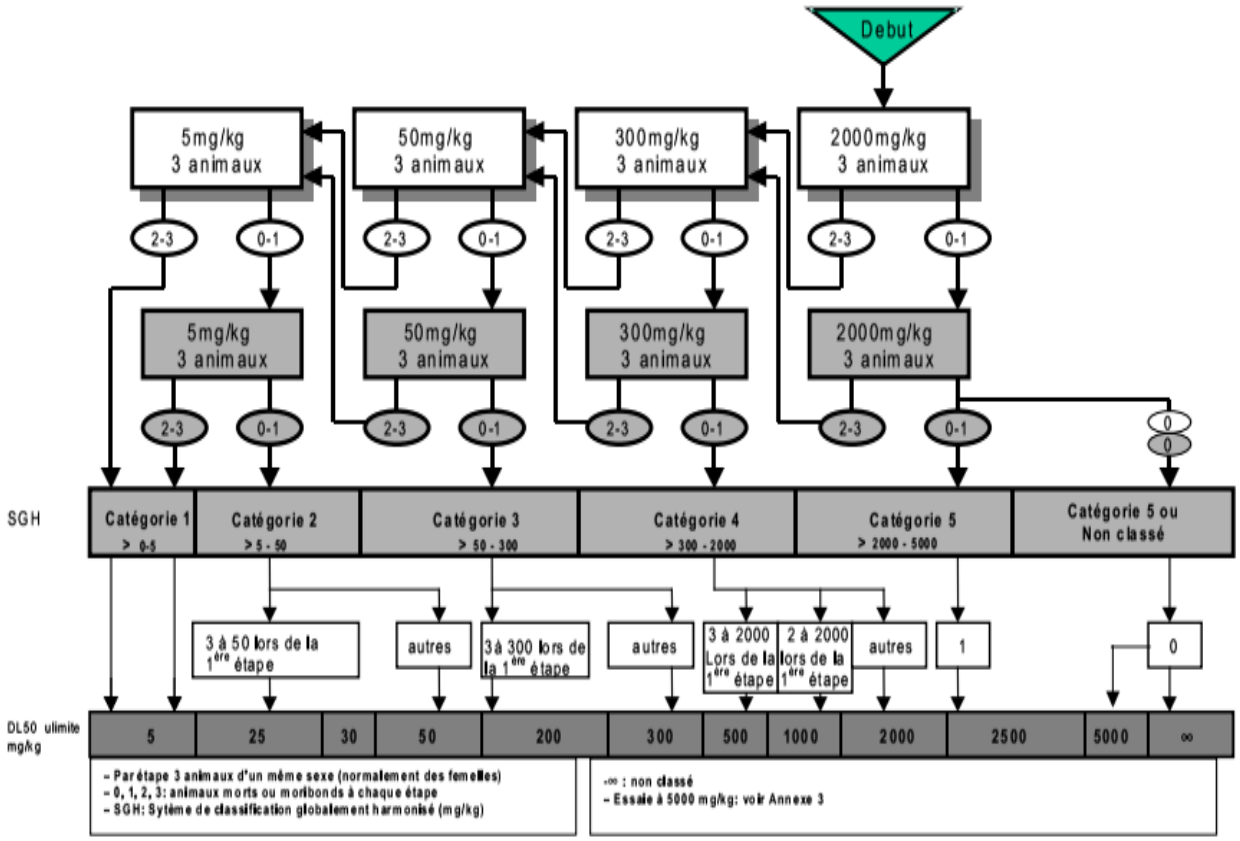
المنطقة: **الجنس:**

1- هل تعرف هذا النبات ؟
2- هل هناك أسماء أخرى يعرف بها هذا النبات أو تطلق عليه ؟
3- لأي غرض يستعمل ؟
4- هل ينمو طبيعيا أو مزروع؟
5- أين يمكن أن نجد هذا النبات ؟و أين ينمو؟
6- هل يمكن أن تصفه؟
7- في أي وقت من السنة يمكن جني هذا النبات؟
8- كيف يتم جني النبات؟
9- ماهي الأجزاء النباتية المستعملة؟
10- هل تستعمل جافة أو غضة؟
11- ماهي طريقة تحضيرها؟
12- ماهي الكمية المستعملة؟
13- ماهي الفترة الزمنية اللازمة للعلاج؟
14- هل من خطر يمكن أن يحدثه النبات عند استعماله؟
15- هل من آثار جانبية عند استعماله؟

اسم النبات	الجزء المستعمل	الهدف من استعماله	طريقة الاستعمال
	النبتة كاملة الجزء الهوائي(الأوراق) الجذور الثمار		

ملحق d2. مخطط اختبار بجرعة أولية بـ 2000 مغ/كغ

ANNEXE 2d: SCHEMA D'ESSAI AVEC UNE DOSE INITIALE DE 2000 MG/KG



ملحق 3.معايير لتصنيف مواد إختبار بـ DL_{50} متوقع أن تكون أكبر من 2000مغ/كغ بدون اللجوء إلى إختبار

ANNEXE 3

CRITÈRES POUR CLASSER DES SUBSTANCES D'ESSAI AVEC UNE DL50 ATTENDUE SUPÉRIEURE À 2000 MG/KG SANS AVOIR RECOURS À L'ESSAI

1. Les critères pour la catégorie de danger 5 sont destinés à l'identification de substances dont la toxicité aiguë est relativement faible mais qui peuvent, sous certaines conditions, être dangereuses pour des populations vulnérables. La DL50 orale ou dermale de ces substances est escomptée se situer dans la gamme 2000-5000 mg/kg ou de doses équivalentes par d'autres routes. Des substances d'essai peuvent être classées dans la catégorie SGH de danger 5, définie par 2000 mg/kg<DL50<5000 mg/kg, dans les cas suivants:

a) si, sur la base de l'incidence de mortalité, l'un quelconque des schémas de l'Annexe 2a-2d dirige la substance vers cette catégorie;

b) si l'on possède des indications fiables que la DL50 se situera dans la gamme de la catégorie 5; ou si d'autres études sur des animaux ou des observations d'effets toxiques constatés chez l'homme suscitent des inquiétudes motivées pour la santé humaine;

c) par extrapolation, évaluation ou mesure de données, si la classification dans une catégorie de plus grand danger n'est pas justifiée et

- l'on possède des informations fiables indiquant des effets toxiques significatifs pour l'homme, ou
- de la mortalité est observée en testant par voie orale jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, ou
- lorsq'un jugement d'expert confirme des signes cliniques significatifs de toxicité dans un essai mené jusqu'aux valeurs de la catégorie 4, hormis la diarrhée, les modifications des poils ou un aspect mal soigné, ou
- quand un jugement d'expert confirme des informations fiables indiquant des effets aigüs potentiellement significatifs sur la base des autres études sur animaux.

DES ESSAIS À DES DOSES SUPÉRIEURES À 2000 MG/KG

2. Pour des raisons liées à la protection du bien-être des animaux, l'essai sur animaux de substances de la catégorie 5 (5000 mg/kg) doit être découragé. Il est seulement envisageable lorsqu'il y a une forte probabilité que les résultats d'un tel essai seront des éléments importants pour la protection de la santé des hommes et des animaux (10). Aucun essai à un niveau de dose supérieur doit être entrepris.

3. Lorsqu'un essai à 5000 mg/kg est nécessaire, seulement une étape(avec trois animaux) est requise. Si le premier animal traité meurt, le traitement continue avec 2000 mg/kg comme cela est indiqué dans les schémas de l'Annexe 2. Si le premier animal traité survit, deux autres animaux sont traités. S'il y a seulement un mort parmi les trois animaux, la valeur de la DL50 est estimée supérieure à 5000 mg/kg. Si les deux autres animaux survivent, le traitement continue avec 2000 mg/kg.

IJPSR (2017), Vol. 8, Issue 5 (Research Article)

INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH

Received on 09 October, 2016; received in revised form, 27 December, 2016; accepted, 31 December, 2016; published 01 May, 2017

EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *ARISTOLOCHIA LONGA* L. EXTRACTS

N. Merouani [1], R. Belhattab [*2] and F. Sahli [3]

Department of Vegetal Biology and Ecology [1], Department of Biochemistry [2], Faculty of Medicine [3], Faculty of Nature and Life Sciences, Microbiology Laboratory, University Ferhat Abbas –Setif 1– 19000, Setif, Algeria.

Keywords:

Aristolochia longa L., Polyphenols, Antioxidant activity, Antibacterial activity, Antifungal activity, Anti-Inflammatory activity

Correspondence to Author:
Rachid Belhattab

Department Biochem. Fac. NLS, University FA Setif1**,** 19000, Setif, Algeria**.**

E-mail: rbelhat@yahoo.fr

ABSTRACT: *Aristolochia longa* L. (Aristolochiacea) is a native plant of Algeria used in traditional medicine. This study was devoted to the determination of polyphenols, flavonoids, and tannins contents of *A. longa* L. extracts. Extracts were prepared from aerial parts (stems and leaves), fruits and tubers by using various solvents with different polarities such as acetone, methanol and distilled water. Acetone extracts from the aerial parts presented the highest contents of polyphenols (525.43±29.6 µg/mg) followed by fruit aqueous extract (518.54±14.93 µg/mg), while the aerial parts methanol extract shown the highest flavonoid content (52.37±0.94 µg/mg) and exhibited the highest antioxidant capacity of DPPH and reducing power (55.04 ±1.29 µg/mL and 0.2±0.019 mg/mL, respectively), therefore the aerial parts acetone extract showed the highest antioxidant capacity in the β-carotene bleaching inhibition test with 57%. For antimicrobial activity, the fruit methanol extract was too efficient against the bacterial strains tested, whereas no effect was observed when these extracts were tested against fungi. The protein denaturation was found in the aerial parts acetone extract to be 78.35±6.18% followed by fruit methanol extract, 68.04±4.72% at the dose 500 µg/mL, with regards to standards diclofenac sodium. These preliminary results could be used to justify the traditional use of this plant and its bioactive substances could be exploited for therapeutic purposes.

INTRODUCTION: Species belonging to the genus *Aristolochia* have often been reported as important medicinal plants in ethnobotanical studies. They are widely distributed in practically all continents except Australia, a continent for which only few species are known [1]. *Aristolochia* species contain secondary metabolites that are important natural toxins and traditional medicines[1]. The data obtained by Heinrich et al., (2009) demonstrate the worldwide importance of members of the genus in practically all regions where *Aristolochia* species are found.

Aristolochia longa L. (Aristolochiaceae) widely distributed in Algeria [2] and locally known as 'Beroustoum', is a species commonly used in Algerian traditional medicine. Tubers of this plant were used such as astringent, antirheumatic, antitumor, anti-inflammatory and antiseptic [3, 4].

The aim of this study was to assess the biological activity of the different extracts of *Aristolochia longa* L., to determine the effect of different

QUICK RESPONSE CODE

DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(5).1978-92

Article can be accessed online on: www.ijpsr.com

DOI link: http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8 (5).1978-92

extraction solvents on these activities and to conclusion the most effective extract.

MATERIALS AND METHODS:

Plant material and extracts preparation: *Aristolochia longa* L. was collected in May 2011, 80 km North of Setif (Algeria). A voucher specimen was deposited in the Nature and Life Sciences Faculty herbarium (University F.A.Setif1, Algeria)

The aerial parts (stem and leaves), fruits and tubers were shadow-dried and pulverized to dry powder. All chemicals were purchased from Sigma.

Three extracts (acetone, methanol and water) were prepared from aerial parts (stem and leaves), fruits and tubers. 20 grams of the different part of dried plant material were crushed and extracted for 48 h with 100 ml of 80% (v/v) aqueous methanol at room temperature. Second successive extraction with 50 ml of the same hydro alcoholic solution was carried out at room temperature for 24 h. After removal of methanol under reduced pressure in a rotary evaporator at 40 °C, the remaining aqueous solution of the extraction is defatted twice with petroleum ether to remove lipids. Then, the lyophilized solution is extracted with ethyl acetate in presence of aqueous solution with 20% ammonium sulfate, and 2% of ortho-phosphoric acid solution. The ethyl acetate fraction is dried with anhydrous sodium sulphate, and then evaporated to dryness using a rotary evaporator. The dried precipitate was dissolved in 5 ml of absolute methanol and kept at - 10 °C [5].

The same parts of plant were extracted with acetone in a Soxhlet apparatus within a period of 6 h. The solvent was removed under vacuum and the crude acetone extract obtained. For the preparation of water extracts, the plant, 20g, was extracted with boiling distilled water (250ml) for 10min. the extract remained in the warm water for 15 min and then filtered and concentrated in rotary evaporator[6].

Plant extract yield (EY): The yield of the extraction was calculated from the following equation

$$(W1/W2) \times 100$$

Where, W_1 is the weight of extract after evaporation of solvent and W_2 is the dry weight of the plant sample.

Determination of antioxidant components:

Total phenol content: In this study, we've estimated total phenolics using the Folin– Ciocalteu reagent as previously described [7]. Samples were incubated at room temperature for 2 h, the absorbance of all samples were measured at 765 nm against a methanol blank using a spectrophotometer. The standard calibration curve was obtained using gallic acid. Total phenol content was expressed as µg of gallic acid equivalents (GAE) / mg of dry extracts.

Flavonoids content: The determination of total flavonoids content was conducted according to the $AlCl_3$ method [4]. The absorbance of mixture was measured at 430 nm after 30 min of incubation at room temperature. Results were expressed as µg of quercetin equivalents (QE) / mg of extract.

Flavones and flavonols content: Flavones and flavonols were estimated according to the protocol developed by Kosalec et al.[8], where the absorbance of mixture was measured at 415 nm after 30 min of incubation at room temperature. The content of flavones and flavonols was expressed as µg of quercetin equivalents (QE) / mg extract.

Tannins content: For the determination of tannin content in extracts, a method proposed by Bate-Smith [9] was followed. Results were expressed as microgram of tannin equivalent per mg of extract (TAE/ mg extract). All tests were carried out in triplicate.

β- carotene and lycopene contents: β- carotene and lycopene contents were simultaneously determined by a spectrophotometric method [10]. The dried methanolic extract (100 mg) was vigorously shaken with 10 ml of acetone–hexane mixture (4:6 v/v) for 1 min and filtered through Whatman No. 4 filter paper. The absorbance of the filtrate was measured at 453, 505, and 663 nm.

Contents of β-carotene and lycopene were calculated according to the following equations:

Lycopene (mg/100 ml) = - 0.0458 A663 + 0.372 A505 - 0.0806 A453.

β- carotene (mg/100 ml) = 0.216 A663 - 0.304 A505 + 0.452 A453.

The assays were carried out in triplicate; the results were mean values ± standard deviations and expressed as mg of carotenoid/g of extract [11, 12].

Antioxidant activity: Three different *in vitro* tests were carried using solutions prepared by serial dilution: scavenging effects on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radicals, reducing power (measured by ferricyanide Prussian blue assay), inhibition of β-carotene bleaching.

DPPH radical scavenging assay: The potential antioxidant activity of plant extracts was assessed on the basis of the scavenging activity of the stable 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical according to the previous described procedures. Different concentrations of test samples were prepared. The reaction mixtures, consisting of 1ml test sample and 1ml methanolic solution of DPPH, 6.10^{-5} M, were incubated for 30 min at room temperature in the dark and absorbance was measured at 515 nm. Methanol was used to zero the spectrophotometer. The ability to scavenge the DPPH radical was calculated using the following equation:

The percentage inhibition of the DPPH radical (%)

$$\frac{A0 - A1}{A0} \times 100$$

Where, A_0 is the absorbance of the control at t= 0 min and A_1 is the absorbance of the sample.

The IC_{50} (µg/mL) values denote the concentration of each sample required to give 50% of the optical density shown by the control. A lower IC_{50} value corresponds to a higher antioxidant activity of sample. BHT (butylated hydroxy toluene) was used as a standard antioxidant [13].

Reducing power assay: Reducing power was evaluated by the capacity to convert Fe^{3+} into Fe^{2+}. The power iron reducer (Fe^{3+}) in extracts is determined according to the method described by Oyaizu (1986) [14]. Briefly, a solution of 2.5 ml of phosphate buffer (0.2 M pH = 6, 6) and 2.5 ml of potassium ferri-cyanide [$K_3Fe(CN)_6$] (1%) were added to 1ml of the extract in different concentrations. Reaction mixture was incubated at 50 ◦C for 20 min and then 2.5 ml of trichloroacetic acid (10%) was added and centrifuged for 10 min. From the upper layer, 2.5 ml was mixed with 2.5 ml of distilled water and 0.5 ml of $FeCl_3$ (0.1%). Finally, the absorbance was measured at 700 nm against a blank. Quercetin and BHA (butylated hydroxy anisole) were used as a control.

A higher absorbance indicates a higher reducing power. EC_{50} value (mg/mL) is the effective concentration at which the absorbance was 0.5 for reducing power and was obtained by interpolation from linear regression analysis [15, 16, 17].

β- Carotene– linoleic acid assay: In this assay, antioxidant capacity is determined by measuring the inhibition of the volatile organic compounds and the conjugated diene hydroperoxides arising from linoleic acid oxidation[18]. In brief, 0.5 mg β-carotene in 1 ml chloroform was mixed with 25 µl of linoleic acid and 200 mg of Tween40. The chloroform was evaporated under vacuum at 45 °C, then 100 ml distilled water saturated with oxygen was added and the resulting mixture was vigorously stirred.

The emulsion obtained was freshly prepared before each experiment. An aliquot (2.5 ml) of the β-carotene/ linoleic acid emulsion was transferred to tubes containing 0.5 ml of each sample at different concentrations. The tubes were immediately placed in water bath and incubated at 50 °C for 2 h. Thereafter, the absorbance of each sample was measured at 470 nm. A control consisted of 0.5 ml of distilled water instead of the sample solution. BHA was used as positive standard [19, 20]. Tests were carried out in triplicate. The relative antioxidant activity was calculated according to the following formula:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = 1 - \frac{(At_0 - At_{120})\,\text{test}}{(At_0 - At_{120})\,\text{control}} \times 100$$

At_0: absorbance at time t = 0.
At_{120}: absorbance at time t =120min.

***In vitro* anti-inflammatory activity:** Anti-inflammatory activity of *Aristolochia longa* extracts was evaluated by protein denaturation method [21].

In this experiment, four solutions were prepared : test solution consist of 0.45 ml of BSA (bovine serum albumin) (5% w/v) (aqueous solution) and 0,05 ml extract solution (500 µg/mL), test control solution consist of 0.45 ml of BSA (5% w/v)

(aqueous solution) and 0.05 ml distilled water, product control solution consist of 0.45 ml distilled water and 0.05 ml of extract solution (500 µg/mL), standard solution consist of 0.45 ml 0f BSA (5% w/v) (aqueous solution) and 0.05 ml diclofenac sodium (500 µg/mL), each previous solution contains 0.5 ml. All above solutions were adjusted to pH 6.3 using 1N hydrochloric acid. The samples were incubated at 37°C for 20 min and the temperature was increased to keep the samples at 57°C for 3 min. After cooling, 2.5 for phosphate buffer saline was added to above solutions the absorbance was measured at 416 nm. The percentage inhibition of protein denaturation was calculated by using the following formula:

$$\text{Percent inhibition \%} = 1 - \frac{\text{O.D of the test solution} - \text{OD of product control}}{\text{OD of test control}} \times 100$$

The control represents 100% protein denaturation. The results were compared with diclofenac sodium (500µg/mL). Each experiment was done in triplicate and the average was taken.

Anti- microbial activity:

Anti-bacterial activity: Extracts were tested against the reference strains for their inhibitory activity, using two methods: agar diffusion method [22] and the microdilution method (minimum inhibitory concentrations (MIC) [23].

The anti-bacterial activity of the extracts was tested against four aerobic reference bacterial strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus cereus* ATCC 10876.

The bacteria were grown on Mueller Hinton agar. Gentamycin was used as positive control since it is commonly used as antibiotic against gram positive and gram negative bacterial sp.

A volume (20 mL) of each medium was poured into 90 mm diameter Petri dishes. The bacteria used in the tests were obtained from 24 h cultures and suspended in a sterile saline solution to obtain an inoculum that has a concentration of approximately 10^8 CFU/mL (or 0,5 Mac Farland). The agar plate containing the appropriate medium was spread with the inoculum containing 10^8 CFU/mL.

Anti-fungal activity: The moulds (*Aspergillus flavus* NRRL 391, *Aspergillus niger* 2CA 936) were separately inoculated on to PDA medium and incubated for 7 days at ambient temperature until sporulation was complete. The spores were harvested with 10 ml sterile distilled water and adjusted to contain approximately 10^6spores/mL. A cell suspension of yeast (*Candida albicans* ATCC1024) was prepared in sterile distilled water and adjusted to contain approximately 10^6 spores/mL.1ml of the spores was added to plates containing PDA medium, while the yeast suspension was added to plates containing Saboureau+ chloramphenicol+ actidione [6].

In both activities (Anti-bacterial activity and Anti-fungal activity)**,** the sterilized discs (6 mm in diameter) were impregnated with 10 µl of the extract and then placed on to agar plates. After incubation at 37 °C for 18–24 h for bacteria, at 30 °C for 24–48 h for yeasts and 10 days at room temperature for moulds, the diameters of inhibition zones were measured in mm. Gentamycin (10 µg), and clotrimazole (50µg) were used as positive controls for bacteria, yeast and moulds, respectively. Pure dimethyl sulfoxide (DMSO) 10 µl was injected as the negative control. All the experiments were performed in triplicate.

Minimum inhibitory concentration (MIC): Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using a common broth microdilution method, in 96 multiwell microtiter plates, in triplicate [23].

In a first step 50µl of Mueller Hinton broth were distributed from the second to the twelfth test tubes. Dry extracts were initially dissolved in 10% of dimethyl sulfoxide (DMSO) and then in Mueller Hinton Broth, to reach a final concentration of 200 mg/mL for methanol and acetone extracts and 400mg/mL for water extract; 100 µl of these suspensions were added to the first test well of each microtiter line, and then 50 µl of scalar dilution were transferred from the second to the ninth well. The 10^{th} well was considered as growth control, since no extracts solutions were added. Then, 50 µl of a microbial suspension (10^5 colony forming units, CFU/mL), obtained from an overnight growth at 37 °C, were added to each well.

The final concentration of the extracts adopted to evaluate the anti-bacterial activity was included from 100 mg/mL (first well) to 0.390 mg/mL (ninth well) and for water extracts the anti-bacterial activity was included from 200 mg/mL (first well) to 0.780 mg/mL (ninth well). Plates were incubated for 18h at 37 °C. After incubation period, the vials were checked for turbidity and the lowest concentrations of the extract showing no turbidity (no growth) were regarded as the MIC of the test substance [24, 25].

Statistical analysis: The results are expressed as the mean value ± standard deviation. One-way analysis of variance followed by the Tukey test was performed to assess differences between groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with the aid of the software GraphPad Prism 5®.

RESULTS AND DISCUSSION:

Extracts yields: The extraction yields were obtained after removal of solvent, which ranged from 1.45% to 10.05% (w/w) and were influenced by several parameters, including chemical composition and physical characteristics of the plant material [26]. In our study, the results showed that the aqueous extracts gave us highest yields (**Table 1**). For example, the highest yield in extracts was achieved by the aerial part aqueous extract, where it had considerable proportion of phenols content. The aqueous extraction is carried out by high temperature decoction for 10 min, in fact Su et al., reported that aqueous extraction efficiency increases with temperature [27]. This explains that water high-temperature causes disruption of cells facilitating the penetration of the solvent and solubilizing molecules [28]. Martins et al., [29] reported that the decoction presented the highest concentration of phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) followed by infusion and hydroalcoholic extract.

Koruthu et al., said that the water soluble phenolics are only important as antioxidant compounds [30]. It has been reported that the solvent polarity highly affects extraction rate and antioxidant activity of plant extracts [31], and the efficiency of the extraction depends on many parameters, including the extraction time and temperature, the volume and type of the solvents used [32].

Total phenolics content: Phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acids, and tannins are considered to be major contributors to the antioxidant capacity of plants [7]. It has been suggested that polyphenolic compounds have inhibitory effect on mutagenesis and carcinogenesis in humans, when ingested at up to1g daily from a diet rich in fruits and vegetables [4].

The content of total polyphenols, flavonoids and tannins in aqueous, methanol and acetone extracts of *Aristolochia longa* L. were determined following the Folin- Ciocalteu procedure, which is considered as the best method for total phenolics (including tannins) evaluation, the aluminum trichloride, and the hemoglobin precipitation method respectively. The results showed that the total phenols were characterized by highest values compared with other ingredients in all extracts used (**Table 1**), but the highest amounts of total phenolics were found in aerial parts acetone extract (525.43µg GAE/mg extract), and in fruit aqueous extract (518.54µg/mg).

The total phenolic content were calculated using the following linear equation based on the calibration curve of gallic acid: A=0,089X+0.0199 (R^2=0.9995),

Where, A is the absorbance and X is the amount of gallic acid in µg.

Flavonoids content: The content of flavonoids expressed in quercetin equivalents varied from 4.86- 52.37 µg/mg, the highest amounts were found in aerial parts methanol extract and aerial parts acetone extract (52.37 and 37.54 µg/mg respectively), whereas the other extracts contained lower amounts.

The calibration curve of quercetin:

A=0.0358X+0.0858 (R^2=0.9984),

Flavones and flavonols content: The concentration of flavones and flavonols, expressed in microgram of quercetin equivalents per ml of extract varied from 21.64- 85.37µg/mL, according to calibration curve: A=0.059X-0.0027 (R^2=0.999)).

We also noticed that the aqueous extracts contained remarkably lower amounts of these compounds in comparison with acetone and methanol extracts where we observed the highest amounts (85.37 µg/mL in aerial parts methanol extract and 75.45µg/mL in aerial parts acetone extract).

Previously, Djeridane et al., reported the following results from roots methanol extract of *Aristolochia longa* L.[4]: total phenolics 1.47±0.02 mg GAE/g dw, flavonoids content 0.81±0.02 mg RE/g dw, flavonols content 0.41±0.002 mg QE/g dw, and also in other studies [33], total phenolic content in *A. longa* aqueous extract of roots was found to be 6.07 ± 0.12 mg GAE/g, but our extract contain higher levels, this could be explained by the change of the plot location.

Tannins content: Determining the tannins content is made by the hemoglobin precipitation test. The content of tannin expressed in µg tannic acid equivalents (TAE) per mg of extract.

$$A= -0.01X+ 0.8092 (R^2=0.9887),$$

In regards to the content of tannin we noticed that tuber methanol extract have the highest amount (206.93 µg TAE/mg).

According to Seidel, water and methanol are both polar solvents which extract particularly glycosylated flavonoids and tannins [34], and we could interpret these results by the occurrence of different types of tannins. It is possible to divide the tannins into 2 groups according to their structure: condensed tannins and hydrolysable tannins [35]. We conclude that the difference in results is due to the type of the solvent and the part of the plant.

Phenolic compounds possess scavenging ability due to their hydroxyl groups and are known to be powerful antioxidant [12]. Phenolic compounds such as tannins and flavonoids are considered to be the major contributors to the antioxidant capacity of plants. Some of diverse biological activities of plants, such as antibacterial activity, may also be related to phenolic compounds [32].

β- carotene and lycopene content: β- carotene and lycopene were only found in vestigial amounts, the first compound amount varied from 0.023 -1.036 µg/mg. Aerial parts methanol and acetone extracts have the highest content 1.036 and 0.947 µg/mg respectively, whereas lycopene was present in trace amounts in these extracts (0.0065 -0.690 µg/mL respectively).

TABLE 1: ANTIOXIDANTS CONTENTS OF *ARISTOLOCHIA LONGA* L. EXTRACTS

Extracts	Total phenolics (µg GAE/mg extract)	Flavonoids (µg QE/mg extract)	Flavones and Flavonols (µg QE/mg extract)	Tannins (µg TAE/mg extract)	β-Carotene (µg/mg extract)	Lycopene (µg/mg extract)	Extract yields (%)
Aerial parts aqueous extract (AAE)	396.88±8.86	9.92±0.23	27.40±0.7 1	54 .4±2	0.393±0.004	0.0213±0.001	8.65
Fruit aqueous extract (FAE)	518.54±14.93	5.81±0.15	21.64±1.19	14.14±0.09	0.023±0.001	0.015±0.001	10.05
Tuber aqueous extract (TAE)	293.82±9.90	4.86 ± 0	23.16±0.71	21.2±1.52	0.039±0.001	-	2.7
Aerial parts methanol extract (AME)	132.33±3.77	52.37±0.94	85.37±5.03	99.36±2.78	1.0 36±0.1	0.305±0.005	3.35
Fruit methanol extract (FME)	260.25±8.49	9.33±0	74.94 ±0.35	155.46±5.10	0.549±0.006	0.0065±0.0005	2.15
Tuber methanol extract (TME)	224.29±13.49	15.42±0.47	62.15±1.91	206.93±4.61	0.638±0.032	-	4.35
Aerial parts acetone extract (AAcE)	525.43±29.6	37.54±0.98	75.45±4.35	132.3±5.12	0.947±0.067	0.690±0.045	6.4
Fruit acetone extract (FAcE)	264.91±4.27	6.13±0.25	37.23±0.23	130.8±3.96	0.88±0.008	0.105±0.005	2.75
Tuber acetone extract (TAcE)	427.31±51.50	7.63±0.19	31.05±1.79	14.98±0.64	0.484± 0.016	0.122±0.002	1.45

Values expressed are means ± S.D. of three parallel measurements.

Antioxidant activity:

DPPH free radical scavenging activity: DPPH (1,1-diphenyl-2- picrylhydrazyl) is a useful reagent for investigating the free radical- scavenging activities of compounds [36], and it is a stable free radical that shows a characteristic absorbance at 517 nm, which decreases significantly when exposed to radical scavengers by providing hydrogen atom or electron to be a stable diamagnetic molecule. Upon reduction, solution of DPPH fades from purple to yellow. Thus, a lower absorbance at 517 nm indicates a higher radical scavenging activity of extract [12].

Representing the DPPH radical by Z* and the donor molecule by AH, the primary reaction is [37]:
Z*+ AH —> ZH +A

The scavenging effects of different concentrations from different extracts of *Aristolochia longa* L. on the DPPH free radical were compared with standard anti-oxydant BHT. The results were expressed as IC_{50} (µg/mL) values correspond to the sample concentration providing 50% of antioxidant activity (**Fig. 1**).

As can be seen from the **Table 2** in DPPH assay, the IC_{50} values of the antioxidant capacity varied significantly ($P < 0.05$) from 145.14 to 547.29 µg/mL in comparison with BHT (42.85 µg/mL), however the aerial parts methanol extract scanvenging ability (55.04 µg/mL) was found non significant ($p>0.05$) in comparison with BHT. As it is known, the lower the IC_{50} value means the higher the antioxidant capacity of the plant extract. This scavenging activity especially assigned to phenolic compounds i.e phenolic acids and flavonoids [4], this comment concord with our results because aerial parts methanol extract (who has lower IC_{50}) has the highest contents of flavonoids, flavones and flavonols. Our study are in accordance with previous studies which indicate that not only total content, but the type of phenolics and their relative distribution is important for biological activity [38].

Previous published papers [4] demonstrated that the root methanol extract of *Aristolochia longa* L. have weaker ability to act as antioxidant $IC_{50=}$ 90µM/L, This is in accordance with our study since we found a lower IC_{50} (514.58 µg/mL).

Reducing power assay: Reducing power of a compound indicates its potential antioxidant activity [12], and it is a mechanism which measures the conversion of a Fe^{+3}/ferricyanide complex to the ferrous form in presence of reductants (antioxidants) in the tested samples. The Fe^{2+} was then monitored by measuring the formation of Perl's Prussian blue at 700 nm. In fact, it is widely accepted that higher absorbance at 700 nm is correlated to power reducing [20, 37].

$Fe\ (TPTZ)_2(III) + ArOH \longrightarrow Fe(TPTZ)_2(II) + ArOH^+$

We obtained similar results in reducing power activity (**Table 2, Fig. 2** and **Fig. 3**), where the values of EC_{50} varied significantly ($P < 0.05$) from 0.632 to 5.999 mg/mL, but the aerial parts methanol extract showed the highest reducing power activity where was EC50 (0.2mg/mL) non significant ($p>0.05$) in comparison with BHA and quercetin (EC_{50}= 0.053mg/mL).

β- Carotene– linoleic acid assay: The antioxidant activity of carotenoids is based on the radical adducts of carotenoids with free radical from linoleic acid. The linoleic acid free radical attacks the highly unsaturated β-carotene models. The presence of different antioxidants can hinder the extent of β-carotene-bleaching by neutralizing the linoleate and other free radicals formed in the system [36]. The antioxidant assay using the discoloration of β-carotene is widely used to measure the antioxidant activity of bioactive compounds because β-carotene is extremely susceptible to free radical mediated oxidation of linoleic acid. Furthermore, β-carotene is used as a coloring agent for beverages, and its discoloration would markedly reduce the quality of these products. In this test, β-carotene undergoes rapid discoloration in the absence of antioxidant, which results in a reduction in absorbance of the test solution with reaction time. The presence of antioxidant hinders the extent of bleaching by neutralizing the linoleic free radical formed [19].

As shown in **Table 2**, all extracts at the same concentration (2 mg/mL) inhibited the oxidation of β- carotene at different degrees (**Fig. 4** and **Fig. 5**), while the aerial parts acetone extract revealed the highest β- carotene bleaching inhibition percentage compared to the other extracts but this activity was

weaker than the activity achieved by BHA (57% versus 84%). The variation in the antioxidant activity could be due to the quantity of polyphenols present in each solvent, but it also varies according to the quality of polyphenols, flavonoids and tannins. Using solvents with different polarities allow the extraction of a selected group of antioxidants, affecting the antioxidant capacity estimation [39].

TABLE 2: *IN VITRO* ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *A. LONGA* EXTRACTS

Extracts	DPPH IC_{50} (µg/mL)	Reducing power EC_{50} (mg/mL)	b-Carotene bleaching inhibition%
Aerial parts aqueous extract (AAE)	157.13±0.26**	0.632±0.012***	30±1.73***
Fruit aqueous extract (FAE)	145.15±0.78**	1.862±0.067***	16±1.51***
Tuber aqueous extract (TAE)	198.06±1.7***	5.999±0.075***	12±1.65***
Aerial parts methanol extract (AME)	55.04±1.29ns	0.200±0.019ns	33±1.02***
Fruit methanol extract (FME)	186.21±6.24***	1.535±0.035***	28±2.83***
Tuber methanol extract (TME)	514.58±46.38***	2.645±0.09***	22±2.22***
Aerial parts acetone extract (AAcE)	182.59±1.20***	1.237±0.09***	57±1.79***
Fruit acetone extract (FAcE)	547.29±25.82***	2.427±0.003***	36±3.37***
Tuber acetone extract (TAcE)	311.27±5.83***	2.499±0.137***	23±1.8***
BHT (µg/mL)	42.85±0.15	_	-
BHA (mg/mL)	-	0.053±0.0009	84±5.45
Quercetin (mg/mL)	-	0.053±0.0001	-

Values expressed are means ± S.D. of three parallel measurements. Comparison was realized against BHA, BHT and quercetin; ***** $p< 0.05$ significant difference, **p < 0.01 very significant difference, ******* $p<0.001$ extremely significant difference. ns: non significance. IC_{50} (µg/mL) values correspond to the sample concentration providing 50% of antioxidant activity. Reducing power was expressed as concentration giving absorbance of 0.500. EC_{50} (mg/mL): effective concentration at which the absorbance is 0.5.

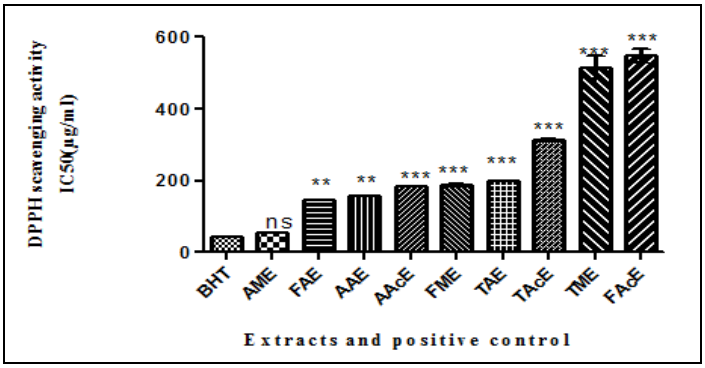


FIG. 1: FREE RADICAL- SCAVENGING CAPACITIES OF *A. LONGA* L. EXTRACTS AND BHT (AS POSITIVE CONTROL) MEASURED BY DPPH ASSAY. Values presented are the means of triplicate analysis.*****: $p< 0.05$, **p < 0.01, ******* $p< 0.001$. ns: non significance.

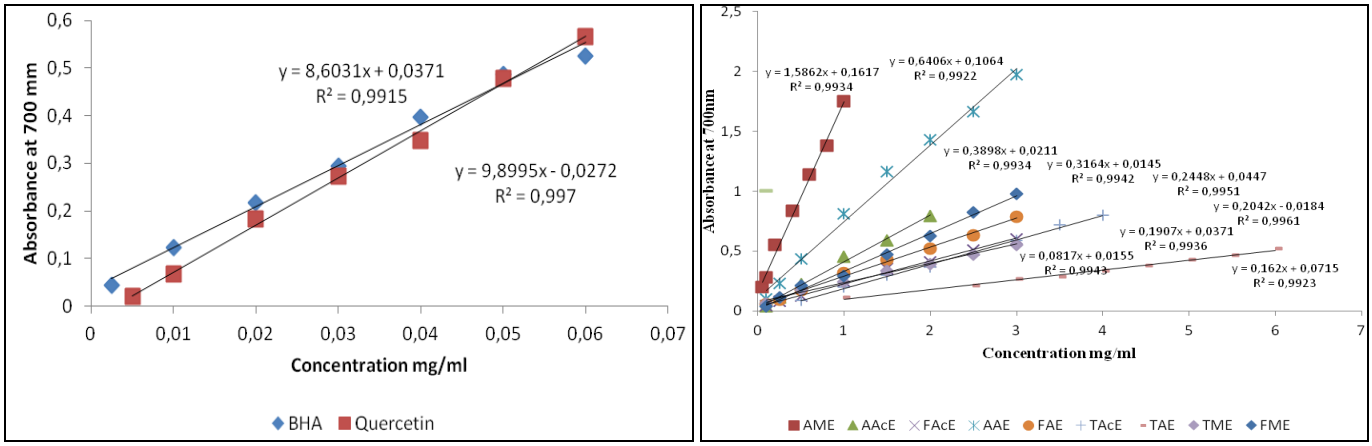


FIG. 2: REDUCING POWER ACTIVITY OF *A.LONGA* L. EXTRACTS AT DIFFERENT CONCENTRATIONS. BHA AND QUERCETIN WERE USED AS POSITIVE CONTROLS. VALUES PRESENTED ARE THE MEANS OF TRIPLICATE ANALYSIS

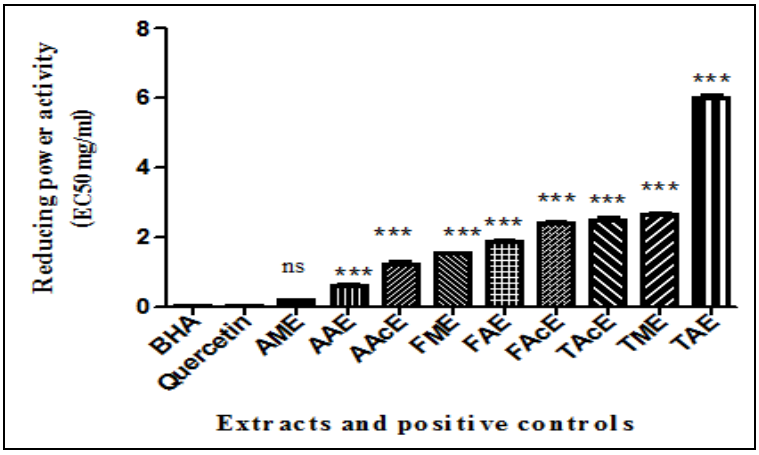


FIG. 3: ANTIOXIDANT CAPACITIES OF *A. LONGA* L. EXTRACT, USING FERRIC REDUCING POWER METHOD. VALUES PRESENTED ARE THE MEANS OF TRIPLICATE ANALYSIS. Comparison was realized against BHA; ***: $p< 0.001$. ns: non significance

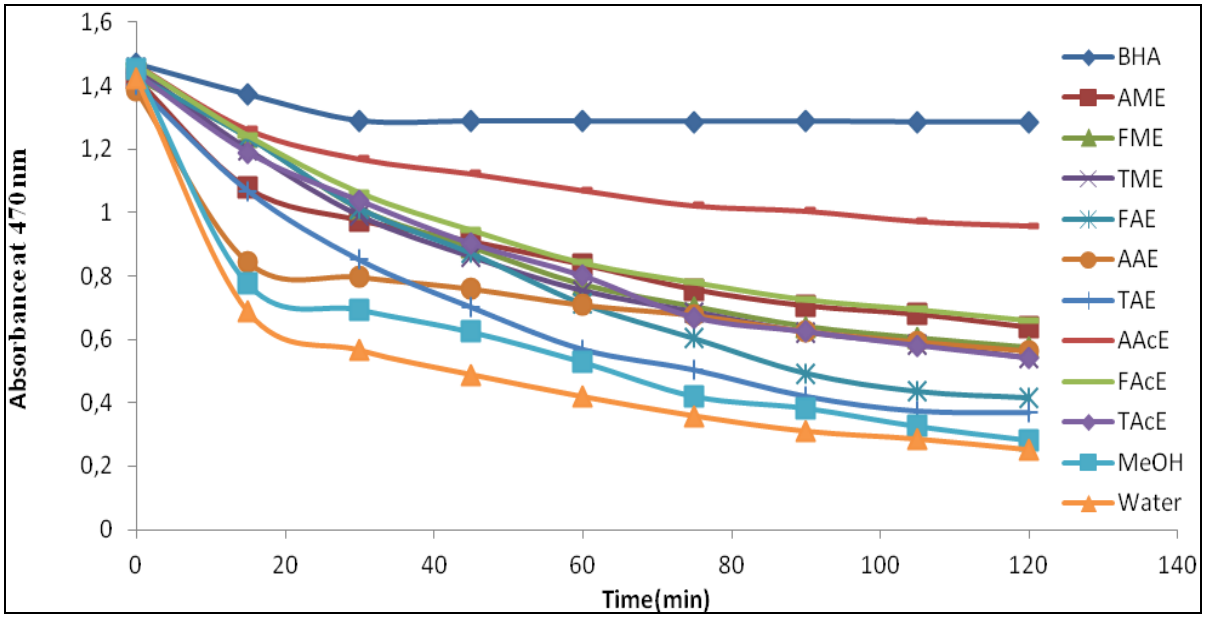


FIG. 4: CHANGE IN ABSORBANCE OF THE β-CAROTENE AT 470 NM IN THE PRESENCE OF *ARISTOLOCHIA LONGA* L. EXTRACTS, BHA AND NEGATIVE CONTROLS (DISTILLED WATER AND METHANOL). VALUES PRESENTED ARE THE MEANS OF TRIPLICATE ANALYSIS.

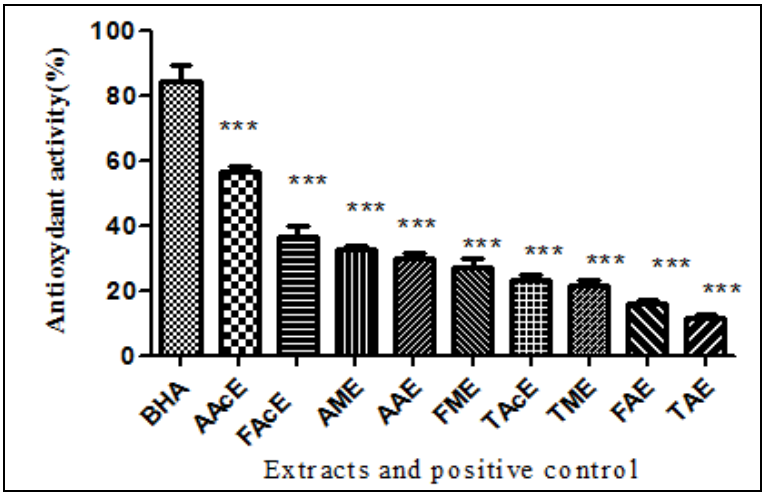


FIG. 5: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *A. LONGA* EXTRACTS AND POSITIVE CONTROL (BHA), MEASURED BY β-CAROTENE BLEACHING ESSAY. Values presented are the means of triplicate analysis. ***: $p< 0.001$.

***In vitro* anti-inflammatory activity:**

Inhibition of protein denaturation method: The inhibitory effect of different extracts at the concentration 500µg/mL on protein denaturation was showed in **Table 3** (**Fig. 6**). The aerial parts acetone extract exhibited the highest inhibition of protein denaturation (78.35±6.18%), and its effect was found no significant (p>0.05) in comparison with the standard of anti inflammation drug, diclofenac sodium showed the maximum inhibition (85.56±1.7%) at the same concentration.

Denaturation of protein is one cause of inflammation [21]. Production of autoantigen in certain arthritic diseases may be due to denaturation of protein [40]. The mechanism of denaturation probably involves alteration I electrostatic hydrogen, hydrophobic and disulfid bonding [41].

Medicinal plants used in traditional medicine treat anti-inflammatory conditions seem a viable and logical alternative in search of safe and effective anti-inflammatory agents [42]. The anti-inflammatory activity of *Aristolochia* species has been recently described [43]. From the data obtained, successive Soxhlet acetone extract of aerial parts has a highest percentage of inhibition followed by fruit methanol extract. This result was in concordance with the study of Murugan and Parimelazhagan [40] where successive Soxhlet methanol extract of *Osbeckia parvifolia* has the ability to protect the protein membrane from heat and alkali induced protein denaturation comparable to diclofenac.

TABLE 3: *IN VITRO* ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *A. LONGA* EXTRACTS

Extract (µg/mL)	Water			Methanol			Acetone			Diclofenac Sodium (µg/mL)
	Aerial parts (AAE)	Fruits (FAE)	Tubers (TAE)	aerial parts (AME)	Fruits (FME	Tubers (TME)	Aerial parts (AAcE)	Fruits (FAcE)	Tubers (TAcE)	
Percentage inhibition of protein Denaturation	26.80*** ±1.78	16.49*** ±0	45.36*** ±1.78	30.92*** ±1.78	68.04*** ±4.72	17.52*** ±1.78	78.35ns ±6.18	63.91*** ±6.43	54.63*** ±4.72	85.56 ±1.78

Values are mean± SD, n=3. Comparison was realized against diclofenac sodium. *p<0.05, **p < 0.01, *** p<0.001; ns: non significance

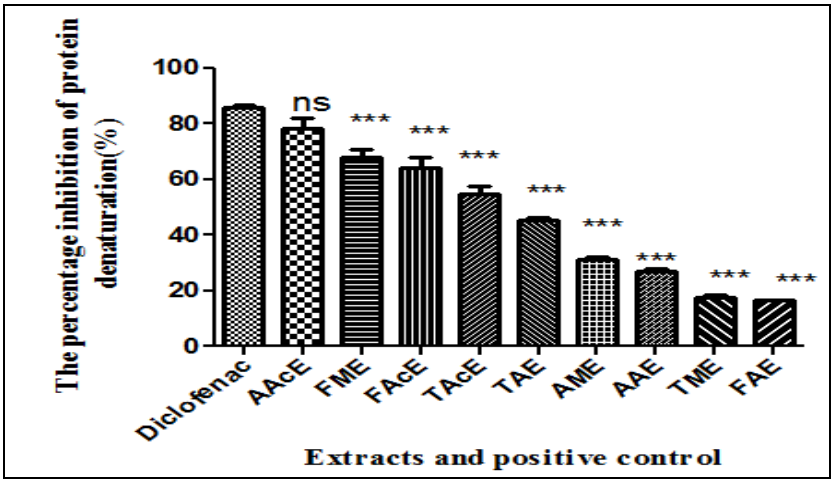


FIG. 6: *IN VITRO* ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *A. LONGA* EXTRACTS. COMPARISON WAS REALIZED AGAINST DICLOFENAC SODIUM; * p< 0.05, **p < 0.01, *** p< 0.001. ns: non significance

Anti-microbial activity:

Anti-bacterial activity: Plant extracts were tested at various concentrations against gram positive and gram negative bacterial strains. Methanol and acetone extracts were tested from100 mg/mL, whereas the aqueous extracts were tested from 200 mg/mL. The results are reported in **Table 4**. The antimicrobial activity of plants is related to their zone of inhibition against some of the pathogenic organisms. The fruit methanol extract (FMA) showed the highest inhibitory effects against *P. aeruginosa* with inhibition zone diameter of 20 mm, followed by *S. aureus* and *B. cereus* with inhibition zones of 18.5 and 15mm respectively,

almost similar results were observed with the acetone extracts from the aerial parts (AAcE) (*P. aeruginosa* 19mm, *S. aureus* 14mm, *B. cereus* 17.5mm) and fruits (FAcE) (*P. aeruginosa* 17mm , *S. aureus* 15mm, *B. cereus* 17mm), while the limited effect of the aerial part methanol extract (AME) was on *S. aureus* 8mm and *B. cereus* 8mm. However, the aerial part aqueous extract (AAE) had an impact on the *S. aureus* (22mm) and *P. aeruginosa* (11.6mm), while the impact of the fruit aqueous extract (FAE) is limited on the *S. aureus* only (16.3mm). Weaker effect was observed with the tuber's extracts. Except tuber methanol (TME) and acetone extracts (TAcE) have an impact only on the *B. cereus* (12.5 mm and 9 mm respectively). The results revealed that all extracts tested were effective against the microorganisms studied, except *E. coli* ATCC 25922. Gentamicin exerted highest inhibitory effect against the used strains than all plant extracts tested, while no inhibitory effect could be observed for DMSO, used as negative control.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for the extracts which showed the best antibacterial activity against the tested strains except *E. coli* ATCC 25922 that was resistant to all extracts used.

TABLE 4: *IN VITRO* ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF *A. LONGA* EXTRACTS EVALUATED BY AGAR DISC DIFFUSION METHOD

Plant material	Extract	Diameter of inhibition zone (mm)															
		Escherichia coli ATCC 2592 2				*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853				*Staphylococcus aureus* ATCC 25923				*Bacillus cereus* ATTC 10876			
		Concentration (mg/mL)															
		200	100	50	25	200	100	50	25	200	100	50	25	200	100	50	25
Aerial parts (Stem and leaves) (AAE)	Water	-	-	-		11.6	8	-		22	18	15		7	-	-	
Fruits (FAE)		-	-	-		-	-	-		16.3	14	8		8	-	-	
Tubers (TAE)		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Aerial parts (Stem and leaves) (AME)	Methanol		-	-	-		-	-	-		8	-	-		8	-	-
Fruis(FME)			-	-	-		**20**	**15**	**13**		18.5	17	12		15	14	13
Tubers(TME)			-	-	-		-	-	-		-	-	-		12.5	9	7
Aerial parts (Stem and leaves)(AAcE)	Acetone		-	-	-		19	17	13		14	11	9		17.5	15	12
Fruits(FAcE)			-	-	-		17	11	9		15	11	9		17	14.5	12
Tubers(TAcE)			-	-	-										9	7	-
Gentamicin			35				25				30				24		
DMSO			+				+				+				+		

Diameters of inhibition round the disc are expressed in mm- : no inhibition+ : growth of bacteria

The data obtained from microdilution method for determining MIC is presented in (**Table 5**). Minimum inhibitory concentration (MIC) of the aerial aqueous extract (AAE) was 50 mg/mL for *P. aeruginosa*, 12.5 mg/mL for *S. aureus*, whereas the fruit aqueous extract (FAE) was 50 mg/mL for *S. aureus.* The aerial (AAcE) and fruit acetone (FAcE) extracts were effective against *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *Bacillus cereus* and showed the same MIC, 12.5 mg/mL. A strong antibacterial activity is presented by a very low MIC [44]. The fruit methanolic extract (FME) gave the lowest minimal inhibitory concentration against *P. aeroginosa* and *S. aureus* with MIC values of 3.125 mg/mL, and 6.25mg/l for *Bacillus cereus.*

It is obvious that the antimicrobial activity of all extracts depends largely upon the concentration of extracts, the bacterial strains and the type of plant extract.

The extracts obtained were able to inhibit the growth of one or more of the tested standard strains to a certain percentage. The highest activity was shown in fruit methanol extract against *P. aeruginosa*, and *S. aureus* with a MIC= 3.125 mg/L**,** and 6.25 mg/L for *Bacillus cereus.* Further, *P. aeruginosa* is recognized as a dangerous pathogen owing to its resistance to many antibiotics and its capacity to acquire further resistance against progressively newly introduced antimicrobial agents. This organism is reported to be responsible

for a local nosocomial infection [45], and for *S. aureus* These results are very interesting since this microorganism can be commonly involved in skin infections [23], while *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* have been known to act as primary invaders or secondary infectious agents in a number of diseases and have been implicated in some cases of food poisoning [46].

TABLE 5: DETERMINATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS (mg/ml) OF *A. LONGA* EXTRACTS EXPRESSED AGAINST BACTERIAL STRAINS

Plant material	Extract	MIC (mg/mL)		
		***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	***Bacillus cereus* ATTC10876**
Aerial parts (Stem and leaves) (AAE)	Water	50	125	
Fruits (FAE)			50	
Fruits (FME)	Methanol	3,125	3,125	6,25
Aerial parts (Stem and leaves) AAcE)	Acetone	12,5	12,5	12,5
Fruit (FAcE)		12,5	12,5	12,5

In previous studies [23], Campores et al. showed an interesting antibacterial activity of dried extracts of *Aristolochia trilobata* against a few Gram-positive and Gram-negative bacteria. In another study, *Aristolochia paucinervis* Pomel, was reported as good antimicrobial drug [47]. Furthermore, Angalaparameswari et al., reported that ethyl acetate and methanol extracts of *Aristolochia bracteata* were found to be good antimicrobial agents [48]. However, plants belonging to the genus Aristolochia were reported to contain aristolochic acids [1, 3]. These compounds were shown to possess immunostimulatory and antiinflammatory properties [43].

In fact, this compound isolated from *Aristolochia longa* was reported to be active against several aerobic bacteria [49]. A similar compound isolated from ethyl acetate and methanol extracts of *Aristolochia bracteata* showed good antimicrobial activity against both gram positive and gram negative bacteria [48].

According to Balick and Arvigo, (1998) aristolochic acids were present in the methanol extracts and probably also in the water preparations of aerial parts of the plants used in the folk medicine [50].

It is possible that these compounds could be responsible for the antibacterial activities reported here.

On the other hand, we note that the antibacterial activity of all extracts depends largely upon the concentration and type of plant extracts, the solvent used and the bacterial strains.

The variability of the activity observed between these extracts may be due to the presence and concentration of bioactive compounds such as flavonoids, alkaloids, saponins and tannins. It is reported that flavonoids, phenolic compounds, tannins and alkaloids are the most important antimicrobial agent and bioactive constituents in plants [51].

In the present study, we noticed that extracts obtained with acetone as solvent (aerial and fruit extracts) have a broad spectrum of activities compared to the methanol extract (only fruit extract) (**Table 1**) and this result may be due to the type of phenolics and their relative distribution but not only for their content. Polyphenol structure affects the bacteria tolerance to polyphenols [52], moreover phytochemical investigation of acetone extract from *A. elengans* revealed the presence of lignanes, kaurane diterpenes and the sesquiterpene nerolidol and caparrapidiol [53].

Acetone extract have been shown to possess the highest activity when compared to other solvents [38, 30]. This activity was attributed to the volatile oil rich with constituents and bearing different functionalities. In our study, we support the fact that methanol and acetone are the best solvents. This applies to other studies indicating that methanol, methanol–water, and acetone were the best solvents in extracting antimicrobials and

antioxidants (i.e., polar constituents such as phenolics) from plant materials [54, 55].

Tuning the polarity of the organic solvents and extraction conditions could yield components with selectivity and high antimicrobial effects [30].

The aqueous extract shows less inhibition zone than the other extracts or none inhibition of the bacterial strains (tuber extract) at all the concentrations tested in comparison to other extracts. This is in consonance with the results of a study reporting water to be less effective than organic solvents at extracting the active compounds from plants [56], and other studies show that though water has maximum polarity among the chosen solvents, the water soluble flavonoids (mostly anthocyanins) have no antimicrobial significance and water soluble phenolics are only important as antioxidant compounds [57].

The lack of antibacterial activity in some of the concentrations of the extract is not surprising as a number of plant extracts which have been found uneffective against certain test organisms at lower concentrations and may be attributed to the presence of lesser amounts of the antimicrobial compounds [58]. But in our study, the results revealed that *E.coli* ATTC 25922 was resistant to all extracts used. In previous studies, it has been reported that this bacteria was not inhibited by the chloroform extract of *Aristolochia trilobota* leaves and bark [23], similarly [47] none of the fractions of *Aristolochia paucinervis* Pomel showed any activity against *E. coli* ATCC 25922 up to 1 mg/mL. The same result was shown in other studies where *E.coli* ATTC 25922 was resistant to almost extracts tested [30, 31].

The antibacterial effects of the extracts could be explained by disturbance of the permeability barrier of the bacterial membrane structure [59].

In fact, active principles singly or in combination inhibit greatly the life processes of microbes, by binding with their protein molecules, acting as chelating agents, altering their biochemical systems, preventing utilization of available nutrients to the microorganisms [60]. The antibacterial effect of phenolic compounds might be related to the interaction with enzymes, adsorption to cell membranes, substrate and metal ion deprivation [61].

Our study is in accordance with previous studies which indicate that the antibacterial activities depend considerably on extraction method, the solvent nature and the strain tested [62, 58, 31].

Antifungal activity: *A. longa* L. extracts obtained in this study were unable to inhibit the growth of the fungi tested (*Aspergillus flavus* NRRL 391 and *Aspergillus niger* 2CA 936), and yeast (*Candida albicans* ATCC1024).

CONCLUSION: In summary, the present study showed that the biologically active constituents from *A. longa* L. can be obtained by different extraction solvents. The extraction methods as well as the part of the plant used had a big influence on the antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory properties of extracts.

These results could justify the use of this plant in traditional pharmacopeia for the treatment of certain diseases; however, it is interesting to characterize the compounds responsible of this biological activity.

ACKNOWLEDGMENTS: We would like to thank Algerian Ministry of High Education and Research for the financial support as well as the Applied Microbiology Laboratory, University F.A.Setif1 for technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT: We declare that we have no conflict of interest.

REFERENCES:

1. Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C and Simmonds MSJ: Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid1 and 2—A global assessment based on bibliographic sources. Journal of Ethnopharmacology 2009; 125: 108–144.
2. Quezel P and Santa S : Nouvelle flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, 2 vols. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1962
3. Cherif HS, Saidi F, Boutoumi H, Rouibi A and Chaouia C: Identification et caractérisation de quelques composés chimiques chez *Aristolochia longa* L. Agricultura- Ştiinţă şi practicã. 2009; 71, 3-4: 76-82.
4. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Maamri S, Djireb F and Stocker P: Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 2006; 21 (6): 719–726.
5. Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, Stocker P: Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from Cleome arabica in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal

plants. Food and Chemical Toxicology 2010; 48: 2599–2606.
6. Belhattab R, Larous L, Kalantzakis G, Boskou D, Exarchou V: Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. Food, Agriculture & Environment 2004; 2 (1): 69 -73.
7. Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y: Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 2007; 102: 771-776.
8. Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knez EICS: Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. Acta Pharm.2004; 54: 65-72.
9. Bate- Smith EC: Haemanalysis of tannins, the concept of relative astringency. *Phytochemistry*1973; 12: 907-912.
10. Nagata M and Yamashita I: Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish 1992; 39(10): 925–928.
11. Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR, Baptista P: Total phenols, ascorbic acid, β-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chemistry 2007; 103: 413–419.
12. Devi LS, Dasgupta A, Chakraborty M, Borthakur SK and Singh NI: Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Schizophyllum Commune.* Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res 2014; 27(2): 173-177.
13. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V and Milos M: Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry 2004; 85: 633–640.
14. Oyaizu M: Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition 1986; 44: 307–315.
15. Sarikurkcu C, Tepe B, Daferera D, Polissiou M and Harmandar M: Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of Marrubium globosum subsp. globosum (lamiaceae) by three different chemical assays. Bioresource Technology 2008; 99: 4239–4246.
16. Goze I, Alim A, Tepe AS, Sokmen M, Sevgi K and Tepe B: Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. from Turkey. Journal of Medicinal Plants Research 2009; 3(4): 246-254.
17. Bougandoura N and Bendimerad N : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technologie 2012; 9: 14-19.
18. Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA and Linssen PH: Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal of the Science of Food and Agriculture 1998; 77: 140–146
19. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y and Nasri M: Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chemistry 2009; 114: 1198–1205.
20. Benmansour M, Balti R, Rabaoui L, Bougatef A and Guerfel M: Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from south Tunisian *Ajuga pseudoiva* Rob. Lamiaceae. Process Biochemistry 2013; 48: 723–729.
21. Kar B, Kumar RBS, Karmaka I, Dola N, Bala A, Mazumder UK and Hadar PK: Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of Mimusops elengi leaves. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2012; S976- S980
22. Belaiche P: Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. T1, Edition Maloine S.a., Paris 1979; 915p.
23. Camporese A, Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Morsellino N, De Simone F and Tubaro A: Screening of anti- bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology. 2003; 87: 103–107
24. Arif A, Howlader MdSI, Dey SK, Hira A, Hossain Hira A, Hossain MdH and Uddin MMN: Phytochemical screening and antibacterial activity of different fractions of *Operculina turpethum* root and leaf. Am. J. Sci. Ind. Res. 2013; 4(2): 167-172.
25. Masadeh MM, Alzoubi KH, Khabour OF and Al-Azzam SI: Ciprofloxacin-InducedAntibacterial Activity Is Attenuated by Phosphodiesterase Inhibitors. Current Therapeutic Research 2014; 77: 14–17.
26. Dai J and Mumper RJ: Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010; 15: 7313–7352.
27. Su X, Duan J, Jian Y, Shi J and Kakuda Y: Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. Journal of Food Composition and Analysis 2006; 19: 348-353.
28. Albano SM and Miguel MG: Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. Industrial Crops and Products 2011; 33(2): 338-343.
29. Martins N, Lillian Barros L, Santos-Buelga C, Silva S, Henriques M and Ferreira ICFR: Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterization. Food Chemistry 2015; 167: 131–137.
30. Koruthu DP, Manivarnan NK, Gopinath A and Abraham R: Antibacterial evaluation, reducing essay and phytochemical screening of *Moringa oleifera* extracts: effect of solvent polarity. Int.J.Pharm.Sci.Res. 2011; 2(11): 2991-2995.
31. Metrouh- Amir H, Duarte CMM and Maiza F: Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. Industrial Crops and Products 2015; 67: 249–256.
32. Khaled-Khodja N, Boulekbache-Makhlouf L and Khodir Madani K: Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. Industrial Crops and Products 2014; 61: 41–48
33. Benarba B and Meddah B: Ethnobotanical study, antifungal activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa.* J Intercult Ethnopharmacol 2014; 3 (4): 150- 154.
34. Seidel V: Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), 2005; pp: 27-37.
35. Bruneton J : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3ème éd).Tec et Doc (Ed), Paris , 1999; 1120p
36. Duan XJ, Zhang WW, Li XM and Wang BG: Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, Polysiphonia urceolata. Food Chemistry 2006; 95: 37–43.
37. Sharif Ali S, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A and Bora U: Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food Research International 2008; 41: 1–15.
38. Bhatt P and Negi PS: Antioxidant and antibacterial activities in the leaf extracts of Indian Borage

(Plectranthus amboinicus). Food Nutr. Sci. 2012; 3: 146–152
39. Zhou K and Yu L: Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. Lebensm. Wiss. Technol. 2004; 37: 717–721
40. Murugan R and Parimelazhagan T: Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – An *in vitro* approach. Journal of King Saud University – Science 2014; 26: 267–275.
41. Williams LAD, O' Connar A, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, Conrad J, Vogler B, Rosner H and Kraus W: The *in vitro* Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. West Indian Med J., 2008; 57 (4): 327-331.
42. Alhakmani F, Kumar S and Khan SA: Estimation of total phenolic content, *in- vitro* antioxidant and anti inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(8): 623-627.:
43. Sosa S, Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Pizza C, Altinier G and Tubaro A: Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central-American plants. Journal of Ethnopharmacology 2002; 81: 211–215.
44. Coulidiati TH, Millogo-Koné H, Lamien-Méda A, Lamien CE, Lompo M, Kiendrébéogo M, Bacasso M, Yougbaré-Ziébrou M, Millogo-Rasolodimby J and Nacoulma OG: Antioxidant and antibacterial activities of Combretumnioroense Aubrév. Ex Keay (Combretaceae). Pak. J. Biol. Sci. 2009; 3: 264–269.
45. Mahesh CS, Debasmita D, Shakti R, Nagen KD, Rabindra NP: Multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* as known from surveillance of nosocomial and community infections in an Indian teaching hospital. J Public Health, 2012 ; 20:413–423
46. Kumar VP, Chauhan N S, Padh H and Rajani M: Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 2006; 107: 182–188.
47. Gadhi CA, Weber M, Mory F, Benharref A, Lion C, Jana M and Lozniewski A: Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel. Journal of Ethnopharmacology 1999; 6: 87–92.
48. Angalaparameswari S, Mohamed Saleem TS. Alagusundaram M, Ramkanth S, Thiruvengadarajan VS, Gnanaprakash K, Madhusudhana Chetty C and Pratheesh G: Anti-microbial Activity of Aristolochic Acid from Root of *Aristolochia bracteata* Retz. World Academy of Science, Engineering and Technology 2011; 57: 1017-1020.
49. Hinou J, Demetzos C, Harvala C and Roussakis C : Cytotoxic and anti-microbial principles from the roots of *Aristolochia longa*. International Journal of Crude Drug Research1990; 28: 149–151.
50. Balick M and Arvigo R: The rain forest. Lotus Press, New York.1998
51. Levy SB: Drug Resistance: The New Apocalypse (special issue).Trends Microbiol. 1994; 2: 341–425.
52. Taguri T, Tanaka T and Kouno I: Antimicrobial activity of 10 different plantpolyphenols against bacteria causing food- borne disease. Biol. Pharm. Bull. 2004; 27(12): 1965–1969.
53. Vila R, Mundina M, Muschietti L, Priestap HA, Bandoni AL, Adzet T and Cañigueral S: Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elengans*. Phytochemistry 1997; 46(6):1127 -1129.
54. Al-Zorek NS and Al–Taher AY: Antibacterial activity of spathe from *Phoenix dactylifera* L. against some food-borne pathogens. Industrial Crops and Products 2015; 65: 241–246.
55. Deng Y, Yang G, Yue J, Qian B, Liu Z, Wang D, Zhong Y and Zhao Y: Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. Food Control 2014; 38: 184-191.
56. Sukumarn S, Kiruba S, Mahesh M, Nisha SR, Miller PZ, Ben CP et al.: Phytochemical constituents and antibacterial efficacy of the flowers of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) Baker ex Heyne. Asian Pac J Trop Med. 2011; 4(9): 735-738.
57. Yamaji K, Ishimoto H, Usui N and Mori S: Organic acids and water soluble phenolics produced by *Paxillus* species. Mycorrhiza 2005; 15 (1): 17-23.
58. Nisa H, Kamili AN, Bandh SA, Amin SU, Lone BA and Parray JA: Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant efficacy of different extracts of Rumex dentatus L.- A locally used medicinal herb of Kashmir Himalaya.Asian Pac J Trop Dis. 2013; 3(6): 434- 440.
59. Hayek SA and Ibrahim SA: Antimicrobial activity of *Xoconostle pears* (*Opuntia matudae*) against Escherichia coli O 157:H7 in laboratory medium. Int. J. Microbiol. 2012; 1– 6.
60. Garrod LP, Lambert HP and O'Gray F: Antibiotics and Chemotherapy, Fourth Ed. Churchill: Livingstones, Edinburgh, London, and New York.1995
61. Scalbert A: Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry 1991; 30: 3875–3883.
62. Hayouni EA, Abedrabba Bouix M and Hamdi M: The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phenolicea* L. fruit extracts. Food Chemistry 2007; 105: 1126–1134.

How to cite this article:
Merouani N, Belhattab R and Sahli F: Evaluation of the biological activity of *Aristolochia longa* L. Extracts. Int J Pharm Sci Res 2017; 8(5): 1978-92.doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.8(5).1978-92.

All © 2013 are reserved by International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. This Journal licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License.

This article can be downloaded to **ANDROID OS** based mobile. Scan QR Code using Code/Bar Scanner from your mobile. (Scanners are available on Google Playstore)

الملخص: في إطار تثمين الموارد النباتية، إخترنا دراسة نبات.*Aristolochia longa* L (Aristolochiacea) ينمو بالجزائر وتحديدا بولاية سطيف، يستعمل في الطب الشعبي لأغراض متعددة، خاصة لمكافحة مرض السرطان. تخص هذه الدراسة التحليل الكيميائي النوعي لهذا النبات، والكمي الذي يخص تقدير الفينولات الكلية، الفلافونوييدات، ومواد الدباغة، بعد تحضير مستخلصات نباتية من الجزء الهوائي(السيقان والأوراق)، الثمارو الدرنات باستعمال مذيبات مختلفة ذات قطبية مختلفة مثل الأسيتون، الميثانول والماء المقطر. تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة مخبريا بثلاث طرق مختلفة: إلتقاط مباشر للجذور الحرة بطريقة إزاحة جذر DPPH، القدرة على الإرجاع و اختبار ابيضاض المركب الـβ- Carotène. أظهر المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي أكبر قيمة للفينولات الكلية ±29,6 µg (525,43 /مغ)، يليه المستخلص المائي للثمار (518,54 ±14,93 µg /مغ)، في حين حقق المستخلص الميثانولي للجزء الهوائي أكبر قيمة من الفلافونوييدات (52, 37 ±0,94 µg /مغ)، كماأعطى أيضا أعلى نشاطية مضادة للأكسدة لإزاحة جذرالـ DPPH، وأعلى قدرة إرجاع(55,04 ± 1,29 µg /مع و0,200 ± 0,019 مغ/ملل على الترتيب)، من جهة أخرى المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي كانت له أعلى نسبة (57%) في النشاطيةالمضادة للأكسدة في إختبار ابيضاض الـβ- Carotène. بالنسبة للنشاطية المضادة للبكتيريا فكان المستخلص الميثانولي للثمار فعالا جدا ضد البكتيريا المختبرة *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853،ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* وATTC10876 *Bacillus cereus* ، في حين لم نلاحظ أي تأثير لكل المستخلصات على الفطريات المختبرة *Aspergillus flavus* NRRL 391، *Aspergillus niger* 2CA 936 والخميرة *Condida albicans* ATCC1024. أكبرنسبة تثبيط لتخريب البروتينات كانت من طرف المستخلص الأسيتوني للجزء الهوائي(78,35±6,18%) في تركيز 500 µg /ملل مقارنة مع ديكلوفيناك الصوديوم (85,56± 1,78%) في النشاطية المضادة للإلتهاب.الدراسة التشريحية لكل من جذر ، ساق و ورقة *Aristolochia longa* L. بينت أن لديها تركيب نموذجي لنبات ثنائي الفلقة، وأثبتت أن درنة هذا النبات هي درنة جذر. كما أظهرت دراسة السمية الحادة لكل من المستخلص المائي للدرنات و المستخلص المائي للثمارأنه غيرسام نسبيا بـ DL_{50} تفوق12غ/كغ وDL_{50} أكبرمن 5000 مغ/كغ< لكل من المستخلصين على الترتيب،كما أثبتت التحاليل البيوكيميائية و مقاطع الأنسجة للفئران على تأثر كل من أنسجة الكبد والكلى خاصة عند الجرعات العالية من هذا النبات. أخيرا، ونظرا للنتائج المتحصل عليها فإن نبات *Aristolochia longa* L. لديه نشاطية بيولوجية هامة، مما يدعونا لدراسته بصفة أدق لإمكانية استعماله بشكل أفضل في المجال الطبي.

Resumé : L'objectif de cette étude est de valoriser une plante médicinale locale *Aristolochia longa* L. (Aristolochiacea).Cette plante est utilisée traditionnellement contre beaucoup de maladies et surtout le cancer. Cette étude vise l'analyse phytochimique qualitative et quantitave de la plante(dosage des polyphénols totaux,des flavonoides et des tanins),après préparation des extraits de la partie aérienne de la plante(tiges et feuilles),des fruits et des tubercules, en utilisant des solvants avec polarité différente, comme l'acetone,Methanol et l'eau distillée. L'activité anti-oxydante a été évaluée in vitro par l'utilisation du test DPPH, par le pouvoir réducteur du Fer et par le test du blanchissement du ß-carotène. L'extrait acetonique de la partie aérienne contient une grande quantité de phénols totaux(525,43±29,6µg/mg) suivi par l'extrait aqueux des fruits(518,54±14.93µg/mg). Alors que l'extrait methanolique de la partie aérienne contient la plus grande quantité des flavonoïdes (52,37±0.94µg/mg), il posséde aussi une grande activité antioxydante par le test DPPH et un grand pouvoir réducteur (55,04ug/ml±1,29 et 0,2 mg/ml±0,019 respectivement). D'autre part l'extrait acetonique de la partie aérienne possède l'activité la plus élevée avec un taux de 57% dans l'activité antioxydante du blanchissement du ß-carotène. En ce qui concerne l'activité antibactérienne, l'extrait méthanolique des fruits est très efficace contre le *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923and *Bacillus cereus* ATTC10876.Mais tous les extraits de la plante n'ont aucune activité antifongique sur *Aspergillus flavus* NRRL 391, *Aspergillus niger* 2CA 936 and *Condida albicans* ATCC1024. Pour l'activité anti-inflammatoire le taux le plus élevé d'inhibition de la dénaturation des protéines a été observé avec l'extrait acetonique de la partie aérienne (78,35±6,18)% pour la concentration500µg/mlcomparativement au diclofenac de sodium avec (85,56±1,78) % .L'étude anatomique de toutes les parties de la plante(racines,tiges et feuilles) a démonté qu'elle a une morphologie typique d'une plante dicotylédone et que le tubercule de cette plante est issu d'une racine. L'étude de la toxicité aigue démontre que les extraits aqueux des tubercules et des fruits sont relativement non toxiques avec des DL_{50} respectives supérieure à 12g/kg et supérieure à 5000g/kg. Les analyses biochimiques et l'étude histologique des organes des souries ont démontré que les tissus des reins et des foies sont plus affectés surtout à des doses élevées. Enfin, et vu les résultats obtenus, l'Aristolochia longa L. a une activité biologique importante, ce qui nous incite à l'étudier d'une façon minutieuse et approfondie pour une meilleure utilisation dans le domaine médical.

Abstract: The aim of this study is to evaluate *Aristolochia longa* L. (Aristolochiacea) ,a local medicinal plant. It is used in folk medicine for multiple purposes, especially for the fight against cancer. This study was devoted the qualitative and quantitative phytochemical analysis(the determination of polyphenols, flavonoids, and tannins contents of *Aristolochia longa* L.) after their extraction by using various solvents with different polarities(methanol, acetone and distilled water). These extracts were prepared from aerial parts (stems and leaves), fruits and tubers. The antioxidant activity was determined using three in vitro assays methods**:** scavenging effect on DPPH, the reducing power assay and ß-carotene bleaching inhibition (CBI). The results obtained indicate that the acetone extracts from the aerial parts presented the highest contents of polyphenols(525,43±29,6µg/mg)followed by fruit aqueous extract (518,54±14.93µg/mg). while the aerial parts methanol extract has the highest flavonoids content (52,37±0.94µg/mg).The results of the antioxidant activity showed that all extracts of *Aristolochia longa* L., prepared using different solvent, have diverse antioxidant capacities, however The aerial parts methanol extract exhibited the highest antioxidant capacity of DPPH and reducing power(respectively 55,04ug/ml±1,29 and 0,2 mg/ml±0,019), but the aerial parts acetone extract showed the highest antioxidant capacity in the test of ß-carotene bleaching inhibition with 57%. For antibacterial activity the fruit methanol extract was too efficient against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923and *Bacillus cereus* ATTC10876, but no effect was observed when these extracts were tested on the fungi *Aspergillus flavus* NRRL 391, *Aspergillus niger* 2CA 936, and *Condida albicans* ATCC1024. The inhibition protein denaturation was found in the aerial parts acetone extract to be (78,35±6,18)% at the dose 500µg/ml,with regards to standards Diclofenac sodium (85,56±1,78)% in the anti-inflammatory activity. The anatomical study of root, stem and leaf of *Aristolochia longa* L. showed that it has a typical structure of the dicotyledon plant, and proved that the tuber of this plant is a root tuber. The study of acute toxicity of the aqueous extract of tubers and the Fruit aqueous extract also showed that it was relatively non-toxic, with DL50 superior to 12 g / kg, and DL50 superior than 5000 mg / kg) respectively. Biochemical analyses and tissue sections of mice also showed that both liver and kidney tissues were affected, especially at high doses of this plant. Finally, due to the obtained results, the Aristolochia longa L. plant has an important biological activity, which invites us to study more precisely the possibility of a better use in the medical field.